



**HAL**  
open science

# Implication de la Mitogen-Activated Protein Kinase 1 (MAPK1) et du Facteur de Réponse à l'Éthylène (ERF1) dans la signalisation de l'éthylène chez la Pervenche de Madagascar.

Louis-Valentin Méteignier

► **To cite this version:**

Louis-Valentin Méteignier. Implication de la Mitogen-Activated Protein Kinase 1 (MAPK1) et du Facteur de Réponse à l'Éthylène (ERF1) dans la signalisation de l'éthylène chez la Pervenche de Madagascar.. Sciences du Vivant [q-bio]. 2011. hal-04164054

**HAL Id: hal-04164054**

**<https://hal.inrae.fr/hal-04164054v1>**

Submitted on 18 Jul 2023

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

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

**UNIVERSITE FRANCOIS RABELAIS – TOURS**

**ECOLE DOCTORALE  
« SANTE, SCIENCES, TECHNOLOGIES »**

**Master "Sciences de la Vie et de la Santé" Spécialité Recherche:  
"PHYSIOLOGIE, BIOMOLECULES ET THERAPEUTIQUES"**

**Mémoire présenté par Louis-Valentin METEIGNIER**

**Implication de la Mitogen-Activated Protein Kinase 1 (MAPK1)  
et du Facteur de Réponse à l'Éthylène (ERF1) dans la  
signalisation de l'éthylène chez la Pervenche de Madagascar.**

**Travail réalisé au Laboratoire EA2106 : Biomolécules et Biotechnologies  
Végétales ; UNIVERSITE FRANCOIS RABELAIS, 31 avenue Monge, UFR Sciences  
Pharmaceutiques, 37200 TOURS**

**Directeurs du Stage : Pr. Joël CRECHE (HDR)  
Dr. Gaëlle GLEVAREC**

**Année Universitaire 2009-2010**

Tout d'abord, merci au Pr. Benoit St PIERRE pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, ainsi qu'à toute l'équipe de l'E.A. 2106 pour son accueil si chaleureux.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance au Pr. Joël Crèche pour m'avoir permis d'effectuer mon stage de Master 2<sup>ème</sup> au sein de l'E.A. 2106.

Aussi, je souhaite exprimer toute ma gratitude au docteur Vincent Courdavault ainsi qu'à Grégory Guirimand, pour m'avoir fourni les vecteurs de BiFC et pour leur transmission de connaissance sur la transformation par biolistique et la microscopie à épifluorescence.

Merci à Audrey Oudin pour ses bons conseils sur la technique de retard sur gel, et pour ses bons conseils tout court !

Je tiens à exprimer ma réelle amitié envers Céline Melin (alias « pâté en croûte ») et Olivia Ginis pour leur sympathie au jour le jour. Aussi, je me permets de donner un conseil avisé à Olivia : « Continus la mimolette au réveil, ça renforce les os... et surtout, reste Rock'n'Roll ! ».

Merci à Marie-Francoise pour m'avoir fait découvrir (à plusieurs reprises !) ce doux breuvage qu'est l'Epine.

Finalement, je dis un « grand » merci au docteur Gaëlle Glévarec pour m'avoir encadré avec soutien, investissement, et grande compétence pendant six mois. Mon épanouissement et mon intégration au sein de l'équipe sont entièrement dus à la confiance qu'elle m'a accordé.

## **Abréviations**

**ADN<sub>c</sub>** : Acide Desoxyribonucleique Complémentaire

**AIM** : Alcaloïdes Indoliques Monoterpéniques

**AP2** : Apetala 2

**bHLH** : Basic Helix-Loop-Helix

**BiFC** : Bimolecular Fluorescence Complementation

**bZIP** : Basic Leucine Zipper.

**CFP** : Cyan Fluorescent Protein

**CK** : Cytokinines

**CRT** : C-Repeat

**DRE** : Dehydration-responsive Element

**EIL1** : Ethylene Insensitive-Like 1

**EIN3** : Ethylene Insensitive 3

**ERF** : Ethylen-responsive Factor

**ET** : Ethylène ou Ethéfon

**JA** : Jasmonates

**LBamp100** : milieu Luria-Bertoni avec Ampicilline 100 ug/ml

**MeJA** : Methyl Jamonate

**MAPK** : Mitogen-Activated Protein Kinase

**MAPKK** : Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase

**MAPKKK** : Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase

**NLS** : Nuclear Localization Sequence

**NAA** : naphthalene acetic acid, auxine de synthèse

**PCR** : Polymerase Chain Reaction

***Pfu* Polymerase** : *Pyrococcus furiosus* polymérase

**Rpm** : Rotation par minute

**SV40** : Simian Virus 40

**TDC** : Tryptophane décarboxylase

**TSAP** : Thermosensitive Alkaline Phosphatase

**YFP** : Yellow Fluorescent Protein

**2,4-D** : 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid, auxine de synthèse



## Sommaire

I. Introduction .....	1
I.1. Contexte scientifique .....	1
I.2. Objectifs de l'étude .....	2
II. Matériel et Méthode .....	4
II.1. Matériel végétal .....	4
II.1.1 Cultures cellulaires .....	4
II.1.2. Traitements des cellules.....	4
II.1.3. Arrêt des cellules.....	4
II.2. Extraction et purification des acides nucléiques.....	4
II.2.1. Extraction des ARN totaux.....	4
II.2.2. Extraction d'ADN plasmidique.....	5
II.2.3. Purification d'ADN digéré ou amplifié par PCR.....	5
II.3. Analyse transcriptionnelle par RT-PCR quantitative de <i>MAPK1</i> et <i>ERF1</i> .....	5
II.3.1. Traitement des ARN à la désoxyribonucléase I (DNase I).....	5
II.3.2. Transcription inverse des ARN .....	5
II.3.3. RT-PCR quantitative .....	6
II.4. Réactions de polymérisation en chaîne (PCR) .....	7
II.4.1. Amplification des extrémités 3' et 5' de <i>ERF1</i> .....	7
II.4.2. Amplification des inserts pour les clonages en vecteurs d'expression .....	7
II.4.3. Vérification de la présence d'un insert dans les clones recombinants .....	7
II.5. Analyses des acides nucléiques.....	8
II.5.1. Vérification de la présence d'un insert .....	8
II.5.2. Electrophorèse sur gel d'agarose .....	8
II.5.3. Séquençage et analyse bioinformatique .....	8
II.6. Clonages des fragments ADN .....	8
II.6.1. A-tailing .....	8
II.6.2. Ligation des fragments dans le vecteur pGEM-T .....	8
II.6.3. Clonage en vecteur de localisation pSCA-YFP.....	9
II.6.4. Clonage en vecteurs de BiFC.....	9
II.7. Transformation bactérienne .....	10
II.8. Localisation sub-cellulaire et mesure d'interaction protéine-protéine par reconstitution de fluorophore (BiFC).....	12
II.8.1. Préparation des tapis cellulaires.....	12
II.8.2. Précipitation des constructions plasmidiques sur les particules d'or.....	12
II.8.3. Bombardement des cellules.....	13
II.8.4. Observation au microscope à épifluorescence .....	13
III. Résultats .....	13
III.1. Isolement de l'ADNc pleine longueur de <i>ERF1</i> .....	13
III.2. Caractérisation transcriptionnelle de <i>ERF1</i> et <i>MAPK1</i> : effet des hormones éthylène, méthyljasmonate et cytokinines.....	15
III.2.1. Mesure de l'expression de <i>ERF1</i> .....	15
III.2.2. Mesure de l'expression de <i>MAPK1</i> .....	15
III.3.1. Localisation sub-cellulaire de <i>MAPK1</i> .....	16
III.3.2. Localisation sub-cellulaire de <i>ERF1</i> .....	17
III.4. Mesure d'interaction protéine-protéine par reconstitution de fluorophore (BiFC).....	17
III.4.1. Suivi de la formation d'homo-oligomères .....	17
III.4.1.1. Suivi de la formation d'homo-oligomères de <i>MAPK1</i> .....	18
III.4.1.2. Suivi de la formation d'homo-oligomères de <i>ERF1</i> .....	19

III.4.2. Suivi de l'interaction entre ERF1 et MAPK1 .....	19
IV. Discussion .....	22
V. Bibliographie .....	25

## I. Introduction

### I.1. Contexte scientifique.

*Catharanthus roseus* (L.) G. Don, ou la Pervenche de Madagascar, est une Apocynaceae qui présente le potentiel d'un fort impact sur les thérapeutiques humaines de par sa production unique de multiples composés à actions pharmacologiques que sont les Alcaloïdes Indoliques Monoterpéniques (AIM). La synthèse *in planta* de plus de 100 composés caractérisés (Memelink *et al.*, 2001) confère à la Pervenche de Madagascar une véritable et singulière « signature métabolique ». On distingue les alcaloïdes monomériques comme l'ajmalicine, utilisée dans le traitement du diabète et de l'hypertension, des alcaloïdes hétérodimériques comme la vincristine et la vinblastine, appelés vinca-alcaloïdes, qui sont de puissants agents antimitotiques, utilisés en chimiothérapie anticancéreuse. Toutefois, leur taux de biosynthèse est très faible dans la plante. En effet, les rendements endogènes sont de l'ordre de 0,5 mg/kg de matière sèche pour la vincristine et 5 mg/kg de matière sèche pour la vinblastine dans les feuilles alors que les précurseurs directs comme la vindoline et la catharanthine se retrouvent de l'ordre de 250 mg/kg de matière sèche (communication personnelle Pr. J. Crèche). Ce différentiel est la preuve de la très forte régulation des enzymes des dernières étapes biosynthétiques conduisant à la synthèse d'AIM dimériques. De plus, le coût de ces métabolites d'intérêt reste encore très élevé (van der Heijden *et al.*, 2004). Aussi, l'EA2106 s'attache depuis de nombreuses années à étudier l'architecture et la régulation de la voie de biosynthèse des AIM chez *C. roseus* afin de pouvoir augmenter leur production.

Deux modèles de *C. roseus* sont couramment utilisés pour l'étude de la voie de biosynthèse des AIM : la plante entière et les suspensions cellulaires indifférenciées. Les études *in planta* réalisées dans l'équipe EA2106 ont permis de montrer que la biosynthèse des AIM est compartimentée de manière complexe (Burlat *et al.*, 2004 ; Mahroug *et al.*, 2006 ; Oudin *et al.*, 2007). Cette compartimentation complexe explique les difficultés d'obtention de certains AIM (vincristine, vinblastine) dans un système *ex planta*. A partir des suspensions cellulaires de *C. roseus*, différentes approches ont été développées pour améliorer la production alcaloïdique mais sans pouvoir obtenir des augmentations durables de l'accumulation des AIM d'intérêt (Giglioli-Guivarc'h *et al.*, 2006). Toutefois, la forte régulation du métabolisme alcaloïdique par différents signaux hormonaux a été mise en évidence dans l'équipe. En effet, les cytokinines (CK), l'éthylène (ET) et le méthyljasmonate (MeJA) induisent la production d'AIM, tandis que l'auxine et les gibbérellines l'inhibent (Décendit *et al.*, 1992 ; Gantet *et al.*, 1997 ; Papon *et al.*, 2005 ; Amini *et al.*, 2009).

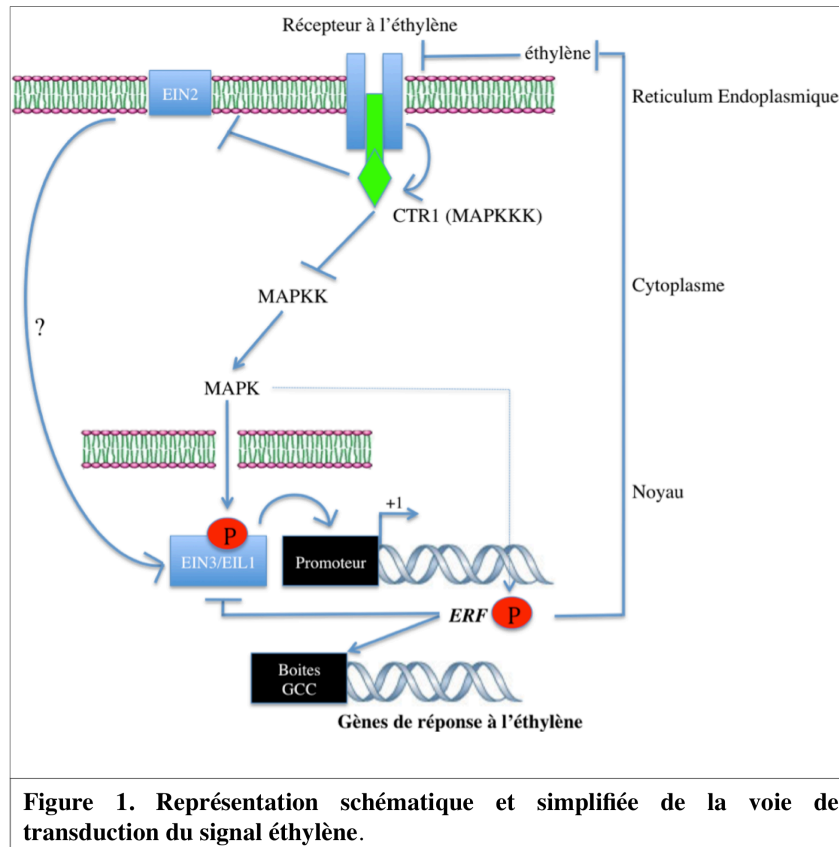
La connaissance des niveaux de contrôle de l'activité métabolique secondaire est indispensable à la levée des verrous de la production alcaloïdique au sein de la plante. La finalité de la compréhension est la potentialisation de la production des AIM sur plante entière. Cette

potentialisation permettra en théorie de diminuer le coût de production et donc de commercialisation de ces molécules qui restent des métabolites à très haute valeur ajoutée.

## **I.2. Objectifs de l'étude.**

Un des axes de recherche de l'équipe EA2106 est l'analyse des mécanismes de régulation du métabolisme des AIM par les hormones végétales. Ce présent travail s'inscrit dans cette thématique avec l'étude d'un signal hormonal gazeux connu pour stimuler cette biosynthèse : l'éthylène (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>). Chez les végétaux, cette hormone est connue pour intervenir dans la maturation des fruits, dans la germination, dans la sénescence des feuilles et des fleurs et dans l'abscission des feuilles et des fruits. Elle intervient également dans la réponse à certains stress biotiques (attaque de pathogènes) et abiotiques (froid, sécheresse) (Etheridge *et al.*, 2005). Plus précisément, chez *C. roseus*, l'équipe a montré que l'expression de plusieurs gènes de la voie de biosynthèse des AIM est activée par l'éthylène, dans un milieu dépourvu d'auxine, en corrélation avec l'augmentation de la production des AIM (Papon *et al.*, 2005). C'est pourquoi, l'équipe aborde l'étude de la voie de signalisation de l'éthylène dans le but d'identifier des protéines susceptibles d'intervenir dans la régulation de la biosynthèse alcaloïdique.

La voie de transduction du signal éthylène est représentée de manière synthétique sur la Figure 1. Les récepteurs associés au réticulum endoplasmique sont des régulateurs négatifs du signal éthylène dont l'activité est inhibée par la fixation de la molécule d'éthylène. Ces récepteurs activent une protéine appelée « Constitutive Triple Response 1 » (CTR1), qui est une MAPKKK, qui est aussi un régulateur négatif de la transduction du signal. L'union de l'éthylène avec son récepteur inactive CTR1 qui devient incapable de bloquer la voie de transduction, ce qui permet alors d'activer les éléments en aval, comme EIN2, et également des MAPKK, puis des MAPK. L'ensemble active et stabilise alors des facteurs de transcription EIN3 ou EIL1, qui vont à leur tour stimuler la transcription de Facteurs de Réponse à l'Éthylène (ERF), eux-mêmes facteurs de transcription ayant pour fonction de se lier aux boîtes GCC des promoteurs de gènes de réponse à l'éthylène. Il faut noter que EIN2 est un homologue végétal des transporteurs d'ions métalliques NRAMP, dont le mécanisme d'action sur l'activation de EIN3/EIL1 est encore méconnu. Aussi, un rétrocontrôle négatif se met rapidement en place après la perception du signal éthylène et directement induit par les ERF. Ce rétrocontrôle négatif se divise en deux mécanismes : 1) La transcription des récepteurs à l'éthylène ayant pour conséquence l'atténuation de la perception de l'éthylène et 2) la transcription d'ubiquitine ligase ayant pour conséquence d'adresser EIN3/EIL1 au protéasome et donc de diminuer son accumulation dans le noyau (Yoo *et al.*, 2008a, b).



Dans ce travail, il est question de l'étude de deux éléments de cette voie en particulier : une MAPK, annotée MAPK1, isolée au laboratoire avant mon arrivée en stage et un facteur de transcription de type ERF, annoté ERF1, dont j'ai isolé l'ADNc pleine longueur. En ce qui concerne les MAPK, ce sont des sérine-thréonine kinases qui se retrouvent chez les végétaux, mais également chez les animaux et l'Humain, où elles jouent un rôle au niveau du cycle cellulaire. Chez les plantes, les MAPK interviennent dans la division cellulaire, le développement, dans les signalisations et synthèses hormonales et dans la réponse aux stress abiotiques et aux pathogènes (Popescu *et al.*, 2009). Plus précisément, chez *C. roseus*, le traitement par un inhibiteur pharmacologique de MAPK inhibe la transcription du gène TDC, enzyme impliquée dans la synthèse du précurseur indolique des AIM. Ceci a pour conséquence de diminuer la synthèse de catharanthine, un précurseur direct des AIM, suggérant le rôle des MAPK dans le contrôle de la synthèse alcaloïdique (Ramani *et al.*, 2007). En ce qui concerne les ERF, ce sont des facteurs de transcription qui possèdent un domaine de liaison à l'ADN de type AP2/ERF. Ce domaine conservé de 57-66 acides aminés est exclusif au règne végétal et permet aux ERF de se lier à deux types de séquences promotrices : les boîtes GCC (AGCCGCC) et les boîtes DRE/CRT (A/GCCGAC) (Zhang *et al.*, 2009). Cette famille de facteurs de transcription est impliquée dans la croissance, le développement et la réponse aux stress biotiques et abiotiques (Nakano *et al.*, 2006) La transcription de *ERF1* chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana* est connue également pour être dépendante de la voie des jasmonates et de l'éthylène, bien qu'une seule hormone signal soit nécessaire à son expression (O. Lorenzo *et al.*, 2003).

Mon travail a consisté dans un premier temps à isoler l'ADNc pleine longueur correspondant à ERF1. La régulation par divers signaux hormonaux, de l'expression de *MAPK1* et *ERF1* a été caractérisée par RT-PCR quantitative. La localisation sub-cellulaire de ERF1 et MAPK1, en fusion avec la YFP, a également été établie. Dans un deuxième temps, des mesures d'interaction protéine-protéine par reconstitution de fluorophore (BiFC) ont été réalisées avec pour objectif la mise en évidence d'une potentielle interaction entre MAPK1 et ERF1.

## II. Matériel et Méthodes.

### II.1. Matériel végétal.

#### II.1.1 Cultures cellulaires.

Au cours de cette étude, une suspension cellulaire non chlorophyllienne (lignée C20D) de *Catharanthus roseus* [L.] G. Don a été utilisée. Cette suspension est entretenue à 25°C, en agitation continue à 120 rpm et à l'obscurité. Les cellules sont cultivées dans 50 mL de milieu B5 (Gamborg *et al.*, 1968) supplémentés en saccharose (58 mM) et en 2-4D (4,5  $\mu$ M). Les cellules sont repiquées tous les 7 jours dans un milieu de culture neuf. Le 2-4D est une hormone de synthèse appartenant au groupe des auxines. Elle est nécessaire à la croissance de la lignée C20D, cependant elle engendre une inhibition de la synthèse d'AIM. Le retrait de cette hormone pendant un cycle de culture (7 jours) restaure la production alcaloïdique.

#### II.1.2. Traitements des cellules.

Afin d'établir la caractérisation transcriptionnelle de *MAPK1* et *ERF1*, les cellules C20D ont été soumises aux traitements hormonaux suivant : CK (5 $\mu$ M), ET (500  $\mu$ M) ou MeJA (100  $\mu$ M) pendant 15 minutes, 30 minutes, 1 heure ou 2 heures. Pour l'ensemble des expérimentations, les cellules sont traitées trois jours après le jour de repiquage. En parallèle, l'ajmalicine (marqueur de la biosynthèse d'AIM) a été systématiquement dosée afin de contrôler l'effet des traitements sur la production alcaloïdique, et ce, après 7 jours de traitement.

#### II.1.3. Arrêt des cellules.

Au terme des traitements, les cellules sont récoltées par filtration sous vide sur toile à bluter (30  $\mu$ m). Pour l'extraction des ARN totaux, les cellules sont immédiatement plongées dans l'azote liquide, et conservées à -80°C.

## II.2. Extraction et purification des acides nucléiques.

### II.2.1. Extraction des ARN totaux.

Les ARN totaux sont extraits grâce au kit Nucleospin<sup>®</sup> RNA Plant (Macherey-Nagel) suivant le

protocole fourni par le fabricant. Les ARN élués dans un volume final de 40  $\mu\text{L}$  d'eau stérile sont dosés à 260 nm afin d'estimer leur concentration (1 unité  $\text{DO}_{260} = 40 \mu\text{g/mL}$ ).

### **II.2.2. Extraction d'ADN plasmidique.**

Pour certaines expérimentations nécessitant des plasmides bien purifiés, les plasmides sont extraits grâce au kit Nucleospin<sup>®</sup> plasmid (Macherey-Nagel) suivant les préconisations du fournisseur. L'ADN plasmidique élué dans un volume final de 50  $\mu\text{L}$  d'eau stérile est dosé à 260 nm afin d'estimer sa concentration (1 unité  $\text{DO}_{260} = 50 \mu\text{g/mL}$ ).

### **II.2.3. Purification d'ADN digéré ou amplifié par PCR.**

Suite à l'analyse sur gel d'agarose, les produits de digestion (après excision de la bande d'intérêt) et les produits d'amplification sont purifiés grâce au kit Nucleospin<sup>®</sup> Extract II (Macherey-Nagel) suivant le protocole recommandé par le fournisseur.

## **II.3. Analyse transcriptionnelle par RT-PCR quantitative de *MAPK1* et *ERF1*.**

La PCR quantitative en temps réel est utilisée pour quantifier le nombre de copies d'un gène présent initialement dans un échantillon. Cette technique repose sur le suivi de la formation d'un produit PCR au cours du temps *via* l'émission de fluorescence. Pour chaque échantillon, le cycle à partir duquel le signal se distingue du bruit de fond est considéré comme le cycle seuil (ou threshold cycle (Ct)). Les valeurs de Ct obtenues permettent de quantifier, de manière relative (en fonction d'un gène témoin) ou absolue (en fonction d'une courbe de calibration), l'expression du gène étudié. La technologie utilisée au laboratoire est celle du SYBR-Green<sup>®</sup> qui est un agent intercalant et un fluorochrome spécifique de l'ADN double brin.

### **II.3.1. Traitement des ARN à la désoxyribonucléase I (DNase I).**

Le traitement avec une désoxyribonucléase (RQ1-DNase ; Promega) est appliqué afin d'éliminer d'éventuelles contaminations des ARN par de l'ADN génomique. Le mélange réactionnel, d'un volume final de 10  $\mu\text{L}$ , comprend un volume défini d'ARN correspondant à 2  $\mu\text{g}$  d'ARN totaux (volumes différents suivant les échantillons et leur concentration), 1  $\mu\text{L}$  de tampon RQ1 DNase 10x, et un volume défini de RQ1 DNase (1U/ $\mu\text{g}$  d'ARN) . Ce mélange est incubé 30 minutes à 37°C. La réaction est arrêtée par l'ajout de 1  $\mu\text{L}$  de RQ1 DNase solution stop. La DNase est finalement inactivée à 65 °C pendant 10 minutes.

### **II.3.2. Transcription inverse des ARN.**

Les 2  $\mu\text{g}$  d'ARN traités à la DNase sont incubés 5 minutes à 70°C en présence de 1,5  $\mu\text{M}$  d'amorce APbis (complémentaire de la queue polyA des ARNm) (Tableau 2), puis placés en glace. La synthèse d'ADNc est réalisée dans un volume final de 25  $\mu\text{L}$  en présence de 2,5 mM de dNTP, 200U de M-MLV Reverse-transcriptase, RNase H Minus, Point Mutant (Promega) et 5  $\mu\text{L}$  de tampon 10X. La réaction se déroule suivant le cycle : 10 minutes à 25°C, 50 minutes à 50°C, puis 15

minutes à 70°C.

**Tableau I. Récapitulatif des amorces utilisées au cours du stage.**

Code couleurs : **Criblage de clones** ; **RT-PCR quantitative** ; **Clonage** ; Transcription Inverse.

Nom de l'amorce	Séquence (5'>>>3')	Température de fusion en °C
SP6	ATTTAGGTGACACTATAG	46,9
T7	GTAATACGACTCACTATAGGGCA	56
T3	AATTAACCCCTCACTAAAGGGAACA	55
35S-Forward	GGAAGGTGGCTCCTACAAATGC	57
qERF1-Down	ACAAACCAAACGGCGTCCATC	59,8
qERF1-Up	TGGGGAGATTTGCCATTGAAG	60,6
qMAPK25-Up	ATAGACAAAATGCTTACATTT	50,8
qMAPK25-Down	TGGTTCTGAACATACTGGTTC	58,6
qRps9-Up	TTACAAGTCCCTTCGGTGGT	60,4
qRps9-Down	TGCTTATTCTTCATCTCTTCATC	59,4
MAPK1up-SpeI	ATACTAGTATGGTTGATGCAAATATGGCC	62,4
MAPK1down-SpeI	ATACTAGTTGCATATTCTGGATTAGAGC	61
ERF1Up-SpeI	ATACTAGTATGATGAATCAACCTGTGTTC	61
ERF1Down-SpeI	ATACTAGTGCTTACCAACAACCTGCTCGC	65,1
AUAP	GGCCACGCGTCGACTAGTAC	56
APbis	GGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTT	56

### II.3.3. RT-PCR quantitative.

Chaque réaction est réalisée en plaque 96 puits (MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate- Applied Biosystems) dans un volume final de 25 µL, à raison de 3 répétitions par échantillon. Le mélange réactionnel contient 1 µL d'ADNc, 0,3 µM d'amorces sens et antisens (Tableau I) et 12,5 µl de SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). L'appareil utilisé est l'ABI-PRISM® 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) situé sur la plateforme PPF Analyse des Systèmes Biologiques, Site de Grandmont, Tours. La PCR débute par une étape de 10 minutes à 95°C (activation de l'ADN polymérase), suivie de 40 cycles de 20 secondes à 95°C et 40 secondes à 60°C. A la fin de chaque PCR, une courbe de fusion/dissociation est systématiquement établie pour vérifier la spécificité de l'amplification (présence d'un seul produit). Les valeurs de Ct obtenues après acquisition de fluorescence sont converties en nombre de copies d'ADN correspondant à chaque gène étudié. Afin de corriger les éventuelles différences de quantités d'ADNc entre les échantillons à analyser, les valeurs sont normalisées en effectuant le rapport du nombre de copies du gène d'intérêt sur le nombre de copies du gène contrôle. *RPS9* est utilisé en tant que gène contrôle ou encore dit gène de ménage, dont l'expression est constitutive. Il code pour une partie de la sous-unité ribosomale 40S.



Remarque : les courbes de calibration pour chacun des gènes (*MAPK1*, *ERF1* et *RPS9*) étaient établies avant mon arrivée au laboratoire.

## **II.4. Réactions de polymérisation en chaîne (PCR).**

### **II.4.1. Amplification des extrémités 3' et 5' de *ERF1*.**

L'extrémité 5' de *ERF1* a été isolée à partir d'une banque d'ADNc disponible au laboratoire et réalisée à partir d'ARN extraits de cellules traitées au MeJa. L'extrémité 3' a été isolée à partir d'ADNc issus d'ARN extraits de cellules traitées à l'éthylène. Les PCR sont réalisées avec 1  $\mu$ L d'ADNc ou de banque dans un volume final de 25  $\mu$ L contenant 1 mM de  $MgCl_2$ , 0,3 mM de dNTP, 0,75 U de GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega), 0,4  $\mu$ M d'amorces sens et antisens et 5  $\mu$ L de Tampon 5X. Les couples d'amorces utilisés sont T3/*ERF1*down et T3/*ERF1*ter-down pour l'extrémité 5' (T3, présente sur le vecteur utilisé pour la banque) et *ERF1*bis-up/AUAP (AUAP, complémentaire de l'amorce AP utilisée lors de la transcription inverse). L'amplification est réalisée selon le programme suivant : 2 min (ADNc) ou 5 min (banque) à 94°C, puis 35 cycles de 30 sec à 94°C, 30 sec à 55°C-60°C (dépend du T<sub>m</sub> des amorces), 1 min à 72°C, suivis de 5 min à 72°C. Les produits de PCR sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose, puis clonés.

### **II.4.2. Amplification des inserts pour les clonages en vecteurs d'expression.**

Pour les clonages en vecteurs d'expression (pSCA-YFP et vecteurs BiFC), les inserts sont amplifiés avec une DNA Polymerase Haute Fidélité. Le volume réactionnel (25  $\mu$ L) contient 1  $\mu$ L de matrice ADNc, 0,3  $\mu$ M d'amorces sens et antisens, 0,3 mM de dNTP, 1,5 mM de  $MgSO_4$ , 2,5  $\mu$ L de tampon 10X et 1,25 U de *Pfu* DNA Polymerase (Promega). Les amorces ont été conçues de façon à ajouter un site de restriction (*SpeI* pour pSCA-YFP et les vecteurs BiFC) en 5' et 3' de l'ADN à amplifier pour permettre de cloner les inserts dans les vecteurs d'expression, tout en maintenant le cadre de lecture en phase. L'amplification est réalisée selon le programme suivant : 2 min à 94°C, puis 35 cycles de 30 sec à 94°C, 30 sec à 55°C-60°C (dépend du T<sub>m</sub> des amorces), 2-3 min à 74°C (le temps dépend de la taille du fragment à amplifier), suivis de 5 min à 74°C. Les produits de PCR sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose, puis clonés.

### **II.4.3. Vérification de la présence d'un insert dans les clones recombinants.**

Ces amplifications sont réalisées à partir de colonies bactériennes pour sélectionner les clones recombinants après clonage. Le volume réactionnel (25  $\mu$ L) contient 0,2 mM de dNTP, 1 mM de  $MgCl_2$ , 0,75 U de GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega), 0,2  $\mu$ M d'amorces sens et antisens et 5  $\mu$ L de Tampon 5X. Pour la vérification des clones avec pGEM-T Easy, les amorces universelles SP6 et T7 sont utilisées. Pour les clones avec vecteurs d'expression, une amorce sur le vecteur et une amorce spécifique de l'insert sont utilisées afin de vérifier à la fois la présence de l'insert et son sens d'insertion. Pour les clones avec vecteur pSCA-YFP, l'amorce sur le vecteur est 35S-For (Tableau I).

L'amplification est réalisée selon le programme suivant : 5 min à 94°C, puis 35 cycles d'une programmation adaptable en fonction du vecteur utilisé et de la taille de l'insert cloné : 30 sec à 94°C, 30 sec à 55°C, 2-4 min à 72°C, suivis de 5 min à 72°C. Les produits de PCR sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose.

## **II.5. Analyses des acides nucléiques.**

### **II.5.1. Vérification de la présence d'un insert.**

Une digestion est systématiquement réalisée soit pour vérifier la présence de l'insert, soit pour libérer le fragment en vue de le sous-cloner en vecteur d'expression. Les digestions enzymatiques sont réalisées avec 1 µg d'ADN plasmidique et 5 unités d'endonucléase de restriction dans un volume final de 20 à 50 µl pendant 2 à 4 heures à 37 °C. Les produits de digestion sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 1%.

### **II.5.2. Electrophorèse sur gel d'agarose.**

La détermination de la taille, de la quantité, de la pureté d'un fragment d'ADN ainsi que la séparation de plusieurs fragments d'ADN sont réalisées par électrophorèse dans un tampon TAE 0,5X (Tris-acétate 0,02 M, EDTA 0,5 mM) sur gel d'agarose de 0,8 à 1,5% (m/v) en présence de bromure d'éthidium (0,4 µg/ml). Les fragments d'ADN sont ensuite visualisés sous UV.

### **II.5.3. Séquençage et analyse bioinformatique.**

Les extrémités 5' et 3' d'*ERF1* sont séquencées par la société GATC Biotech à partir des plasmides pGEM-T recombinants purifiés. L'analyse de la séquence protéique de ERF1 est faite sur le ExPASy Proteomics Server (<http://expasy.org/cgi-bin/prosite/PSScan.cgi>), les séquences prédictives d'adressage sont trouvées grâce au site <http://wolfpsort.org/>.

## **II.6. Clonages des fragments ADN.**

### **II.6.1. A-tailing.**

Afin de cloner les fragments d'ADN amplifiés dans le vecteur pGEM-T, il est nécessaire d'ajouter à leurs extrémités des adénines 3' débordantes. Dans un volume de 10 µl, 2 à 5 µl de produit PCR purifié sont incubés en présence de 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,15 mM d'ATP et 5 U de GoTaq® ADN Polymérase pendant 30 min à 72°C. Les fragments sont ensuite utilisés directement pour la ligation.

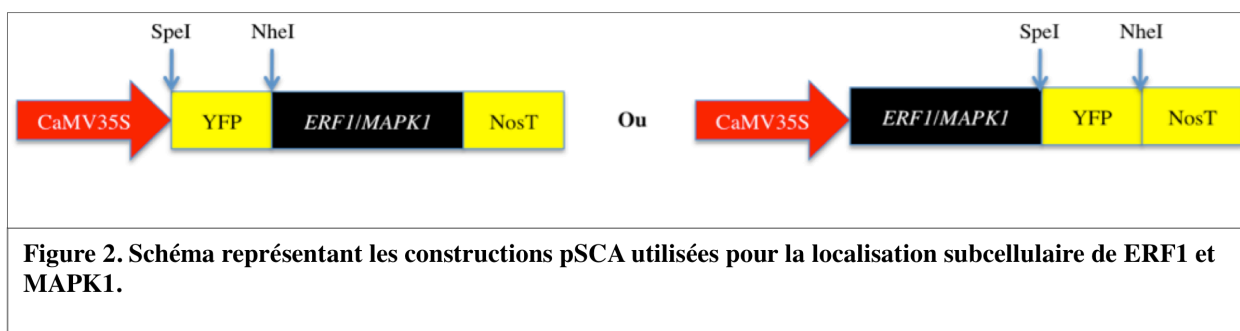
### **II.6.2. Ligation des fragments dans le vecteur pGEM-T.**

Tous les fragments d'ADN étudiés sont au préalable clonés dans le pGEM-T. Les séquences sont ensuite sous-clonées dans les vecteurs d'expression. La réaction de déroule dans un volume

finale de 5 µl avec : Buffer T4 ligase 1X, 1,5 µl d'insert purifié, 1 µl de pGEM-T, 1 U de T4 DNA Ligase (Promega). La ligation s'effectue durant une nuit à 4°C. La transformation est décrite dans la partie II.7.

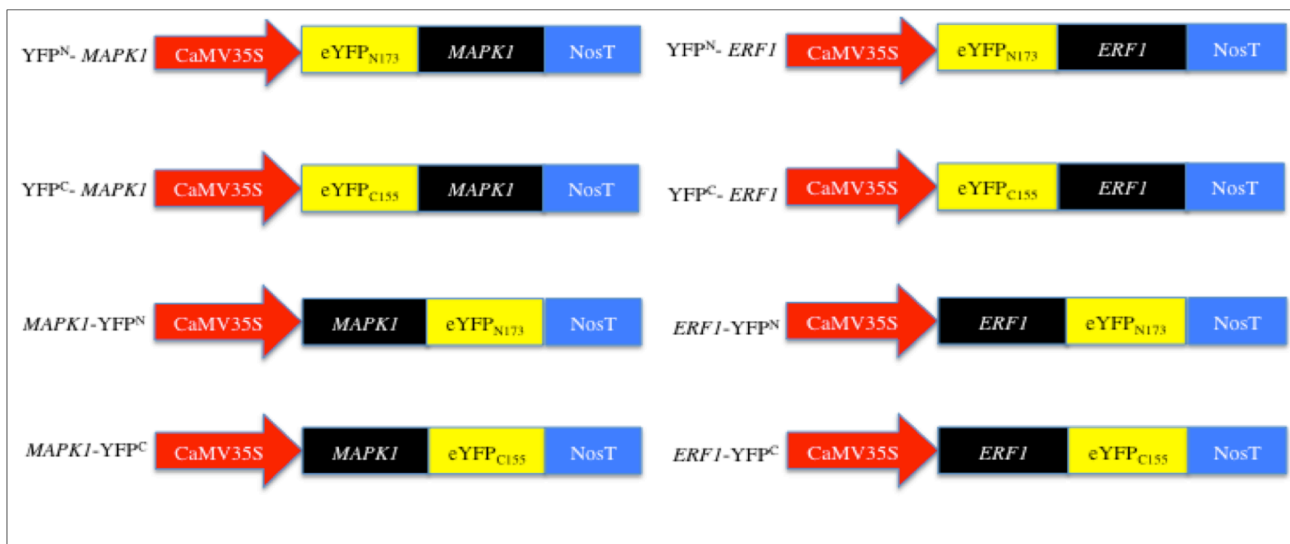
### II.6.3. Clonage en vecteur de localisation pSCA-YFP.

Les deux séquences sont insérées dans le vecteur pSCA-YFP permettant l'expression d'une protéine de fusion à la YFP. Le vecteur pSCA-YFP, développé au laboratoire, présente une ossature de plasmide pSC-A (Stratagène®) dans lequel une cassette d'expression de la YFP a été clonée (G. Guirimand *et al.*, 2009). Dans cette cassette d'expression, la séquence codant la YFP est sous le contrôle du promoteur constitutif CaMV35S et d'un terminateur NOS (Fig. 2). Les vecteurs linéarisés par SpeI sont déphosphorylés en leur extrémité 5' par la TSAP (Promega), circularisation des vecteurs linéarisés, nous déphosphorylons les extrémités 5' grâce à la TSAP (Promega), suivant le protocole recommandé par le fournisseur. La ligation s'effectue selon plusieurs ratio, dans un volume de 10 µl selon le protocole suivant : 1 µl de buffer 10X et 1U de T4 DNA Ligase, placé 16°C pendant une nuit.



### II.6.4. Clonage en vecteurs de BiFC.

La BiFC permet de visualiser des interactions protéiques dans des cellules vivantes. Le principe consiste en un clonage des fragments codant les protéines d'intérêt en aval et en amont de la séquence codant la partie N-terminale ou C-terminale de la YFP. Si les protéines interagissent, elles peuvent faciliter l'association des fragments de fluorophore pour produire un complexe fluorescent. Nous sommes forcés d'insérer les séquences d'intérêt en aval et en amont de chaque fragment de fluorophore car ce fragment peut empêcher l'interaction potentielle entre les protéines (Waadt *et al.*, 2008). L'expression de la séquence codante de la protéine de fusion à la demi-YFP est sous le contrôle du promoteur constitutif CaMV35S et d'un terminateur NOS (Fig. 3). La ligation s'effectue comme en II.6.3.



**Figure 3. Représentation des huit constructions utilisées pour la mesure d'interaction protéine-protéine par reconstitution de fluorophore.**

## II.7. Transformation bactérienne.

Pour chaque transformation, la totalité du produit de ligation est ajoutée à 50 µl de bactéries thermo-compétentes, avant incubation en glace pendant 15 minutes. Un choc thermique est réalisé pendant 45 secondes à 42°C, les tubes sont ensuite rapidement replacés en glace. Les bactéries transformées sont régénérées dans 450 µl de LB liquide pendant 1 heure à 37°C, 180 rpm. A l'issue de la régénération, 100 µl de bactérie sont étalés sur milieu sélectif LBamp100 pour les transformants avec pSCA-YFP et avec vecteurs BiFC. Pour extraire les plasmides recombinants, une colonie est repiquée en milieu liquide de Luria-Bertani (Tryptone 1% (m/v); NaCl 1% (m/v); extrait de levure 0,5% (m/v); agar 1% (m/v); NaOH 10 M pH 7,2) avec un antibiotique de sélection.

## II.8. Localisation sub-cellulaire et mesure d'interaction protéine-protéine par reconstitution de fluorophore (BiFC).

### II.8.1. Préparation des tapis cellulaires.

Trois jours après repiquage en milieu liquide sans 2,4-D, 4 ml de culture est déposé de manière homogène sur du papier Whatman stérile (cat No.1001917) puis filtré sous vide partiel. Le tapis ainsi constitué est déposé sur milieu gélosé (Gamborg B5) supplémenté d'une auxine de synthèse (NAA, 10 µM) et de céfotaxime (200 µg/ml), et cultivé à 25°C dans l'obscurité totale pendant 48H avant les tirs.

### II.8.2. Précipitation des constructions plasmidiques sur les particules d'or.

Selon le protocole définie par G. Guirimand *et al.* (2009), 800 ng des plasmides pSCA::*ERF1* (*ERF1*-YFP et YFP-*ERF1*) et pSCA::*MAPK1* (*MAPK1*-YFP et YFP-*MAPK1*) sont précipités sur 500 µg de billes d'or glycérolées (1 µm, Bio-Rad). Pour la BiFC, seulement 100 ng de chaque

construction sera co-transformée. La quantité exogène d'ADN apportée est amoindrie dans le but de diminuer la probabilité d'observer des interactions protéiques artéfactuelles.

### **II.8.3. Bombardement des cellules.**

La transformation transitoire des cellules est effectuée par bombardement de microbilles à l'aide du canon à particule PDS-1000/He Biolistic (Bio-Rad) suivant la méthode définie par Guirimand *et al.* (2009).

### **II.8.4. Observation au microscope à épifluorescence.**

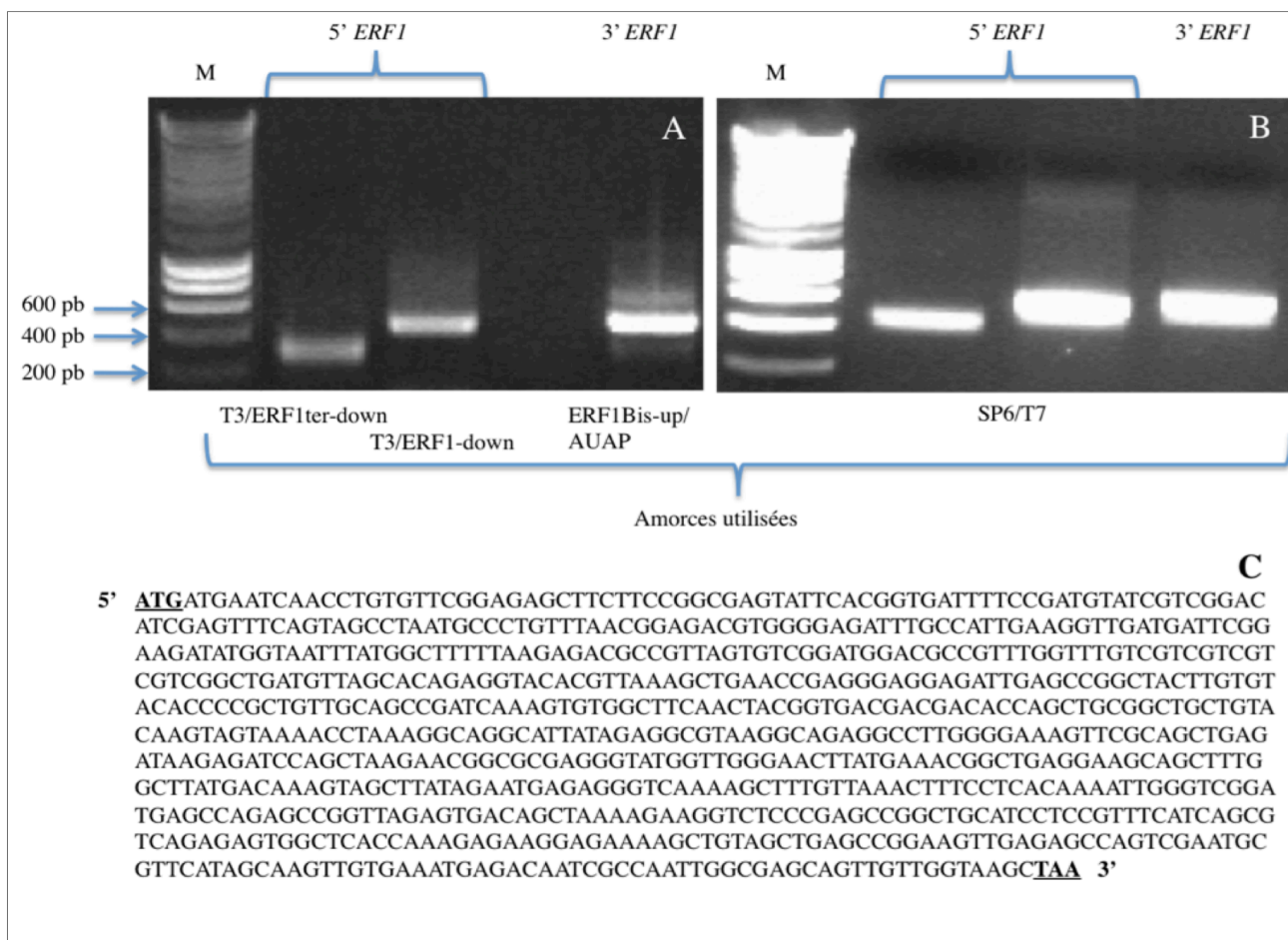
Les cellules de *C. roseus* transformées sont observées 12h après transformation, à l'aide d'un microscope à épifluorescence (OLYMPUS® BX51) muni d'une caméra numérique OLYMPUS® DP71, d'un logiciel OLYMPUS® de capture et d'analyse d'image Cell<sup>D</sup> et de cubes de fluorescence dédiés à l'observation des différents fluorochromes: le cube JP2 (Chroma#31040, filtre d'excitation 500-520 nm, filtre d'émission à bande passante 540-580 nm) pour l'observation de la YFP et le cube cyan GFP (CFP) (Chroma#31044v2, filtre d'excitation 426-446 nm, filtre d'émission à bande passante 460-500 nm) pour l'observation de la CFP. Pour les localisations subcellulaires des protéines et les études d'interactions par BiFC, les cellules sont montées entre lame et lamelle dans le milieu Gamborg B5 et observées au grossissement  $\times 40$ . A chaque fois, l'observation en épifluorescence est suivie d'une observation en contraste interférentiel permettant d'obtenir une vision morphologique des cellules en champ clair. La capture et le traitement des images numériques (séparation des canaux de couleur des images d'une même cellule pour différents fluorochromes et combinaison en une image recomposée) sont réalisés à l'aide du logiciel Cell<sup>D</sup>. Ainsi, les signaux YFP sont traités dans le canal vert et les signaux CFP sont traités dans le canal rouge. Lors de la combinaison d'un signal YFP et CFP en une même image, la couleur jaune permet de définir les zones de co-localisation des deux signaux initiaux. Les patrons de fluorescence présentés sont représentatifs de plusieurs dizaines de cellules observées.

## **III. Résultats.**

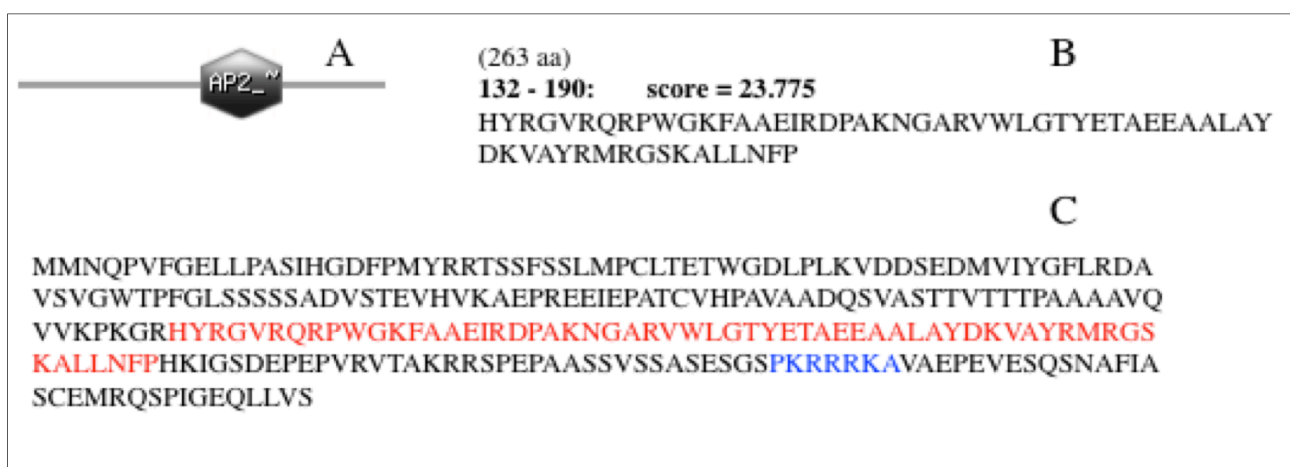
### **III.1. Isolement de l'ADNc pleine longueur de *ERF1*.**

Seul un fragment partiel de *ERF1* ayant été isolé au laboratoire, nous avons entrepris d'isoler l'ADNc pleine longueur codant pour ERF1 en amplifiant les extrêmités 5' et 3'. L'analyse par électrophorèse des fragments amplifiés révèle la présence d'une bande spécifique pour chacun des couples d'amorces testés (Fig. 4A). Chaque fragment a été cloné et l'insertion a été vérifiée par PCR avec les amorces universelles SP6 /T7 (Fig. 4B). Le séquençage des fragments a permis de révéler un ADNc composé de 792 paires de bases (Fig. 4C), correspondant à une protéine de 263 acides aminés (Fig. 5C). Le traitement *in silico* de la séquence protéique par révèle un potentiel domaine de liaison

à l'ADN de type AP2/ERF (Apetala 2/ Ethylene Response Factor) entre les acides aminés 132 à 190 (Fig. 5A et 5B). Le traitement *in silico* de la séquence protéique par le logiciel de prédiction de localisation sub-cellulaire révèle une séquence potentielle d'adressage au noyau (Fig. 5C).



**Figure 4. Isolement de l'ADNc pleine longueur de *ERF1*.** (A) Amplification des extrémités 5' et 3' de *ERF1* respectivement sur une banque d'ADNc et sur une matrice ADNc issus de cellules traitées à l'éthylène. (B) Vérification par PCR des plasmides recombinants pour les extrémités 5' et 3'. (C) Séquence nucléotidique de l'ADNc pleine longueur de *ERF1*.



**Figure 5. L'ADNc isolé code pour un facteur de réponse à l'éthylène comportant un domaine potentiel de liaison à l'ADN de type AP2/ERF et une séquence prédictive d'adressage au noyau.** (A), Représentation schématique de *ERF1* et son domaine de liaison à l'ADN. (B) Séquence et positionnement du domaine AP2/ERF de *ERF1*. (C), Séquence protéique de *ERF1* avec la séquence de liaison à l'ADN en rouge et la séquence NLS SV40-like d'adressage au noyau en bleu.

### III.2. Caractérisation transcriptionnelle de *ERF1* et *MAPK1* : effet des hormones éthylène, méthyljasmonate et cytokinines.

L'objectif de cette partie est de mesurer l'expression des gènes codant pour *ERF1* et *MAPK1* en fonction de divers signaux hormonaux connus pour induire la production alcaloïdique chez *C. roseus*. Des cinétiques d'expression de *ERF1* et *MAPK1* ont été mises en place aux temps 15 min, 30 min, 1h et 2h de traitement. Des dosages d'ajmalicine ont été réalisés en parallèle afin de s'assurer de l'effet stimulateur de chaque traitement sur la production d'AIM au moment des expérimentations (résultats non présentés).

#### III.2.1. Mesure de l'expression de *ERF1*.

Les cinétiques d'expression de *ERF1* après un traitement avec l'éthylène ou avec le méthyljasmonate présentent un profil quasi-identique (Fig. 6A et 6B). Après 15 et 30 minutes de traitement, l'expression de *ERF1* semble ne pas varier de façon significative par rapport au temps T0. C'est après 1 heure de traitement qu'une forte induction de l'expression de *ERF1* est nettement observée et ce, d'autant plus avec l'éthylène (expression relative égale à 0,08) comparé au traitement avec le méthyljasmonate (expression relative égale à 0,065). Cette forte induction est suivie d'une baisse de la transcription 2 heures après traitement. En revanche, les cytokinines semblent avoir peu d'effet sur la transcription de *ERF1* (Fig. 6C). Le maximum d'expression se situe à 1 heure de traitement (expression relative égale à 0,03), cependant il est nettement inférieur aux pics d'induction observés en conditions éthylène ou méthyljasmonate. Au vu de ces résultats, il apparaît nettement un effet stimulateur de l'éthylène et du méthyljasmonate sur l'expression de *ERF1*, suggérant ainsi son implication dans ces voies de signalisation chez *C. roseus*. La rapide diminution de la transcription de *ERF1* après 2 heures de traitement laisse supposer un rétrocontrôle négatif, comme le décrit la littérature (Yoo *et al.*, 2008).

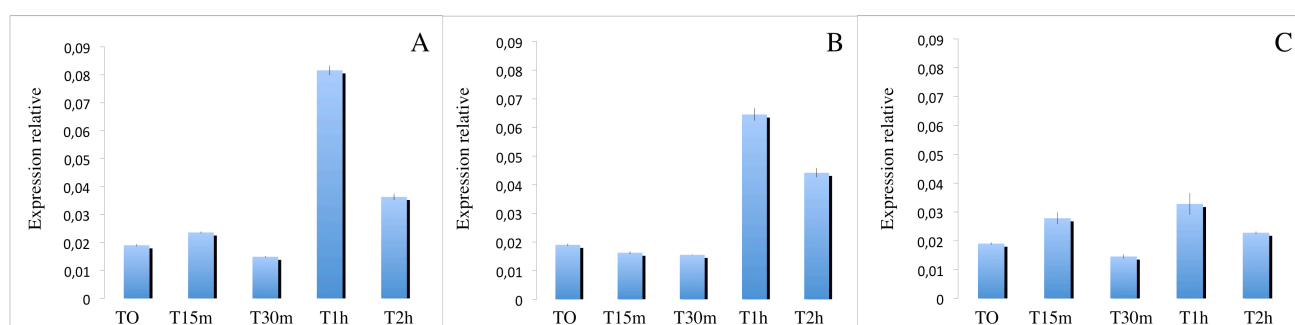


Figure 6. Suivi de l'expression de *ERF1* en fonction du temps de traitement à l'éthylène (A), au méthyl-jasmonate (B) et aux cytokinines (C) par RT-PCR quantitative. Après traitement, les cellules sont arrêtées selon la cinétique suivante: 15 minutes, 30 minutes, 1 heure, 2 heures (axe des abscisses). L'expression relative est donnée par le rapport du nombre de copies de *ERF1* sur le nombre de copies de *RPS9*. Les écarts-types calculés sont pour n=3.

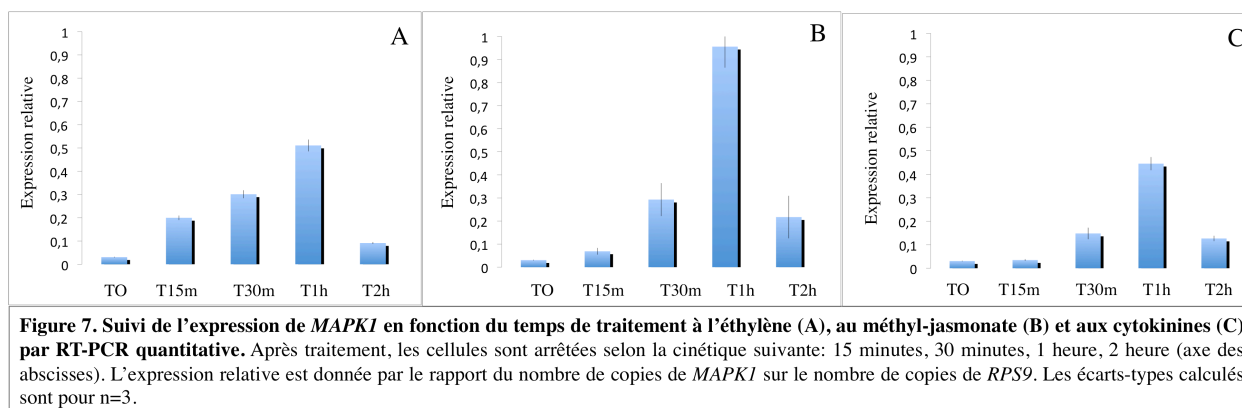
#### III.2.2. Mesure de l'expression de *MAPK1*.

D'après la figure 7A, l'expression de *MAPK1* est significativement induite dès la 15<sup>ème</sup> minute de traitement avec l'éthylène, pour atteindre son expression maximale après 1 heure de traitement. Après 2 heures de traitement, la transcription de *MAPK1* chute fortement. Ce profil d'expression est



également observé avec le méthyljasmonate (Fig. 7B). Concernant l'effet des cytokinines, *MAPK1* est induit après 30 minutes de traitement, pour atteindre son pic d'expression maximal après 1 heure de traitement (Fig. 7C). Après 2 heures, la transcription de *MAPK1* est fortement diminuée.

Au vu de ces résultats, il apparaît nettement un effet stimulateur des trois signaux hormonaux sur l'expression de *MAPK1*, suggérant ainsi son implication dans ces voies de signalisation chez *C. roseus*. De plus, la rapide diminution de la transcription de *MAPK1* après 2 heures de traitement laisse supposer un rétrocontrôle négatif, comme c'est le cas pour *ERF1*.



La comparaison des taux d'expression à 1 heure de traitement révèle une stimulation plus importante de *MAPK1* en présence de méthyljasmonate (expression relative égale à 0,9) par rapport aux inductions observées en présence d'éthylène (expression relative égale à 0,5) ou en présence de cytokinines (expression relative égale à 0,4).

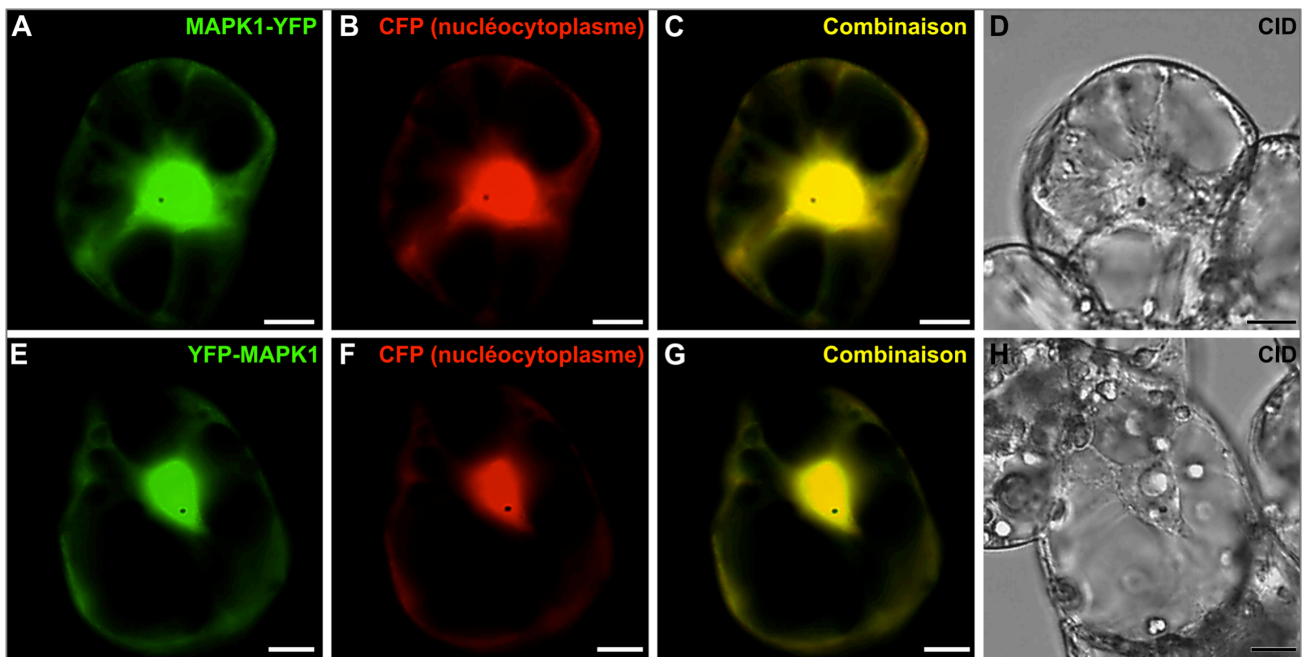
### III.3. Localisation sub-cellulaire de *ERF1* et *MAPK1*.

L'objectif de cette partie est de localiser à l'échelle sub-cellulaire les protéines *MAPK1* et *ERF1* chez *C. roseus*. L'ADNc correspondant a été cloné en amont ou en aval de la séquence codant la YFP, afin d'obtenir des protéines de fusion fluorescentes : *MAPK1/ERF1*-YFP et YFP-*MAPK1/ERF1*. Ces deux constructions permettent de vérifier que l'orientation de cette fusion n'a aucune influence sur la localisation de la fluorescence. Les cellules sont co-transformées transitoirement, par biolistique, avec l'une des deux constructions plasmidiques et une construction exprimant un marqueur protéique de compartiments subcellulaires en fusion avec la CFP.

#### III.3.1. Localisation sub-cellulaire de *MAPK1*.

L'observation des cellules, 12 heures après transformation, par microscopie à épifluorescence, montre une co-localisation nucléocytoplasmique de la fluorescence (Fig. 8C, G) issue des protéines de fusion *MAPK1*-YFP (Fig. 8A) et YFP-*MAPK1* (Fig. 8E) avec la fluorescence issue du marqueur nucléocytoplasmique CFP (Fig. 8B, F). En conclusion, ces résultats montrent que *MAPK1* est localisée au niveau de deux compartiments : le cytoplasme et le noyau. Il est à noter que la position d'insertion de *MAPK1* par rapport à la YFP n'affecte pas la localisation de la protéine.





**Figure 8. Profil de co-expression transitoire de la protéine MAPK1 fusionnée en N-terminale (A, B, C) ou C-terminale (E, F, G) de la YFP et du marqueur CFP-nucléocytoplasmique dans les cellules transformées de *C. roseus*.** La combinaison des signaux YFP (A, E) et CFP (B, F) apparaît en jaune (C, G). La morphologie générale de la cellule est observée par Contraste Interférentiel Différentiel (C.I.D., D, H). Ici, MAPK1 est localisée dans le noyau et le cytoplasme. Barre d'échelle: 10  $\mu$ m (A-H).

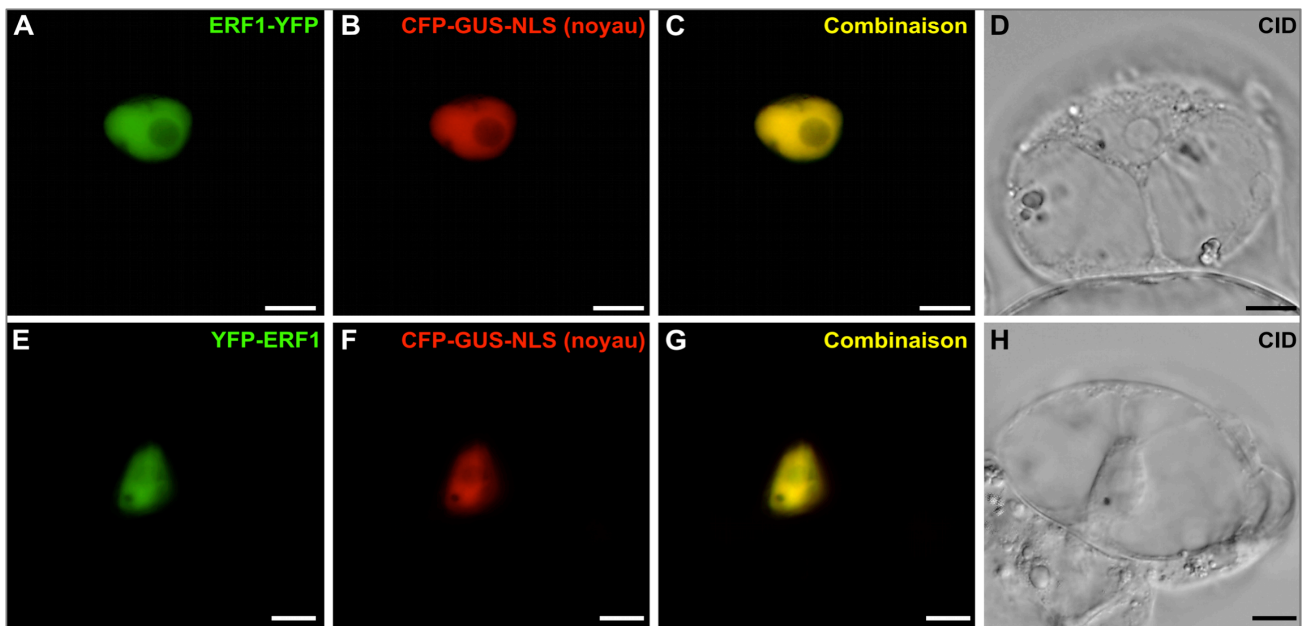
### III.3.2. Localisation sub-cellulaire de ERF1.

L'analyse des cellules, 12 heures après transformation, par microscopie à épifluorescence, montre une co-localisation nucléaire de la fluorescence (Fig. 9C, G) issue des protéines de fusion ERF1-YFP (Fig. 9A) et YFP-ERF1 (Fig. 9E) avec la fluorescence issue du marqueur nucléaire CFP-GUS-NLS (Fig. 9B, F). En conclusion, ces résultats montrent que ERF1 est strictement localisé au niveau du noyau, ce qui est cohérent avec l'hypothèse selon laquelle ERF1 est un facteur de transcription. De plus, cette localisation est en accord avec la prédiction de la séquence d'adressage au noyau (séquence NLS) (Fig. 5). De même que pour MAPK1, la position d'insertion de ERF1 par rapport à la YFP n'affecte pas la localisation de la protéine.

## III.4. Mesure d'interaction protéine-protéine par reconstitution de fluorophore (BiFC).

### III.4.1. Suivi de la formation d'homo-oligomères.

Les informations analysées ont pour objectif d'étudier la capacité de ERF1 ou MAPK1 à former des homo-oligomères. Les résultats permettront d'envisager des hypothèses quant à leur mode de fonctionnement dans la voie de signalisation étudiée.



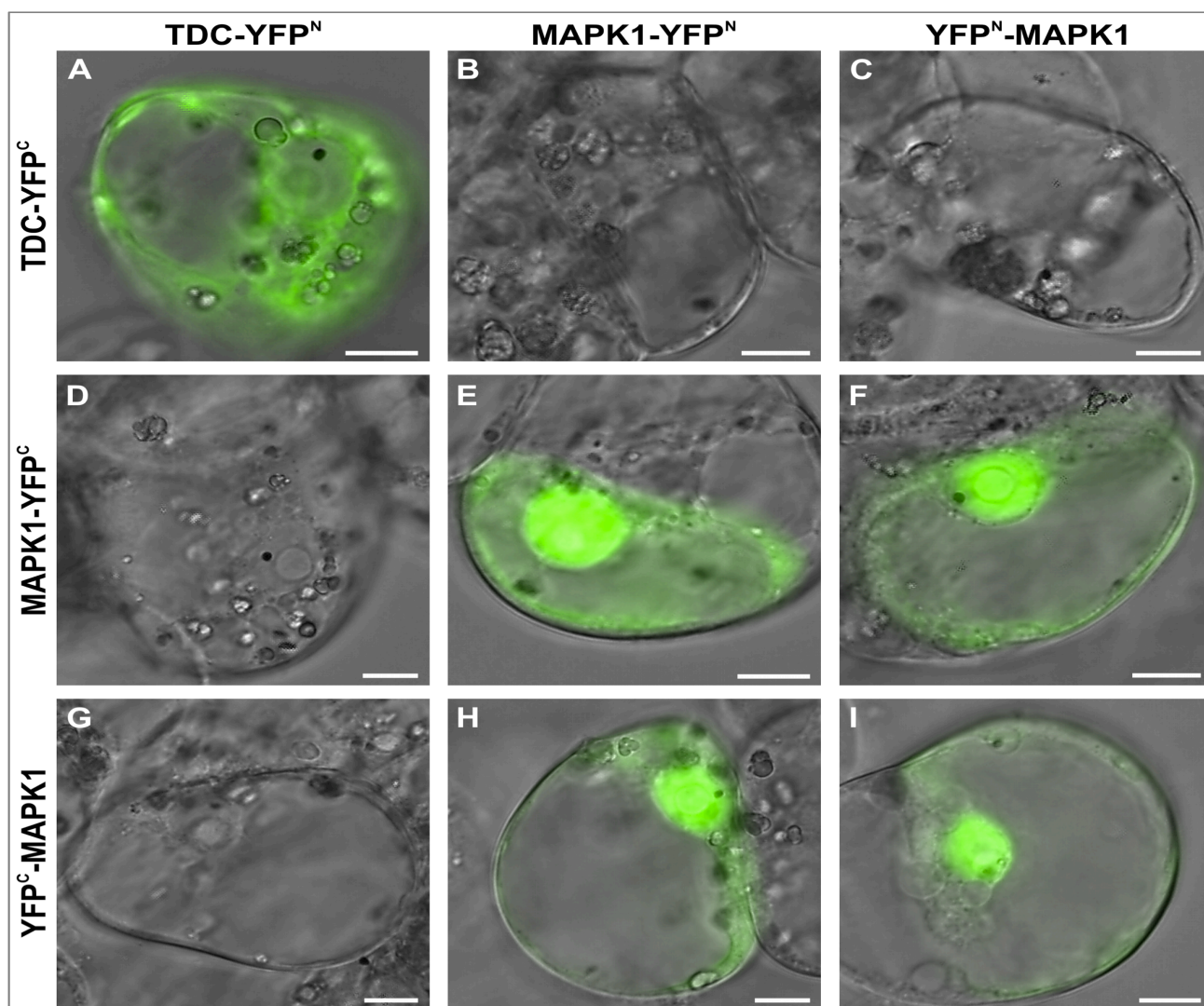
**Figure 9. Profil de co-expression transitoire de la protéine ERF1 fusionnée en N-terminale (A, B, C) ou C-terminale (E, F, G) de la YFP et du marqueur CFP-nucléocytoslique dans les cellules transformées de *C. roseus*. La combinaison des signaux YFP (A, E) et CFP (B, F) apparaît en jaune (C, G). La morphologie générale de la cellule est observée par Contraste Interférentiel Différentiel (C.I.D., D, H). Ici, ERF1 est localisée dans le noyau. Barre d'échelle: 10  $\mu$ m (A-H).**

L'ADNc correspondant a été cloné en amont ou en aval de la séquence codant la demi-YFP (partie N-terminale YFP<sup>N</sup> ou C-terminale YFP<sup>C</sup>) afin de générer des protéines de fusion MAPK1/ERF1-YFP<sup>N</sup>, MAPK1/ERF1-YFP<sup>C</sup>, YFP<sup>N</sup>-MAPK1/ERF1 et YFP<sup>C</sup>-MAPK1/ERF1. Ces différentes constructions (orientation de la fusion en amont ou en aval de YFP<sup>N/C</sup>) permettent de mettre en évidence l'impact éventuel d'une certaine conformation de la protéine sur la formation d'oligomères. Les transformations sont systématiquement réalisées avec une construction exprimant un marqueur protéique de compartiments subcellulaires en fusion avec la CFP.

#### III.4.1.1. Suivi de la formation d'homo-oligomères de MAPK1.

Le contrôle positif de formation d'homo-oligomères est obtenu par double transformation de la TDC-YFP<sup>N</sup> avec TDC-YFP<sup>C</sup> (Fig. 10A). La TDC correspond à la Tryptophane Décarboxylase, enzyme impliquée dans la voie de biosynthèse des alcaloïdes chez *C. roseus*. Les contrôles négatifs sont représentés par les doubles transformations des constructions BiFC-MAPK1 et TDC-YFP<sup>N/C</sup>, qui ne révèlent aucun signal, témoignant ainsi de la non-interaction de MAPK1 avec la TDC (Fig. 10B, C, D, G). Les figures 10E, F, H, I, indiquent les combinaisons et les analyses des co-transformations des différents vecteurs BiFC-MAPK1. Les résultats révèlent une reconstitution de la fluorescence (YFP complète) à la fois dans le noyau et dans le cytosol, et ceci pour les quatre combinaisons testées. La reconstitution de la fluorescence ainsi observée témoigne de la formation d'oligomères de MAPK1. De plus, la position de la YFP<sup>N/C</sup> n'a pas eu d'effet potentiellement gênant sur la conformation de MAPK1 permettant ainsi la formation d'oligomères dans les quatre conditions.

Nous pouvons remarquer que la localisation nucléocytosolique des oligomères de MAPK1 est en accord avec la localisation nucléocytosolique de MAPK1 observée précédemment (Fig. 8).



**Figure 10. Mesure de la formation d'oligomères de MAPK1 par reconstitution du fluorophore YFP dans les cellules transformées de *C. roseus*.** Le témoin positif est réalisé par la co-transformation des vecteurs TDC-YFP<sup>N</sup> avec TDC-YFP<sup>C</sup> (A). Les témoins négatifs sont réalisés par la co-transformation des vecteurs TDC-YFP<sup>N/C</sup> avec les vecteurs BiFC-MAPK1. La formation d'homo-oligomères est mesurée grâce aux combinaisons indiquées en E, F, H, I. Sur les clichés, le signal émis par la YFP est superposé à l'image de la cellule en contraste interférentiel différentiel. Barre d'échelle: 10  $\mu$ m.

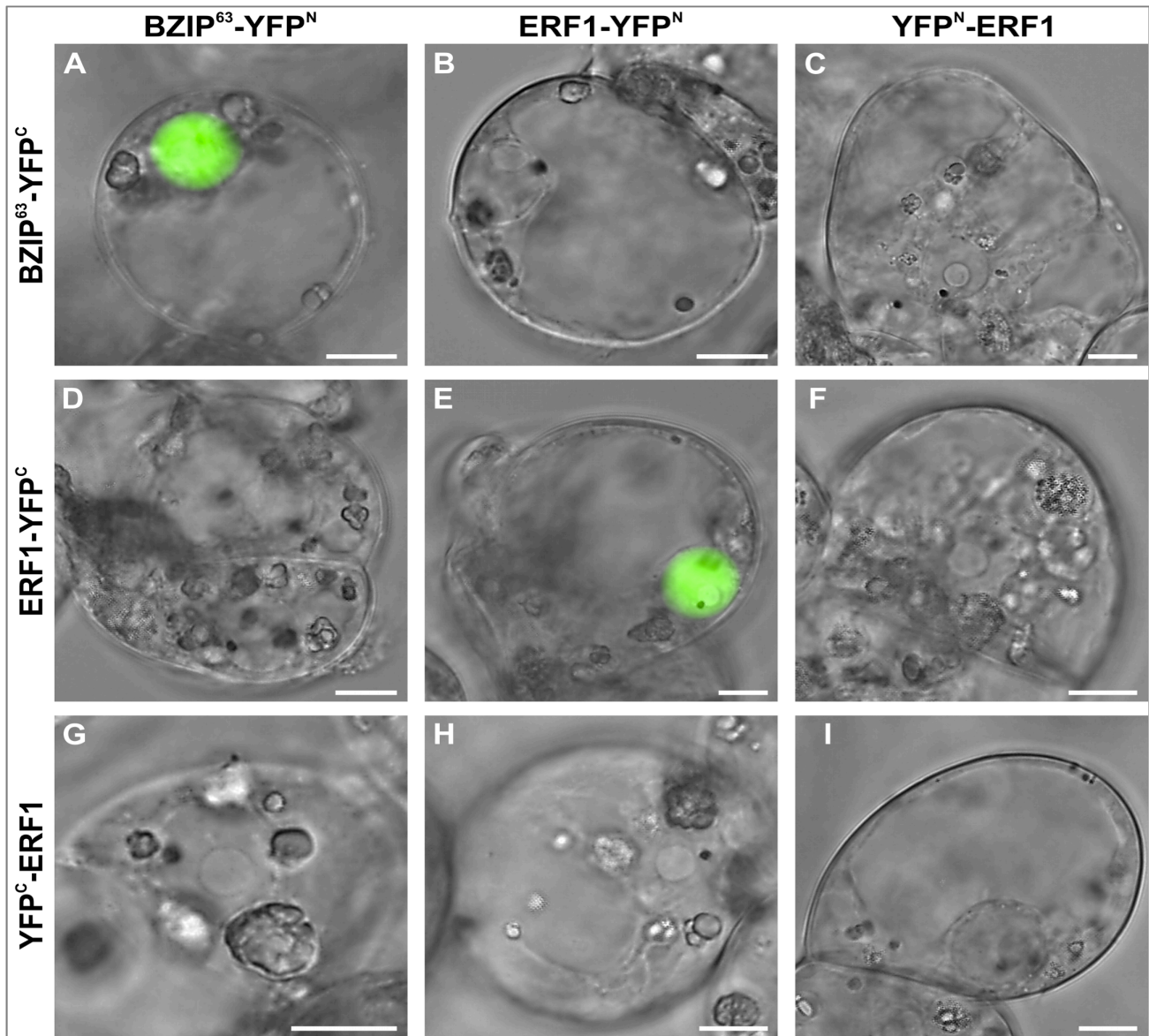
*Remarque : la visualisation de la fluorescence du marqueur CFP nucléocytoplasmique témoigne de l'efficacité des 9 co-transformations de cellules réalisées (résultats non présentés dans ce rapport).*

#### III.4.1.2. Suivi de la formation d'homo-oligomères de ERF1.

Le contrôle positif de formation d'homo-oligomères est obtenu par double transformation de BZIP<sup>63</sup>-YFP<sup>N</sup> avec BZIP<sup>63</sup>-YFP<sup>C</sup> (Fig. 11A). BZIP<sup>63</sup> est un facteur de transcription connu pour former un dimère spécifiquement dans le noyau (Walter *et al.*, 2004). Aucune interaction entre BZIP<sup>63</sup> et ERF1 n'est détectée (Fig. 11B, C, D, G) (contrôles négatifs). D'après la figure 11E, la reconstitution de la fluorescence traduit la formation d'homo-oligomères de ERF1 au niveau du noyau, pour la co-



transformation ERF-YFP<sup>N</sup> \* ERF-YFP<sup>C</sup>. C'est la seule combinaison pour laquelle la fluorescence est observée. En effet, aucun signal n'est détecté pour les trois autres combinaisons testées (Fig. 11F, H, I), suggérant la nécessité d'une conformation précise d'ERF1 pour former un oligomère. Nous pouvons remarquer que la localisation nucléaire des oligomères de ERF1 est en accord avec la localisation nucléaire de ERF1 observée précédemment (Fig. 9).



**Figure 11. Mesure de la formation d'oligomères de ERF1 par reconstitution du fluorophore YFP dans les cellules transformées de *C. roseus*.** Le témoin positif est réalisé par la co-transformation des vecteurs BZIP<sup>63</sup>-YFP<sup>N</sup> avec BZIP<sup>63</sup>-YFP<sup>C</sup> (A). Les témoins négatifs sont réalisés par la co-transformation des vecteurs BZIP-YFP<sup>N/C</sup> avec les vecteurs BiFC-ERF1. La formation d'homo-oligomères est mesurée grâce aux combinaisons indiquées en E, F, H, I. Sur les clichés, le signal émis par la YFP est superposé à l'image de la cellule en contraste interférentiel différentiel. Barre d'échelle: 10 µm.

*Remarque : la visualisation de la fluorescence du marqueur CFP nucléaire témoigne de l'efficacité des 9 co- transformations de cellules réalisées (résultats non présentés dans ce rapport).*

### III.4.2. Suivi de l'interaction entre ERF1 et MAPK1.

L'objectif est la mise en évidence d'une potentielle interaction physique entre MAPK1 et ERF1, ce qui permettrait de fortement soupçonner que ces deux protéines soient impliquées dans la même voie de signalisation, ERF1 se plaçant alors en substrat de MAPK1.

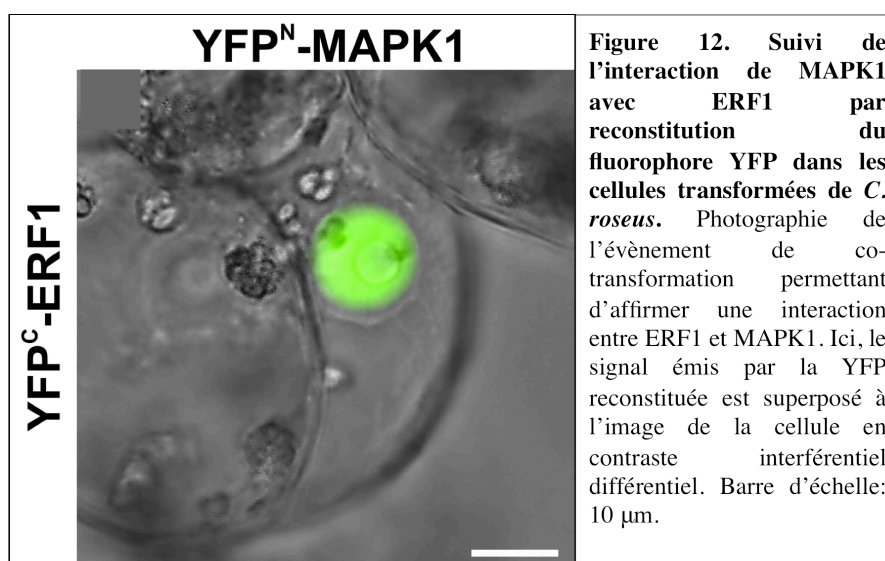
Les vecteurs BiFC-MAPK1/ERF1 utilisés pour les suivis de la formation d'homo-oligomères sont ceux utilisés également pour le suivi de l'interaction entre ERF1 et MAPK1.

Le tableau II présente les différentes combinaisons testées, ainsi que les résultats d'interaction. Tout d'abord, les témoins positifs de la manipulation (MAPK1-YFP<sup>N</sup> \* MAPK1-YFP<sup>C</sup> et ERF1-YFP<sup>N</sup> \* ERF1-YFP<sup>C</sup>) nous permettent de confirmer les formations d'oligomères de ERF1 et de MAPK1.

**Tableau II. Récapitulatif des combinaisons testées pour l'interaction de ERF1 avec MAPK1.**

— : interaction détectée ; — : interaction non-détectée ; ⊙ : Interaction non-testée ; T+ : témoin positif

	MAPK1-YFP <sup>N</sup>	MAPK1-YFP <sup>C</sup>	YFP <sup>N</sup> -MAPK1	YFP <sup>C</sup> -MAPK1	ERF1-YFP <sup>C</sup>
ERF1-YFP <sup>N</sup>	⊙	—	⊙	—	T+
ERF1-YFP <sup>C</sup>	—	⊙	—	⊙	⊙
YFP <sup>N</sup> -ERF1	⊙	⊙	⊙	—	⊙
YFP <sup>C</sup> -ERF1	—	⊙	—	⊙	⊙
MAPK1-YFP <sup>C</sup>	T+	⊙	⊙	⊙	⊙



En ce qui concerne les tests d'interaction entre ERF1 et MAPK1, nous observons une reconstitution de la fluorescence pour une seule combinaison : YFP<sup>N</sup>-MAPK1 \* YFP<sup>C</sup>-ERF1 (Fig. 12) traduisant la formation d'hétéro-oligomères de ERF1 avec MAPK1. De plus, il est important de noter que la fluorescence n'est localisée qu'au niveau du noyau, suggérant ainsi un recrutement de MAPK1 dans le noyau en présence d'ERF1. Les résultats obtenus montrent que MAPK1 et ERF1 interagissent physiquement, dans le noyau, ce qui suggère fortement leur implication dans une même voie de signalisation.

#### IV. Discussion.

Chez *C. roseus*, les signaux hormonaux tels les cytokinines, l'éthylène et le méthyljasmonate sont bien connus pour leur effet stimulateur sur la production d'AIM, et également sur l'expression de plusieurs gènes codant des enzymes de la voie de biosynthèse de ces AIM (Papon *et al.*, 2005 ; Oudin *et al.*, 2007). Cependant, les mécanismes précis d'action de ces signaux hormonaux sur le contrôle de la production alcaloïdique ne sont pas toujours bien établis. C'est pourquoi, les voies de transduction hormonale nécessitent d'être davantage caractérisées chez *C. roseus*, afin d'identifier les éléments clés impliqués dans ce contrôle du métabolisme alcaloïdique.

Dans ce contexte, l'objectif de mon travail a été d'isoler et caractériser des éléments de la voie de signalisation de l'éthylène chez *C. roseus*. Le choix s'est fixé sur une MAP kinase, nommée MAPK1, isolée avant mon arrivée au laboratoire, et homologue à AtMPK3 (89%) d'*Arabidopsis thaliana*, plante modèle. Un facteur de réponse à l'éthylène a également été ciblé, dont j'ai isolé l'ADNc au cours du stage, nommé ERF1. Les ERF sont connus pour être des facteurs de transcription. Les analyses bioinformatiques menées sur ERF1, homologue à AtERF1 (56%) d'*A. thaliana*, ont prédit la présence d'un domaine de liaison à l'ADN de type AP2/ERF et d'un site d'adressage de la protéine au noyau. L'expression des gènes *MAPK1* et *ERF1* a été caractérisée, par RT-PCR quantitative, en fonction de différents signaux hormonaux : éthylène, cytokinines et méthyljasmonate.

Les résultats ont montré une forte stimulation de *MAPK1* et *ERF1* par l'éthylène, permettant ainsi de valider dans un premier temps, leur implication dans cette voie de signalisation chez *C. roseus*. *MAPK1* et *ERF1* sont également fortement stimulés par le MeJa. Cette double stimulation hormonale est en accord avec les travaux sur AtERF1 et AtMPK3 chez *A. thaliana*, qui sont connues pour être impliquées dans la réponse aux stress biotiques (Lorenzo *et al.*, 2003 ; Colcombet *et al.*, 2008). *MAPK1* est également stimulé par les CK, ce qui semble être moins le cas pour ERF1 soulignant ainsi sa spécificité de réponse vis-à-vis de l'éthylène et du MeJa. MAPK1 semble être à l'interface des trois voies de signalisation. Au vu des résultats, ERF1 et MAPK1 semblent être de bons candidats pour l'étude du contrôle de la biosynthèse des AIM.

L'étude de la localisation sub-cellulaire de ERF1 montre que cette protéine est nucléaire. Ceci est cohérent avec sa fonction potentielle de facteur de transcription. Récemment, il a été montré que GmERF3 chez le soja et PsERF1 chez le prunier étaient également localisés au niveau du noyau (El-Sharkawy *et al.*, 2009 ; Zhang *et al.*, 2009). Concernant MAPK1, cette protéine est nucléocytoplasmique, ce qui est en accord avec les travaux de la littérature. En effet, chez les végétaux, les animaux et les levures, les MAPK sont connues pour être localisées au niveau du cytoplasme et du noyau (Coronado *et al.*, 2002 ; Lee *et al.*, 2004 ; Zehorai *et al.*, 2009). Cependant, chez le riz, il a été montré une localisation strictement nucléaire de BWMK1 (Cheong *et al.*, 2003). De plus, dans les modèles animaux et chez les levures, le concept de changements dynamiques de la localisation sub-cellulaire des MAPK est bien étudié. En effet, il est montré une translocation des MAPK du cytosol vers le noyau, suite à un signal.

Cette translocation est dépendante de leur état de phosphorylation (Zehorai *et al.*, 2009). Cette délocalisation dans le noyau leur permet de cibler leurs substrats, en particulier des facteurs de transcription. Chez les végétaux, Lee *et al.* (2004) ont abordé cette notion de changements dynamiques de la localisation des MAPK, ils ont en effet montré chez le persil que PcMPK3 et PcMPK6 transloquaient rapidement dans le noyau suite à un traitement éliciteur (champignon *Phytophthora*). Dans cette optique, il serait intéressant, dans notre modèle, de tester la possible délocalisation de MAPK1 dans le noyau suite à l'application des signaux éthylène, méthyljasmonate ou cytokinines.

Les mesures d'interaction protéine-protéine par reconstitution de fluorophore (BiFC) ont permis de montrer la formation d'oligomères pour ERF1, localisés au niveau du noyau. C'est la première fois, à notre connaissance, qu'il est montré la formation de cette structure pour un ERF. En effet, ce type de facteur de transcription est plutôt connu pour agir sous forme monomérique en ce qui concerne son interaction avec les boîtes GCC des promoteurs (Hao *et al.*, 1998). On ne peut cependant pas exclure une interaction oligomère-dépendante de ERF1 avec les boîtes GCC chez *C. roseus*. D'autres types de facteurs de transcription sont connus pour former des dimères comme les types bZIP ou bHLH, les rendant ainsi fonctionnels et capables de se lier à l'ADN (Amoutzias *et al.*, 2008). Nos résultats et la technique utilisée ne permettent pas de connaître le nombre de monomères impliqués dans cette structure oligomérique.

En ce qui concerne MAPK1, nous avons également montré la formation d'oligomères nucléocytoplasmiques. Chez les végétaux, très peu de travaux font état de ces structures pour des MAPK, mais chez l'Humain, la formation de dimères est connue pour faire partie du processus d'activation des MAPK, avec la phosphorylation, leur permettant ainsi de se transloquer dans le noyau (Nitta *et al.*, 2008). Par exemple, ERK2 se dimérise ce qui favorise sa localisation nucléaire, il est suggéré que cette dimérisation pourrait ainsi influencer les interactions avec leur substrat (Cobb et Goldsmith,

2000). Dans notre modèle, on peut se permettre de supposer que MAPK1 forme une structure oligomérique de type dimère sur la base des travaux de la littérature.

La technique de BiFC nous a également permis de mettre en évidence l'interaction physique entre MAPK1 et ERF1, suggérant fortement leur implication dans une même voie de signalisation et on pense plus particulièrement à celle de l'éthylène. Aussi, chez le blé, l'interaction entre TaMAPK1 et TaERF1 a été mise en évidence par double hybride chez la levure (Xu *et al.*, 2007). Récemment, chez *A. thaliana*, l'interaction entre ERF104 et AtMAPK6 a également été montrée par la technique de FRET (Bethke *et al.*, 2009). Ces auteurs mettent également en évidence la rapide dissociation du complexe ERF104-AtMAPK6 en réponse à la Flagellin 22 (signal bactérien) et à l'éthylène. Cette dissociation permettrait à ERF104 d'avoir accès aux gènes cibles.

Nos résultats mettent également en évidence la localisation strictement nucléaire du complexe protéique MAPK1-ERF1, soulignant ainsi le recrutement de MAPK1 dans le noyau en présence de ERF1, ce qui est en accord avec les travaux cités précédemment. Suite à un signal, le recrutement des MAPK dans le noyau est supposé activer la transcription des gènes cibles *via* l'activation des facteurs de transcription.

En conclusion, nous avons montré que l'expression de *ERF1* est régulée positivement par l'éthylène et le méthyljasmonate, mais peu ou pas par les cytokinines. *MAPK1* est également stimulée par l'éthylène et le méthyljasmonate, et aussi par les cytokinines. Ces résultats laissent supposer, au delà de leur implication dans la signalisation hormonale, que MAPK1 et ERF1 pourraient être impliqués dans le contrôle du métabolisme alcaloïdique chez *C. roseus*.

Le résultat marquant concerne la formation d'un complexe MAPK1-ERF1, localisé au niveau du noyau, mis en évidence par reconstitution de fluorophore. Dans le futur, il sera nécessaire de confirmer l'interaction entre ERF1 et MAPK1 dans un système hétérologue, comme un test de double hybride chez la levure. Il est aussi impératif de confirmer que ERF1 est un substrat de MAPK1 *via* un test de phosphorylation *in vitro*. Pour cela, la production des protéines recombinantes MAPK1 et ERF1 a été entreprise au cours de mon stage (résultats non-présentés dans ce rapport). Concernant ERF1, il est également nécessaire de mettre en évidence sa capacité de liaison à l'ADN afin d'affirmer que c'est un facteur de transcription. Pour cela, la technique de retard sur gel (EMSA) est envisagée en utilisant les boîtes GCC, séquences cis-régulatrices situées au niveau des promoteurs des gènes cibles des ERF. A terme, il sera envisagé de tester l'interaction d'ERF1 avec des promoteurs de gènes codant pour des enzymes de la voie de biosynthèse des AIM, certains de ces promoteurs faisant l'objet d'études au laboratoire et étant donc disponibles. Ceci représentera un moyen de mettre en évidence, de façon concrète, le lien entre signalisation et production alcaloïdique et permettra ainsi de dégager les éléments clés de la signalisation pouvant faire l'objet d'ingénierie métabolique afin de surproduire des AIM.



## V. Bibliographie.

- Amini A., Glevarec G., Andreu F., Rideau M. and Crèche J. (2009)** Low levels of gibberellic acid control the biosynthesis of ajmalicine in *Catharanthus roseus* cell suspension cultures. *Planta Medica*, **75(2)**: 187-191
- Amoutzias G. D., Robertson D. L., Van de Peer Y. and Oliver S. G. (2008)** Choose your partners: dimerization in eukaryotic transcription factors. *Trends in Bioch. Sci.*, **33**: 220-229
- Bethke G., T. Unthana, J. F. Uhrig, Y. Pöschla, A. A. Gustc, D. Scheela, and J. Lee (2009).** Flg22 regulates the release of an ethylene response factor substrate from MAP kinase 6 in *Arabidopsis thaliana* via ethylene signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106(19)**: 8067-72.
- Burlat V., Oudin A., Courtois M., Rideau M., St-Pierre B. (2004)** Co-expression of three MEP pathway genes and geraniol 10-hydroxylase in internal phloem parenchyma of *Catharanthus roseus* implicates multicellular translocation of intermediates during the biosynthesis of monoterpene indole alkaloids and isoprenoid-deriver primary metabolites. *Plant J.*, **38**: 131-141.
- Cheong YH, Moon BC, Kim JK, Kim CY, Kim MC, Kim IH, Park CY, Kim JC, Park BO, Koo SC, Yoon HW, Chung WS, Lim CO, Lee SY, Cho MJ. (2003)** BWMK1, a rice mitogen-activated protein kinase, locates in the nucleus and mediates pathogenesis-related gene expression by activation of a transcription factor. *Plant Physiol.*, **132(4)**: 1961-72.
- Cobb MH, Goldsmith EJ. (2000)** Dimerization in MAP-kinase signaling. *Trends Biochem Sci.*, **25(1)**: 7-9.
- Colcombet J. and Hirt H. (2008)** Arabidopsis MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes. *Biochem. J.*, **413**: 217-226.
- Coronado MJ, González-Melendi P, Seguí JM, Ramírez C, Bárány I, Testillano PS, Risueño MC (2002)** MAPKs entry into the nucleus at specific interchromatin domains in plant differentiation and proliferation processes. *J. Struct. Biol.*, **140(1-3)**: 200-213.
- Décendit A., Liu D., Ouelhazi L., Doireau P., Mérillon J-M., Rideau M. (1992)** Cytokinin-enhanced accumulation of indole alkaloids in *Catharanthus roseus* cell cultures. The factors affecting the cytokinin response. *Plant Cell Report*, **11**: 400-403.
- El-Sharkawy I., Sherif S., Mila I., Bouzayen M. and Jayasankar S. (2009)** Molecular characterization of seven genes encoding ethylene-responsive transcriptional factors during plum fruit development and ripening. *J. Exp. Bot.*, **60(3)**: 907-922.
- Etheridge N., Chen Y.-F. and Schaller G. E. (2005)** Dissecting the ethylene pathway of *Arabidopsis*. *Brief. Funct. Gen. prot.*, **3(4)**: 372-381.
- Gantet P., Imbault N., Thiersault M. and Doireau P. (1997)** Inhibition of alkaloid accumulation by 2,4-D in *Catharanthus roseus* cell suspension is overcome by methyl jasmonate. *Acta botanica*

*gallica*, **144(4)**: 501-508.

**Gamborg, O.L., Miller, R.A. and Ojima, K. (1968)** Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell. Res.*, **50**: 151-158.

**Giglioli-Guivarc'h N., Courdavault V., Oudin A., Crèche J., St-Pierre B. (2006)** Madagascar periwinkle, an attractive model for studying the control of the biosynthesis of terpenoid derivative compounds. *Flori. Orn. and Plant Biol.*, **2**: 496-506.

**Guirimand, G., Burlat, V., Oudin, A., Lanoue, A., St-Pierre, B., Courdavault, V. (2009)** Optimization of the transient transformation of *Catharanthus roseus* cells by particule bombardment and its application to the subcellular localization of hydroxymethylbutenyl 4- diphosphate synthase and geraniol 10-hydroxylase. *Plant Cell Rep.*, **28(8)**: 1215-34.

**Hao D., Ohme-Takagi M., and Sarai A. (1998)** Unique Mode of GCC Box Recognition by the DNA-binding Domain of Ethylene-responsive Element-binding Factor (ERF Domain) in Plant. *J. Biol. Chem.*, **273(41)**: 26857-26861.

**Lee J, Rudd JJ, Macioszek VK, Scheel D. (2004)** Dynamic changes in the localization of MAPK cascade components controlling pathogenesis-related (PR) gene expression during innate immunity in parsley. *J. Biol. Chem.*, **279(21)**: 22440-22448.

**Lorenzo O., Piqueras R., Sánchez-Serrano J. J., and Solano R. ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 Integrates Signals from Ethylene and Jasmonate Pathways in Plant Defense. *The Plant Cell*, **15**: 165-178.**

**Memelink, J., Verpoorte, R. and Kijne, J.W. (2001)** ORCAnization of jasmonate-responsive gene expression in alkaloid metabolism. *Trends Plant Sci.*, **6**: 212-219.

**Nakano T., Suzuki K., Fujimura T., and Shinshi H. (2006)** Genomeq-Wide Analysis of the ERF Gene Family in Arabidopsis and Rice. *Plant Physiol.*, **140**: 411-432.

**Nitta R. T., Chu A. H., and Wong A. J. (2008)** Constitutive Activity of JNK2 2 Is Dependent on a Unique Mechanism of MAPK Activation. *J. Biol. Chem.*, **283**: 34935-34945.

**Oudin A., Mahroug S., Courdavault V., Hervouet N., Zelwer C., Rodriguez-Concepción M et al., (2007)** Spatial distribution and hormonal regulation of gene products from methyl erythritol phosphate and monoterpene-secoiridoid pathways in *Catharanthus roseus*. *Plant Mol. Biol.*, **65**: 13-30.

**Papon N., Vansiri A., Gantet P., Chénieux J-C., Rideau M. and Crèche J. (2005)** Cytokinin and ethylene control indole alkaloid production at the level of the MEP/terpenoid pathway in *Catharanthus roseus* suspension cells. *Planta Medica*, **71(6)**: 572-574.

**Popescu SC, Popescu GV, Bachan S, Zhang Z, Gerstein M, Snyder M, Dinesh-Kumar SP. (2009)** MAPK target networks in Arabidopsis thaliana revealed using functional protein microarrays. *Genes Dev.*, **23(1)**: 80-92.

- Ramani S. and Chelliah J. (2007)** UV-B-induced signaling events leading to enhanced-production of catharanthine in *Catharanthus roseus* cell suspension cultures. *BMC Plant Biology*, **7**: 61-78.
- Van der Heijden R., Jacobs D., Snoeijer W., Hallard D., Verpoorte R. (2004)** The *Catharanthus* Alkaloids: Pharmacognosy and Biotechnology. *Curr. Med. Chem.*, **11**: 607-628.
- Waadt R., Schmidt L. K., Lohse M., Hashimoto K., Bock R. and J. Kudla (2008)** Multicolor bimolecular fluorescence complementation reveals simultaneous formation of alternative CBL/CIPK complexes in planta. *Plant J.*, **56**: 505-516.
- Walter M., Chaban C., Schütze K., Batistic O., Weckermann K., Näke C., Blazevic D., Grefen C., Schumacher K., Oecking C., Harter K., Kudla J. (2004)** Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular Fluorescence Complementation. *Plant J.*, **40**: 428-438.
- Xu Z.-S., Xia L.-Q., Chen M., Cheng X.-G., Zhang R.-Y. , Li L.-C., Zhao Y.-X., Lu Y., Ni Z.-Y., Liu L., Qiu Z.-G., Ma Y.-Z. (2007)** Isolation and molecular characterization of the *Triticum aestivum* L. ethylene-responsive factor 1 (TaERF1) that increases multiple stress tolerance. *Plant. Mol. Biol.*, **65**: 719-732.
- Yoo S.-D., Cho Y.-H., Tena G., Xiong Y. & Sheen J. (2008a)**. Dual control of nuclear EIN3 by bifurcate MAPK cascades in C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> signalling. *Nature*, **451**: 789-795.
- Yoo S.-D. and Sheen J. (2008b)** MAPK signaling in plant hormone ethylene signal transduction. *Plant Signaling & Behavior*, **3(10)**: 848-849.
- Zehorai E., Yao Z., Plotnikov A., Seger R. (2009)** The subcellular localization of MEK and ERK — A novel nuclear translocation signal (NTS) paves a way to the nucleus. *Mol. Cell. Endo.*, **314**: 213-220.
- Zhang G., Chen M., Li L., Xu Z., Chen X., Guo J. and Ma Y. (2009)** Overexpression of the soybean GmERF3 gene, an AP2/ERF type transcription factor for increased tolerances to salt, drought, and diseases in transgenic tobacco. *J. Exp. Bot.*, **60**: 3781-3796.

## **Résumé**

*Catharanthus roseus* est une plante tropicale produisant des alcaloïdes indoliques monoterpéniques (AIM) d'intérêt pharmacologique, dont la production est fortement stimulée par l'éthylène. Dans ce contexte, deux éléments de cette signalisation hormonale ont été caractérisés, après isolement de leurs séquences : MAPK1, une MAP kinase, et ERF1, un facteur de réponse à l'éthylène. La mesure de leur expression a mis en évidence leur stimulation par l'éthylène, et aussi par le méthyljasmonate. A l'échelle subcellulaire, ERF1 est localisé au niveau du noyau tandis que MAPK1 présente une localisation nucléocytoplasmique. Les mesures d'interaction protéine-protéine montrent la formation d'homo-oligomères pour ERF1 et MAPK1, respectivement dans le noyau et dans le nucléocytoplasme. Une interaction entre MAPK1 et ERF1 au niveau nucléaire a également été mise en évidence.

**Mots-clefs :** Signalisation hormonale ; Ethylène ; Facteur de réponse à l'éthylène ; Mitogen-Activated Protein Kinase ; Interaction protéine-protéine.

## **Summary**

*Catharanthus roseus* is a tropical plant producing Terpenoid Indole Alkaloids (TIAs), molecules of pharmaceutical interest. TIAs biosynthesis is strongly stimulated ethylene. In this study, two element of this signaling had been isolated: MAPK1, a MAP kinase, and ERF1, an Ethylene-Responsive Factor. By quantitative RT-PCR, we shown that their transcripts were upregulated by ethylene and methyljasmonate treatments. At the subcellular scale, ERF1 is nuclear localised whereas MAPK1 is nucleocytosolic. Using BiFC, we shown the homo-oligomerization of ERF1 and MAPK1, respectively in the nucleus and the nucleocytosol. Still using BiFC, we proved a nuclear interaction between MAPK1 and ERF1.

**Keywords :** Hormonal signaling ; Ethylene ; Ethylene-Responsive Factor ; Mitogen-Activated Protein Kinase ; protein-protein interaction.