



HAL
open science

UE Stage M1 Plateforme GBMC Génomique, biologie moléculaire et cellulaire

Marc Lauraine

► **To cite this version:**

Marc Lauraine. UE Stage M1 Plateforme GBMC Génomique, biologie moléculaire et cellulaire. Life Sciences [q-bio]. 2016. hal-04187333

HAL Id: hal-04187333

<https://hal.inrae.fr/hal-04187333>

Submitted on 24 Aug 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.

UE Stage M1

Plateforme GBMC

Génomique, biologie moléculaire et cellulaire

2016/2017

Marc Lauraine

**Caractérisation de lignées *d'Arabidopsis thaliana*
exprimant des formes constitutivement actives de
MAP kinases sous contrôle de promoteurs inductibles
par des stress**

Encadrant: Julien LANG
IPS2/Equipe stress signaling
Email : julien.lang@u-psud.fr
Tel : 0169157740
IPS2 – Paris Saclay, Bâtiment 630, rue
noetzelin, Plateau du Moulon, 91405 Orsay



Table des matières

I-	Introduction.....	p.1
	A. Introduction au contexte scientifique.....	p.1
	1. Les voies des Mitogen-activated protein kinase (MAPK) et la signalisation cellulaire.	p.1
	2. Les voies des MAPK chez <i>Arabidopsis thaliana</i>	p.1
	3. Le système immunitaire des plantes et MAPK.....	p.2
	a. PTI.....	p.2
	b. ETI.....	p.3
	B. Question scientifique et objectif du projet.....	p.3
II-	Matériel et méthode.....	p.5
	A. Matériel végétal et conditions de culture	p.5
	B. Extraction d'ADN des plantes.....	p.5
	C. PCR et primer.....	p.6
	D. Test d'induction à la flagelline.....	p.6
	E. Extraction protéique.....	p.6
	F. Western Blot.....	p.7
III-	Résultats et discussion.....	p.7
	A. Sélection des transformants et génotypage.....	p.7
	B. Tests de ségrégations.....	p.9
	a) Pour déterminer le nombre d'insertion.....	p.9
	b) Pour identifier les lignées T1 homozygotes.....	p.10
	C. Tests d'induction.....	p.10
IV-	Conclusion et perspectives.....	p.12
	Bibliographie.....	p.13

Liste des abréviations

ADN-T	ADN de transfert
a.u	unité arbitraire
CA	Constitutivement Active
CAK	Mitogen-activated protéin kinase constitutivement active
CA-MAPK	CA Mitogen-activated protein kinase constitutivement active
ETI	Effector-triggered immunity
Flg22	Fragment de flagelline
h	heure
HR	Hypersensitive response
LRR	Leucine rich region
MAMP	Microbe-Associated Molecular Patterns
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MAP2K	Mitogen-activated protein kinase kinase
MAP3K	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase
Min	Minute
MPK	Mitogen-activated protéin kinase sauvage
NB LRR	Nuclear-binding leucine rich region
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Patterns
Pb	paire de bases
PRR	Pattern-Recognition Receptors
PTI	Pattern-triggered immunity
Rpm	Rotation par minute
RSRE	Rapid Stress Response Element
Sec	Seconde

Mots clés

MAPK ; promoteur stress inductible ; mutant gain de fonction ; PTI ; ETI ;
ADN-T

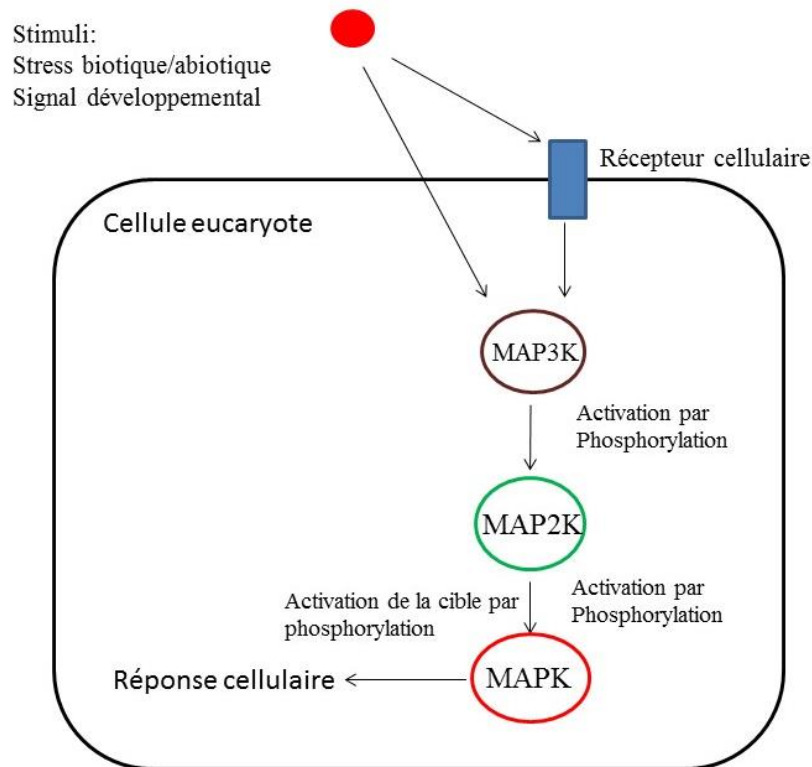


Figure 1 : Représentation schématique de la signalisation MAPK. Un stimulus, stress biotique, abiotique ou un signal développemental est perçu par un récepteur intracellulaire ou transmembranaire. Cette interaction entraîne l'activation d'une MAP3K qui va phosphoryler une MAP2K puis cette MAP2K, à son tour, va phosphoryler une MAPK. En finalité, la MAPK va phosphoryler une cible induisant une réponse cellulaire adaptée.

I- Introduction

A. Introduction au contexte scientifique

1. Les voies des Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPK) et la signalisation cellulaire.

La phosphorylation est la modification post-traductionnelle la plus abondante chez les eucaryotes. On estime qu'au moins 30% des protéines sont phosphorylées chez ces derniers ¹. Sachant que ces phosphorylations peuvent avoir des effets sur la fonction, la stabilité ou la localisation des protéines, l'étude des enzymes kinases qui déposent les groupes phosphates apparait cruciale afin de mieux comprendre les mécanismes cellulaires mis en œuvre.

Les Mitogen-activated protein kinases (MAPKs) sont des protéines impliquées dans la transduction du signal chez les eucaryotes. La signalisation MAPK permet aux cellules de répondre à des signaux intra- ou extra-cellulaires en régulant par exemple certaines activités enzymatiques ou en modifiant l'expression de gènes. Plusieurs facteurs sont impliqués dans les voies MAPKs (Fig.1). Après reconnaissance du signal, une mitogen-activated protein kinase kinase kinase (MAP3K) est activée. Cette MAP3K activée va ensuite phosphoryler une mitogen-activated protein kinase kinase (MAP2K) qui à son tour activera une MAPK. Les MAPKs ont un large panel de substrats comme d'autres kinases ou des facteurs de transcriptions.

2. Les voies des MAPK chez *Arabidopsis thaliana*.

Quand 1,7% du génome humain et 2% du génome des levures codent pour des protéines kinases, 4% est atteint chez *Arabidopsis thaliana*, soulignant l'importance des protéines kinases dans cet organisme modèle ². Les approches *in silico* prédisent 80 MAP3K, 10 MAP2Ks et 20 MAPKs chez *Arabidopsis* ¹. Les rôles de ces protéines restent largement méconnus mais quelques cascades ont été identifiées

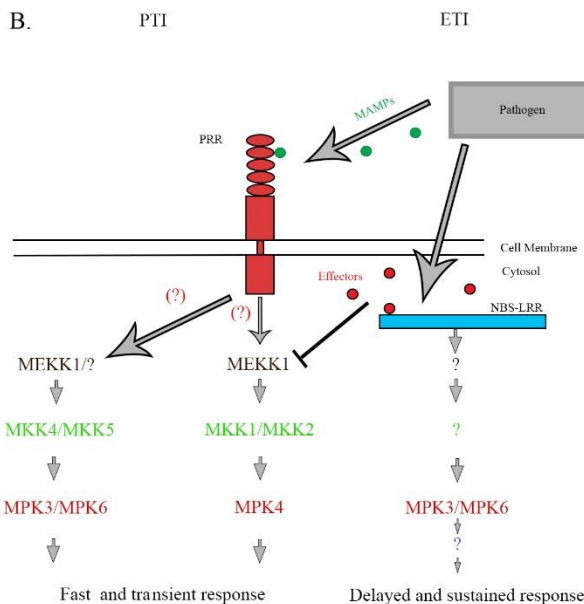
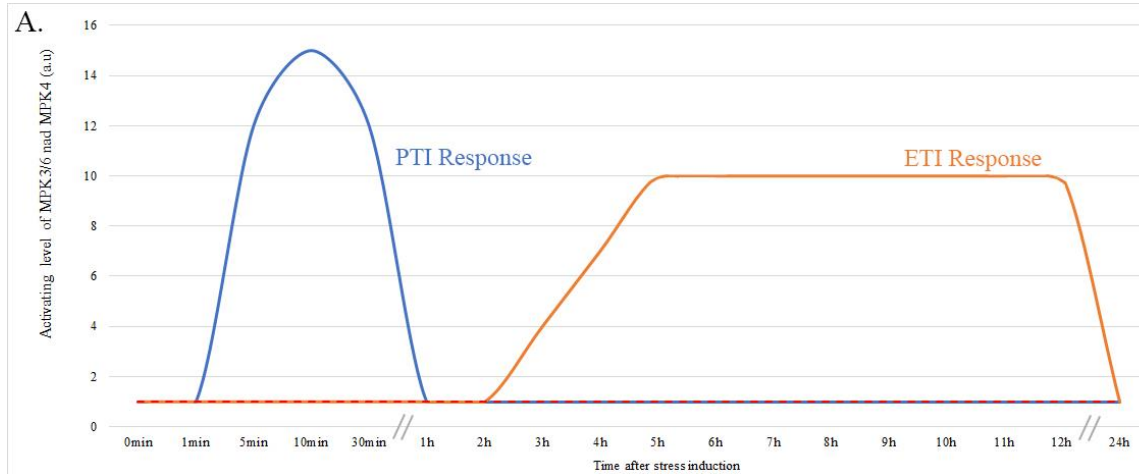


Figure 2: Réponse immunitaire et MAPK chez les plantes. Figure 2.A: Représentation de la cinétique d'activation de MPK3/6 et MPK4 dans la réponse PTI (bleu) et la réponse ETI (orange). Les niveaux d'activation sont en unité arbitraire (a. u.). Figure.2.B : Cascades MAPKs caractérisées dans la PTI et l'ETI. Un PAMP est reconnu par un récepteur et induit l'activation de MEKK1. Il semblerait alors que MEKK1 phosphoryle MKK1/MKK2 et MKK4/MKK5 qui phosphoryleront respectivement MPK4 et MPK3/MPK6 induisant une réponse PTI¹. Un pathogène peut injecter des effecteurs dans la cellule pour bloquer la PTI. C'est alors des récepteurs intracellulaires qui peuvent reconnaître l'effecteur. La cascade de signalisation conduit à la phosphorylation retardée et maintenue de MPK3/MPK6 entraînant la réponse ETI. Cependant la voie de signalisation en amont de l'activation de MPK3/MPK6 est inconnue à ce jour.

comme ayant une fonction dans les réponses aux stressés biotiques (provenant d'une interaction avec un autre organisme vivant) et abiotiques (provenant de facteurs physico-chimiques) ainsi que dans le développement ¹.

3. Le système immunitaire des plantes et MAPK.

Il y a 2 voies majeures d'immunité chez les plantes qui dépendent de la voie de détection du pathogène et qui mènent à des mécanismes de défense distincts : la Pattern-Triggered Immunity (PTI) et l'Effector-Triggered Immunity (ETI) ³. Ces deux voies impliquent des signalisations MAPKs.

a. PTI

La PTI constitue la première barrière à l'attaque d'un pathogène. Dans un premier temps, des protéines transmembranaires reconnaissent des motifs moléculaires. Ces protéines transmembranaires sont appelées Pattern-Recognition Receptors (PRR). Elles sont constituées d'une région extracellulaire riche en leucines (ou Leucine Rich Region – LRR) qui reconnaît les Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs) / Microbe-Associated Molecular Patterns (MAMPs) et d'une région intracellulaire qui permet la transduction du signal après fixation du MAMPs/PAMPs spécifique sur le LRR. Cette reconnaissance entraîne une activation rapide et transitoire des voies MAPK nécessaire à la mise en place efficace de la réponse PTI. Il a par exemple été montré que FLS2 est le PRR pour le PAMP flagelline (flg22) ¹. Cette reconnaissance entraîne l'activation de voies de signalisation MAPKs. 10 minutes après la reconnaissance de flg22, MPK3, MPK4 et MPK6 sont fortement activées et retrouvent un niveau basal en moins d'une heure (Fig2.A). La chitine, le facteur d'élongation 18 (elf18) et le peptidoglycane (PGN) sont également des PAMPs entraînant une activation forte et transitoire des MAPKs ⁴. De plus des approches par génétique inverse ont permis d'identifier les MAP3K et MAP2K qui agissent en amont de MPK6/3 et MPK4. Ainsi la MAP3K MEKK1 est impliquée dans les deux voies, les

université
PARIS-SACLAY

SCHOOL

**BIOLOGIE, MÉDECINE,
PHARMACIE**

MASTER

Biologie Santé



MAP2Ks MKK4/MKK5 agissent dans la voie MPK6/3 et les MAP2Ks MKK1/MKK2 agissent dans la voie MPK4 (Fig2.B)^{1 4}.

b. ETI

Certains pathogènes sont capables d'éviter la PTI. Ils délivrent des effecteurs dans les cellules de la plante pour faciliter l'infection de l'hôte en neutralisant la PTI. Pour contrer cela, des protéines de résistance, codées par des gènes spécifiques, sont présentes dans les cellules de la plante et sont capables de reconnaître ces effecteurs ou les perturbations du PTI engendrées par ces effecteurs. Ces protéines sont souvent des Nucleotide-binding leucine-rich repeat (NB-LRR) proteins. La réponse ETI est plus robuste que la PTI ; elle est caractérisée notamment par l'accumulation d'acide salicylique (SA) et une réponse hypersensible (HR) avec une mort cellulaire au lieu de l'infection, restreignant la propagation du pathogène³.

Un rapport récent a révélé une activité MAPK3/6 et 4 retardée (3h après exposition) et maintenue (jusqu'à 12h après exposition) en réponse à la présence d'un effecteur bactérien, suggérant que les voies MAPK jouent un rôle important dans l'ETI (Fig.2.A et B). Il a été proposé que cette activité retardée et prolongée permet l'induction d'une réponse caractéristique du SA d'une manière indépendante du SA, augmentant la robustesse des mécanismes de défense de la plante⁵.

B. Question scientifique et objectif du projet

Pour approfondir nos connaissances sur les rôles des MAPKs chez les plantes, l'équipe d'accueil a développé une approche gain-de-fonction qui consiste en l'expression de formes constitutivement actives (CA) de MAPKs (CA-MAPK). Un criblage par complémentation fonctionnelle en levure a permis l'identification de deux mutations ponctuelles dans la séquence de MPK6 (D218G/E222A) conférant une activité augmentée à la protéine. La mutation dans

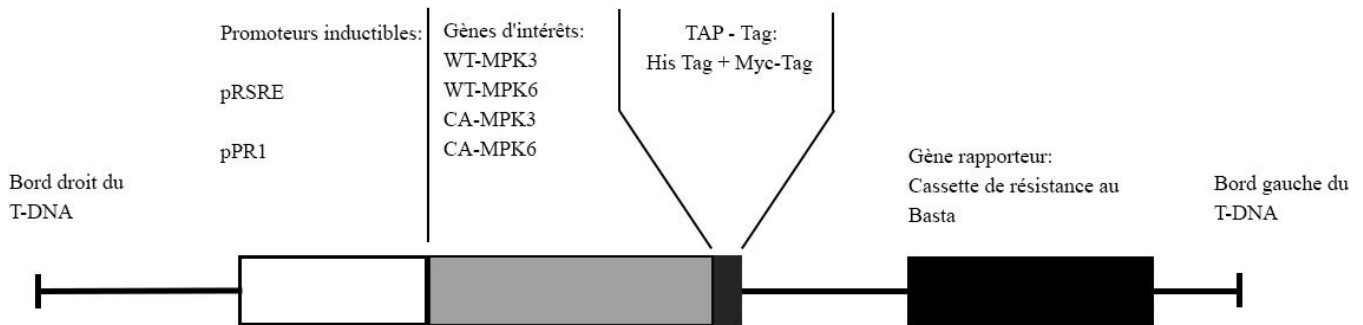


Figure 3 : Représentation des ADN-T utilisés pour transformer les plantes, de gauche à droite figure les différents promoteurs (pRSRE et pPR1), les gènes utilisés (WTK3, WTK6, CAK3, CAK6), le TAP-Tag (8His-Tag, 9Myc-Tag) et le gène rapporteur conférant la résistance au Basta.

la séquence de MPK6 (D218G/E222A) a pu être transférée à MPK4 (D198G/E202A) et MPK3 (D193G/E197A), avec une activité augmentée dans les deux cas ².

La stratégie CA-MAPK à 4 intérêts : (a) c'est une approche alternative à l'approche perte de fonction dans laquelle aucun phénotype n'a pu être observé possiblement en raison de redondance fonctionnelle dans les familles multigéniques MAPKs, (b) cela peut permettre l'étude des MAPK faiblement exprimées/activées, (c) cela peut également permettre l'étude des réponses cellulaires contrôlées par des dynamiques différentes d'activité MAPK, (d) cela peut conduire à la génération de lignées de plantes plus résistantes au stress.

Toutefois cette approche présente en l'état actuel certaines limitations. La lignée CA-MPK3, par exemple, qui exprime la protéine sous contrôle du promoteur endogène, est plus résistante aux stress, mais est également naine, ce qui restreint son intérêt potentiel en termes de biologie translationnelle. De plus on peut penser que l'expression des formes CA sous contrôle de promoteurs endogènes entraîne des effets pléiotropiques rendant difficile la distinction entre effets primaires et secondaires. Enfin il est possible que l'expression d'une forme CA dans des contextes biologiques ne réclamant pas d'activation conduise à des effets indésirables. Nous n'avons ainsi pas réussi à obtenir de lignée CA-MPK6 sous contrôle du promoteur endogène, ce qui suggère que l'expression de CA-MPK6 au stade embryonnaire cause une létalité précoce.

Pour essayer de pallier à ces difficultés, il a été décidé d'exprimer les MAPKs CA sous le contrôle de promoteurs inductibles par des stress. Contrairement à d'autres systèmes inductibles, ces promoteurs ne nécessitent pas l'ajout de molécules exogènes pour s'activer, l'idée étant de créer un système « auto-géré » dans lequel les formes CA seraient exprimées uniquement en réponse aux stress.

Plus précisément l'objectif de mon stage est de caractériser génétiquement des lignées CA-MPK3 (CAK3) et CA-MPK6 (CAK6) sous le contrôle des promoteurs pRSRE et pPR1 (Fig.3). Ce travail permettra la sélection de lignées homozygotes stables pour un phénotypage ultérieur. pRSRE est un promoteur

université
PARIS-SACLAY

SCHOOL

**BIOLOGIE, MÉDECINE,
PHARMACIE**

MASTER

Biologie Santé



synthétique dont l'inductibilité, *in vivo*, par des stressés biotiques et abiotiques a été démontrée⁶. pPR1 est un promoteur régulé positivement dans les réponses de défense et qui peut être induit par la flg22. L'hypothèse est que l'expression conditionnée de CA-MPK3 et CA-MPK6 préviendra, respectivement le nanisme sévère et la létalité. Mon travail se déroulera en 3 étapes : 1) La sélection de transformants, 2) la sélection de lignées avec un insert et la sélection d'homozygotes par tests de ségrégations, 3) tester l'inductibilité des promoteurs.

II- Matériels et méthodes

A. Matériel végétal et conditions de culture

Toutes les constructions décrites dans cette étude ont été transformées dans les fonds génétiques d'*Arabidopsis thaliana*, écotype Columbia, sauvage et *mpk6-2* (lignée d'insertions ADN-T, SALK_073907). Les graines ont été stérilisées, semées sur milieu solide MS/2 (0.2% Murashige et Skoog Sigma M6899, 0.06% MES, 1% sucrose, 0.5% Agar A4675), en présence des antibiotiques indiqués, stratifiées, et mises en culture en enceinte contrôlée (16heures de lumière à 20°C, 8 heures d'obscurité à 18°C, 60% d'humidité). Les plantes transférées en terre ont été placées en serre pour obtention de graines. Les concentrations en antibiotiques sont de 25µg/mL pour les Basta et 200µg/mL pour la céfotaxime.

B. Extraction d'ADN des plantes

Une feuille est prélevée et congelée à l'azote liquide pour chaque échantillon. La feuille est broyée au Tissu Lyser II. 300µL de tampon d'extraction (TE) sont ajoutés dans le tube (TE : 200mM Tris-HCL pH 7,5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS). Après homogénéisation les échantillons sont centrifugés à 13000 rpm pendant 1minute. 250 µL de surnageant sont récupérés et l'ADN précipité par ajout de 250µL d'isopropanol. Les échantillons sont centrifugés à 13000 rpm pendant 5minutes. Le culot est nettoyé avec de l'éthanol 75% puis mis

Stock du laboratoire	Nom	Séquence (5' à 3')	Cible
P160	BamH1-TAPtag-R	GGAAGATCTTCACTTCTCGAACTGAGGATGAGAC	TAP-tag
P2499	MPK3_F	TGACGTTTGACCCCAACAGA	AT3G45640
P2940	MPK6_F	CTCGTTGCACGACATAAGCG	AT2G43790
pPR1 3517	-	ATGGGTACCTCGGAACTTAGAGTTTAAATTTAA	pPR1
pPR1 3522	-	ATTGGGCCCTTTTCTAAGTTGATAATGGTTATT	pPR1

Tableau 1: Tableau des primers utilisés pour le génotypage.

à sécher. Une fois sec, le culot est suspendu dans 100 μ L d'eau. Les différents échantillons sont ensuite conservés à -20°C.

C. PCR et Primer

Toutes les PCR ont été réalisées en condition standard (Première dénaturation 95°C 5minutes ; [dénaturation à 94°C, 30sec ; hybridation à 55°C, 30sec ; élongation à 72°C, 1min] *35 ; 72°C 5min) puis révélées sur gel d'agarose 1% dans du TAE 0.5X (Euromedex ; EU0201-A) et 10⁻³ μ g/mL BET. Les primers utilisés figurent dans le tableau 1.

D. Test d'induction

Pour flg22 : des plantules de 10 jours sont mises en présence de flg22 à une concentration de 2 μ M. Au temps voulu, les plantules ont été prélevées, congelées dans de l'azote liquide et stockées à -80°C.

Pour le froid : des plantules de 10 jours sont mises en chambre froide (4°C) à luminosité constante. Au temps voulu, les plantules sont prélevées et stockées à -80°C. Le prélèvement au temps 0 est fait directement après placement des plantules en chambre froide.

E. Extraction protéique

Les protéines ont été extraites en condition native dans un tampon composé de : 50mM Tris-HCl pH 7,5, 150mM NaCl, 0,1% NP40, 5mM EGTA, 0.1mM DTT, auquel sont ajoutés des inhibiteurs de protéase (1mM PMSF + tablette Roche Mini 04693124001) et des inhibiteurs des phosphatases (1mM NaF, 0,5mM Na₃VO₄, 15mM β -glycerophosphate, 15mM 4-nitrophenyl phosphate).

Les protéines ont été dosées par la méthode Bradford en utilisant une gamme de BSA.



Figure 4 Différence de taille entre plante sensible (à gauche) et résistante (à droite) au Basta 10 jours après semis.

Lignées T0	Nombre de transformants obtenus	Résultats du génotypage
pRSRE WTK3 Col-0	16	16 positifs
pRSRE CAK3 Col-0	3	3 positifs
pRSRE WTK6 Col-0	8	8 positifs
pRSRE CAK6 Col-0	2	2 positifs
pPR1 WTK3 Col-0	11	1 positif/1 négatif/9 en attente de génotypage
pPR1 CAK3 Col-0	4	3 positifs/1 négatif
pRSRE WTK6 <i>mpk6</i>	1	-
pRSRE CAK6 <i>mpk6</i>	3	-
pPR1 WTK6 <i>mpk6</i>	2	-
pPR1 CAK6 <i>mpk6</i>	-	-

Tableau 2: Tableau des résultats obtenus pour l'étape de sélection et de génotypage. Figurent de gauche à droite le nom des constructions (promoteur, gène, fond génétique transformé), le nombre de transformants obtenus et les résultats du génotypage. Un génotypage positif correspond à l'obtention d'une bande lors de la PCR. Le tiret (-) correspond aux lignées dont le génotypage n'a pas encore été réalisé.

F. Western Blot

20 μ g d'extraits protéiques totaux ont été séparés sur gel d'acrylamide 10% (30mA pour un gel dans un tampon de migration 0.025M Tris, 0.192M glycine et 0.1% SDS), puis transférés sur membrane PVDF (100V constant pendant 1heure 15) dans du tampon de transfert (0,025M Tris, 0,192M glycine, 1/5 éthanol 96%). La membrane est bloquée dans une solution de lait en poudre 5% (dans du TBS-T 0.1M Tris Base, 0.15M NaCl, 1/10³ tween 20) pour l'anticorps anti-myc (SIGMA ref. C3956) ou BSA 5% dans du TBS-T pour l'anticorps p44/42 (Cell signaling technology, D13.14.4E).

Les anticorps primaire anti-myc et p44/42 ont été utilisés respectivement à une dilution de 1/10⁴ et 1/8000. L'anticorps secondaire conjugués à la peroxydase a été utilisés à une dilution de 1/10000. La révélation des membranes s'est faite par chemiluminescence (ChemiDoc Bio-Rad) avec le réactif ECL (BioRad, RPN2232). Les membranes ont été colorées avec une solution de Coomassie.

III- Résultats et discussion

A- Sélection des transformants et génotypage

Pour sélectionner les transformants, les graines T0, issues du floral dip avec *Agrobacterium* sont semées sur milieu sélectif Basta + céfotaxime. Le Basta permet la sélection des graines ayant reçu la construction, tandis que la céfotaxime permet l'élimination des agrobactéries encore présentes dans les graines après la stérilisation. Les plantes résistantes au Basta son plus grandes et plus vertes en comparaison des plantes sensibles qui poussent peu ou pas (Fig.4). Ces résistants sont mis en terre pour obtention de graines. Le tableau 2 présente le nombre de transformants ainsi sélectionnés pour chaque construction. De manière intéressante, nous avons constaté à ce stade que les plantes CAK3 ne présentaient pas de phénotype auto-immun, ce qui suggère que l'expression conditionné de la forme CAK3 permet bien d'outrepasser les problèmes

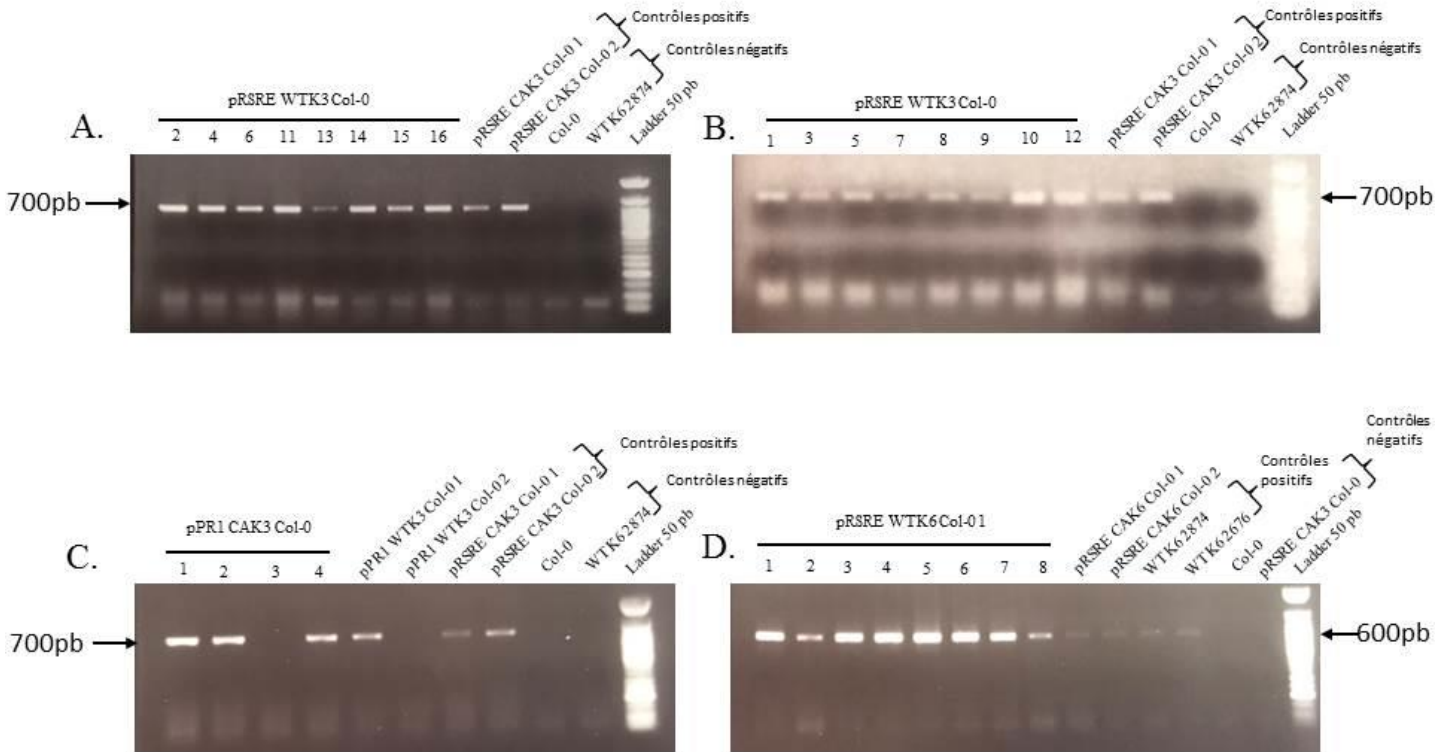


Figure 5: Résultats du génotypage. Figure 5.A et figure 5.B, résultats des PCR sur les transformants pRSRE WTK3 Col-0 avec les primers p160 et P2499. La figure 5.C correspond aux résultats obtenus pour les lignées pPR1 CAK3 Col-0, pPR1 WTK3 Col-0. La figure 5.D présente les résultats obtenus pour les transformants pRSRE WTK6 Col-0 et pRSRE CAK6 Col-0 avec les primers p160 et p2940.

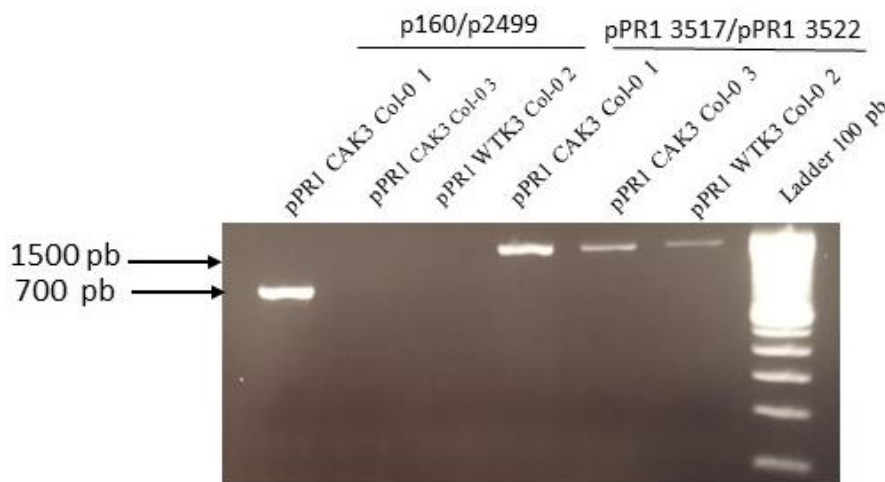


Figure 6: Résultats de la PCR contrôle avec les couples d'amorces p160/p2499 pour les 3 puits de gauche et pPR1 3517/pPR1 3522 pour les 3 puits suivant. Cette PCR contrôle permet de vérifier d'une part que la PCR a correctement été réalisée et d'autre part que l'échantillon d'extraction d'ADN génomique contenait bien de l'ADN.

développementaux précédemment décrits. En outre nous avons obtenu des lignées pour la construction CAK6 sous contrôle de pRSRE alors qu'aucun transformant n'avait pu être sélectionné sous contrôle du promoteur endogène, ce qui soutient que l'approche en expression conditionnée fonctionne. Il est par ailleurs à noter que si pratiquement l'ensemble des plantes T0 présentaient un phénotype sauvage, notamment pRSRE WTK6 Col-0, les plantes pRSRE CAK6 dans le fond sauvage Col-0 présentaient toutes deux un phénotype nain. Ceci suggère que la présence de la forme CAK6 est suffisante à induire un phénotype développemental. En revanche les 3 transformants pRSRE CAK6 dans un fond perte de fonction *mpk6* ne présentent aucun phénotype. Il semble donc que des niveaux d'expression de MPK6 pourraient être à l'origine du phénotype nain précédemment observé.

Pour vérifier la présence des constructions d'intérêt dans les plantes sélectionnées, un génotypage a été effectué, consistant en l'extraction d'ADN génomique et en l'amplification par PCR de séquences spécifiques des constructions transformées. En l'occurrence nous avons utilisé les couples p160/p2499 pour MPK3/CAK3 et p160/p2940 pour MPK6/CAK6 (Fig5.A). p160 est spécifique du TAP-Tag, p2499 est spécifique d'une séquence de WT- et CA-MPK3, enfin p2940 est spécifique d'une séquence de WT- et CA-MPK6. Comme indiqué dans le tableau 2, l'ensemble des transformants sélectionnés a été confirmé par génotypage à l'exception de pPR1 WTK3 Col-0 2 et pPR1 CAK3 Col-0 3. Pour vérifier que l'absence de bande ne provient pas d'une erreur de PCR ou de l'absence d'ADN dans l'échantillon, on a réalisé une PCR contrôle avec d'une part les primers spécifiques du promoteur de PR1 pPR1 3517 et pPR1 3522 et d'autre part les primers spécifique de l'insert (p160/p2499) comme réplique de la première PCR. Les résultats présentés figure 6 permettent de valider la présence d'ADN dans les échantillons et de réduire les chances d'une erreur lors de la première PCR. On en conclut que ces plantes ne contiennent pas la construction d'intérêt. Un réarrangement chromosomique lors de l'insertion est possible induisant une insertion incomplète de l'ADN de transfert (ADN-T) ou une mauvaise sélection de ces transformants peut être envisagée. Ils sont exclus pour la suite de la caractérisation.

Lignées T1	Nombre de résistants	Nombre de Sensibles
pRSRE WTK3 Col-0 1	63 (76%)	20 (24%)
pRSRE WTK3 Col-0 2	62 (89%)	8 (11%)
pRSRE WTK3 Col-0 4	62 (74%)	22 (26%)
pRSRE WTK3 Col-0 5	106 (84%)	20 (16%)
pRSRE WTK3 Col-0 6	92 (85%)	16 (15%)
pRSRE WTK3 Col-0 11	73 (83%)	15 (17%)
pRSRE WTK3 Col-0 14	31 (76%)	10 (24%)
pRSRE WTK3 Col-0 16	28 (76%)	9 (24%)
pRSRE CAK3 Col-0 1	85 (87%)	14 (13%)
pRSRE CAK3 Col-0 3	87 (84%)	31 (16%)

Tableau 3 : Résultats de la ségrégation de la génération T1.

Lignées T2	Nombre de résistants	Nombre de Sensibles
pRSRE CAK3 Col-0 1-1	47 (71%)	19 (29%)
pRSRE CAK3 Col-0 1-2	43 (81%)	10 (19%)
pRSRE CAK3 Col-0 1-3	47 (84%)	9 (16%)
pRSRE CAK3 Col-0 1-4	110 (100%)	0 (0%)
pRSRE CAK3 Col-0 1-5	52 (79%)	14 (21%)
pRSRE CAK3 Col-0 1-6	98 (100%)	0 (0%)
pRSRE CAK3 Col-0 1-7	75 (84%)	14 (16%)
pRSRE CAK3 Col-0 1-8	93 (82%)	20 (18%)
pRSRE CAK3 Col-0 1-9	108 (99%)	1 (1%)
pRSRE CAK3 Col-0 1-10	58 (72%)	23 (28%)
pRSRE CAK3 Col-0 3-1	120 (100%)	0 (0%)
pRSRE CAK3 Col-0 3-2	70 (94%)	5 (6%)
pRSRE CAK3 Col-0 3-3	92 (100%)	0 (0%)
pRSRE CAK3 Col-0 3-4	68 (87%)	10 (13%)
pRSRE CAK3 Col-0 3-5	44 (77%)	13 (23%)
pRSRE CAK3 Col-0 3-6	39 (71%)	16 (29%)
pRSRE CAK3 Col-0 3-7	61 (78%)	17 (22%)
pRSRE CAK3 Col-0 3-8	98 (84%)	19 (16%)
pRSRE CAK3 Col-0 3-9	65 (77%)	19 (23%)
pRSRE CAK3 Col-0 3-10	48 (68%)	23 (32%)

Tableau 4 : Résultats des tests de ségrégations des T2.

Les lignées ainsi sélectionnées sont ensuite soumises à des tests de ségrégation. Il est à noter que pour le phénotypage prévue *in fine*, il est préférable de travailler avec au moins 3 lignées indépendantes afin d'éviter les biais liés à l'introduction aléatoire de la construction dans le génome. Aussi pour les lignées pRSRE CAK6 Col-0, pRSRE WTK6 *mpk6*, pPR1 WTK6 *mpk6* et pPR1 CAK6 *mpk6*, il faudra à nouveau semer des graines.

B- Tests de ségrégations

a) Pour déterminer le nombre d'insertion(s)

Un test de ségrégation est réalisé sur la génération T1. *Arabidopsis* étant un organisme diploïde, par autofécondation, les lignées descendantes des transformants n'ayant reçu qu'une copie de l'insert présenteront les proportions suivantes :

25% de plantes T1 sauvage présentant un phénotype sensible au Basta (1/4) ; 75% de plantes T1 transformées présentant un phénotype résistant au Basta (3/4) avec 33% d'homozygotes et 66% d'hétérozygotes.

Au contraire si le transformant a reçu au moins deux ADN-T indépendants, les proportions seront les suivantes :

6,25% (ou moins) de plantes T1 sauvage sensibles (1/16) ; 93.75% (ou plus) de plantes T1 transformées résistantes (15/16).

Les pourcentages de plantes T1 résistantes et sensibles sont calculés. Les transformants présentant des résultats proches des proportions attendues seront ainsi sélectionnés arbitrairement.

Les résultats obtenus pour les lignées pRSRE WTK3 Col-0 1/2/4/5/6/11/14/16 et pRSRE CAK3 Col-0 1/3 sont présentés dans le tableau 3.

On décide de retenir les lignées pRSRE WTK3 Col-0 1, pRSRE WTK3 Col-0 4 et pRSRE CAK3 Col-0 1, pRSRE CAK3 Col-0 3.

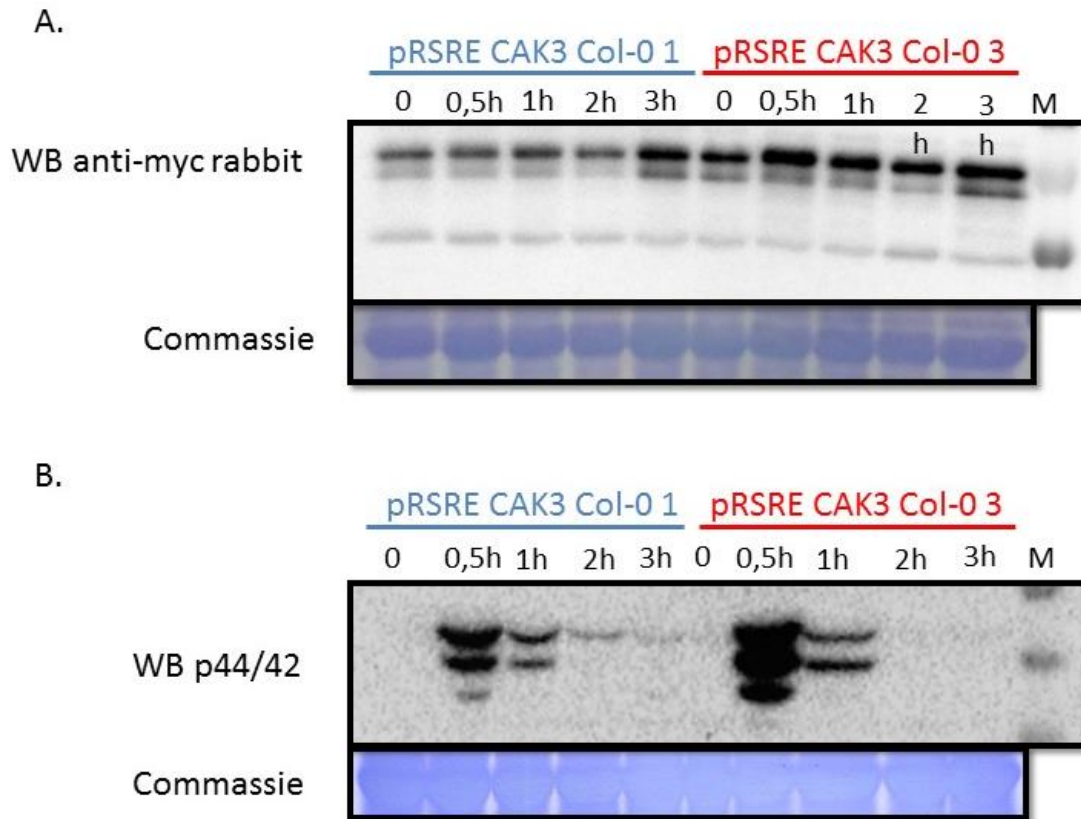


Figure 7 : Test d'induction du promoteur pRSRE à la flagelline sur les lignées pRSRE CAK3 Col-0 1 et 3. Figure 7.A. Révélation par chimiluminescence avec l'anticorps primaire anti-myc ciblant le Myc-Tag de la protéine exogène. Figure 7.B Révélation par chimiluminescence avec un anticorps primaire p44/42 ciblant les MPK endogènes phosphorylées. Dans les deux cas l'anticorps secondaire est un anticorps anti-anticorps de lapin

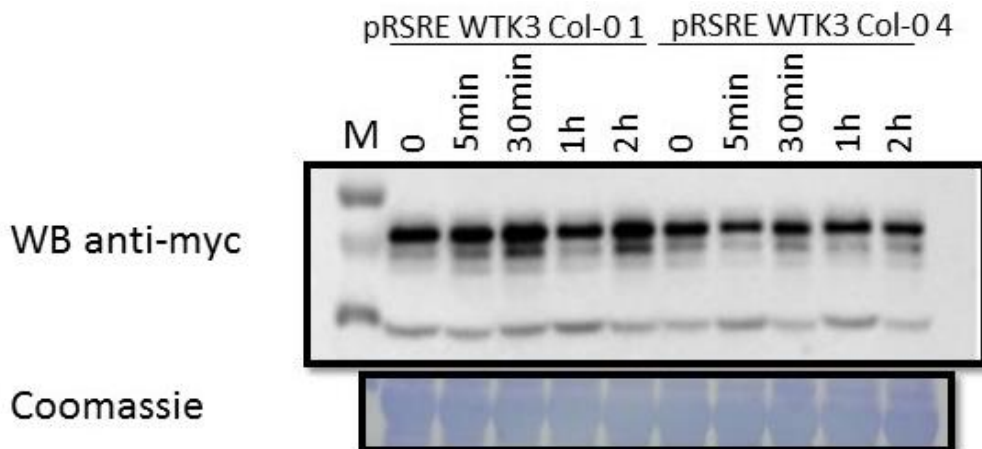


Figure 8: Test d'induction du promoteur pRSRE au froid sur les lignées pRSRE WTK3 Col-0 1 et 4. Les bande ont été révélés avec un anticorps anti-myc et un anticorps secondaire anti-anticorps de lapin

b) Pour identifier les lignées T1 homozygotes

Nous sélectionnons arbitrairement 10 plantes T1, avec a priori 1 insertion, résistantes au Basta, que nous transférons en terre afin de récolter les graines T2. Théoriquement, parmi ces 10 plantes, nous avons 33% de chance d'avoir des homozygotes et 66% d'avoir des hétérozygotes. A la génération suivante (T2), les plantes homozygotes présenteront 100% de résistance au basta contre 75% pour les hétérozygotes. Nous pourrions ainsi identifier les lignées homozygotes. Les résultats pour la construction pRSRE CAK3 Col-0 sont présentés tableau 4. La sélection des homozygotes permet d'obtenir des lignées stables dont la descendance aura toujours le même génotype en ce qui concerne l'ADN-T, ce qui est important pour le phénotypage. En outre le nombre de descendants homozygotes/hétérozygotes ainsi que les proportions résistants/sensibles chez les hétérozygotes confirment la présence d'une seule insertion dans ces lignées.

C- Tests d'inductions

Les tests d'induction consistent à vérifier par Western-blot la présence de la protéine d'intérêt en réponse à un stress donné.

Un premier test d'induction a été réalisé avec la flagelline à des temps d'exposition différents : 0min, 30min, 1h, 2h et 3h. La figure 7 présente les résultats obtenus pour les lignées pRSRE CAK3 Col-0 1 et 3. Deux observations sont à faire : 1) il y a un niveau basal d'expression de CAK3 non-négligeable en l'absence d'induction, 2) il ne semble pas y avoir d'induction du promoteur en réponse à la flagelline.

Pour vérifier que l'absence d'induction n'est pas due à un problème expérimental et à une mauvaise efficacité du test d'induction, nous avons réalisé un nouveau Western-Blot avec un anticorps p44/42 qui reconnaît spécifiquement les formes WT de MAPK phosphorylées. Dans le cas de l'induction par flg22, on observe 3 bandes, 30 min après induction et 2 bandes, 1h après induction. Ces bandes correspondent à l'activation MAPK décrite dans la littérature¹. Il s'agit de MPK6, MPK4 et MPK3 phosphorylées, confirmant la bonne réalisation du test d'induction par flg22.

université
PARIS-SACLAY

SCHOOL

**BIOLOGIE, MÉDECINE,
PHARMACIE**

MASTER

Biologie Santé



Un autre test d'induction a été réalisé, par le froid à 4°C, sur les lignées pRSRE WTK3 Col-0 1 et 4. Les plantules ont été prélevées aux temps 0min, 5 min, 30 min, 1h et 2h. Nous avons obtenu les résultats figure 8. Il ne semble pas y avoir d'induction non plus dans ce cas, bien qu'il semble y avoir une légère augmentation de l'expression de WTK3 à 30min et 2h pour la lignée pRSRE WTK3 Col-0 1 qui reste à confirmer. On note également une expression basale non négligeable.

Dans la publication où le promoteur pRSRE a été caractérisé, la construction utilisée est pRSRE couplé à la luciférase. La mesure de l'induction s'est faite par mesure de l'activité luciférase à différents temps après l'induction. L'utilisation de flg22 n'a jamais été faite seule mais couplée à un stress mécanique (blessure des plantes)⁶. Ce paramètre supplémentaire pourrait être testé ultérieurement. Des concentrations différentes de flg22 pourront également être testées. En ce qui concerne l'induction par le froid, les auteurs ont détecté une activité luciférase 2h après induction et jusqu'à 5h après induction suggérant que nous n'avons pas utilisé des temps assez long. C'est pourquoi il faudra à nouveau réaliser ce test avec des temps plus long.

Au final nos tests d'induction ne nous permettent pas de confirmer le bon fonctionnement de l'expression conditionnée des constructions d'intérêt. Pour la suite il faudra essayer d'autres conditions d'induction et faire des réplicas afin de voir si l'on peut obtenir des résultats plus concluants : notamment augmenter le temps d'exposition au froid, tester l'induction par blessure ou utiliser d'autres stress biotiques tel que le champignon *Botrytis cinerea*⁶.

université
PARIS-SACLAY

SCHOOL

**BIOLOGIE, MÉDECINE,
PHARMACIE**

MASTER

Biologie Santé



Conclusion et perspectives

Mon travail a contribué à caractériser des lignées d'*Arabidopsis* ayant reçu une insertion d'un ADN-T contenant une formes CA de MPK3/6 sous contrôle de promoteurs inductibles par des stress. Il est intéressant de noter que les lignées CAK3 étudiées ne présentent pas de phénotype développemental et que nous avons obtenu des lignées contenant la construction CAK6 alors qu'il était impossible d'en obtenir avec le promoteur endogène. Ces résultats montrent que l'approche CAK sous contrôle de promoteurs stress inductibles permet de surmonter les problèmes rencontrés avec les promoteurs endogènes. Cela étant les tests d'induction soulèvent quelques questions. Ainsi le pRSRE est un système dans lequel la protéine est exprimée à un niveau basal même sans induction. Ceci est d'ailleurs confirmé par le fait que les plantes transformées avec pRSRE CAK6 présentent un phénotype nain, sans doute en raison de cette fuite d'expression. De plus, ces fuites d'expression ne permettent pas de surmonter complètement les difficultés liées aux effets pléiotropiques et indésirables. Les niveaux d'expressions sans stress avec le promoteur pPR1 devra ainsi être vérifiées. Par ailleurs les inductions par flg22 et le froid ne sont pas clairs avec pRSRE. D'après nos résultats l'induction avec la flg22 seule ne fonctionne pas. Pour l'induction par le froid, le pic d'activité de la luciférase étant observé 5h après induction⁶, ce sont les temps des prélèvements qu'il faudra augmenter. Des répliques devront également être réalisés et des tests avec d'autres stress pourront être effectués comme l'exposition à d'autres agents biotiques tels que *Pseudomonas synrigae* ou *Botrytis cinerea*⁶.

Une fois l'inductibilité des promoteurs vérifiée et confirmée ou infirmée, il s'agira de phénotyper plus en détail les lignées isolées pour comprendre l'implication de MPK3 et MPK6 dans les voies de réponses aux stress.

université
PARIS-SACLAY

SCHOOL

**BIOLOGIE, MÉDECINE,
PHARMACIE**

MASTER

Biologie Santé



Bibliographie

1: Colombet J and Hirt H:

Arabidopsis MAPKs: a complex signaling network involved in multiple biological processes. *Biochem. J.* ,2008, Vol 413, 217-226.

2: Souha Berriri, Ana Victoria Garcia, Nicolas Frei dit Frey, Wilfried Rozhon, Stéphanie Pateyron, Nathalie Leonhardt, Jean-Luc Montillet, Jeffrey Leung, Heribert Hirt, and Jean Colcombet:

Constitutively Active Mitogen-Activated Protein Kinase Versions Reveal Functions of Arabidopsis MPK4 in Pathogen Defense Signaling. *The Plant Cell*, 2012, Vol 24, 4218-4293.

3: Jonathan D. G. Jones & Jeffrey L. Dangl:

The plant immune system, *nature*, 2006, Vol 444, 323-329

4: Jean Bigeard, Jean Colcombet and Heribert Hirt:

Signaling Mechanisms in Pattern-Triggered Immunity (PTI), 2015, *Molecular Plant* 8, 521-539.

5: Kenichi Tsuda, Akira Mine, Gerit Bethke, Daisuke Igarashi, Christopher J. Botanga, Yayoi Tsuda, Jane Glazebrook, Masanao Sato, Fumiaki Katagiri:

Dual Regulation of Gene Expression Mediated by Extended MAPK Activation and Salicylic Acid Contributes to Robust Innate Immunity in *Arabidopsis thaliana*. *Plos Genetics*, 2013, Vol 9, Issue 12.

6: Walley JW, Coughlan S, Hudson ME, Covington MF, Kaspi R, et al. Mechanical stress induces biotic and abiotic stress responses via a novel cis-element, *PLoS Genet* 3(10), 2017.

Résumé

Les Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPK) ont un rôle important dans les cellules eucaryotes. Elles permettent à la cellule de répondre à un signal extérieur via une cascade de phosphorylation qui permet la transduction du signal. Il a été montré qu'elles sont impliquées dans la réponse aux stress biotiques et abiotiques ainsi que dans le développement chez les plantes. Pour étudier les rôles de ces voies chez *Arabidopsis thaliana*, une approche gain de fonction a été développée en exprimant des formes constitutivement actives (CA) de MAPK-3 et MAPK-6 sous contrôle de promoteurs inducible. Cette approche présente différents avantages notamment la possibilité de passer outre les problèmes développementaux observés avec les formes CA sous contrôle de leurs promoteurs endogènes et d'un système s'autorégulant sans nécessité d'apporter des molécules exogènes. Dans ce travail, nous avons pu sélectionner des transformants et tester l'induction du promoteur pRSRE. Les résultats montrent que l'introduction des formes CA sous contrôle de promoteurs inducibles permet en partie de pallier aux problèmes développementaux. En effet, des transformants ont pu être obtenus pour les lignées CAK6 là où aucun n'avait été obtenu avec CAK6 sous contrôle du promoteur endogène. Cependant l'induction du promoteur pRSRE n'a pas encore pu être établis clairement. Pour la suite il s'agira de revoir les paramètres utilisés pour l'induction de ce promoteur et de tester l'induction des autres promoteurs. Enfin, une fois de bons candidats isolés, il faudra procéder à une caractérisation phénotypique plus approfondie.