



**HAL**  
open science

## Caractérisation de substrats des kinases MPK3 et CPK5/6 chez *Arabidopsis thaliana*

Camille Botcazon, Julien Lang

► **To cite this version:**

Camille Botcazon, Julien Lang. Caractérisation de substrats des kinases MPK3 et CPK5/6 chez *Arabidopsis thaliana*. Sciences du Vivant [q-bio]. 2019. hal-04226927

**HAL Id: hal-04226927**

**<https://hal.inrae.fr/hal-04226927v1>**

Submitted on 3 Oct 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.



## MASTER "BIOTECHNOLOGIES DES RESSOURCES NATURELLES"

Cohabitation  
Université de Technologie de  
Compiègne  
et Université Picardie Jules Verne

### Caractérisation de substrats des kinases MPK3 et CPK5/6 chez *Arabidopsis thaliana*.



**BOTCAZON Camille**

Stage effectué au Laboratoire IPS2  
Sous la direction de Julien Lang

Année universitaire 2018-2019

# REMERCIEMENTS

En premier lieu, je remercie Monsieur Martin Crespi pour m'avoir permis d'effectuer ce stage à l'Institut des Sciences des Plantes de l'université Paris-Saclay.

Je remercie également Jean Colcombet pour m'avoir accueilli au sein de l'équipe STRESS.

Merci à Julien Lang, mon maître de stage, de m'avoir encadrée, guidée et pour m'avoir fait bénéficier de ses conseils et de son expérience tout au long de mon stage, ainsi que pour sa patience et sa disponibilité.

Je tiens à remercier les membres de l'équipe STRESS : Marie Boudsocq, Bénédicte Sturbois , Jean Bigeard, Erwan Le Deunff, Houda Henchiri , Nolwenn Bonadé Bottino , Daria Zhydouch et Corina Rose Vernon. , pour leur bienveillance et l'aide qu'ils m'ont apportée, contribuant au bon déroulement de mon stage.

# SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES.....	1
MATERIEL ET METHODES	
1. Matériel .....	7
1.1 Souches bactériennes, transformation et conditions de culture.....	7
1.2 Vecteurs, Miniprep et séquençage .....	7
2. Méthode.....	8
2.1 Mutagénèse dirigée.....	8
2.2 Production des protéines Recombinantes .....	8
2.3 Purification des protéines recombinantes contenant un tag GST .....	8
2.4 Essais Kinase in vitro.....	8
RESULTATS	
1. Identification d'un site de phosphorylation unique par MPK3 chez ATI-2.....	9
1.1. Création de 2 mutants ponctuels d'ATI-2.....	9
1.2. Production de 2 protéines recombinantes d'ATI-2 .....	11
1.3. Identification du site de phosphorylation unique d'ATI-2 par MPK3.....	12
2. Analyse de la phosphorylation d'ATI-2 par MPK6 .....	13
3. Identifications de 2 sites de phosphorylation par MPK3 chez TCP14 .....	14
3.1 Création de 9 mutants ponctuels de TCP14 .....	14
3.2 Production de 8 protéines recombinantes de TCP14 et de TCP14 WT .....	15
3.3 Identification de 2 sites de phosphorylation de TCP14 par MPK3 .....	18
DISCUSSION ET CONCLUSION .....	19
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	21

# INTRODUCTION

---

J'effectue actuellement un stage de six mois, portant sur la caractérisation de nouveaux substrats de MPK3 et CPK5/6 chez *Arabidopsis thaliana*, à l'Institut des Sciences des Plantes de l'université Paris-Saclay (IPS2), dans l'équipe Stress Signalling sous la direction de Julien Lang.

Cette équipe s'intéresse aux voies de signalisation de kinases en conditions de stress, et notamment aux voies des Mitogen Activated Protein Kinases (MAPK) et des Calcium Dependent Protein Kinases (CDPK).

L'objectif de ce stage est de caractériser ATI-2 et TCP14, deux substrats potentiels des MPK3 et CPK5 et 6, afin de déchiffrer le phosphocode des voies kinases associées. Cela implique la détermination des sites putatifs de phosphorylation pour chacune des kinases chez les protéines candidates, puis la mutagénèse ciblée de chacun d'entre eux, la production des protéines recombinantes associées et les essais kinases correspondants, afin de vérifier la phosphorylation du site testé.

## RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

---

Les plantes sont des organismes sessiles, elles sont donc incapables d'éviter les stress biotiques, dus à un organisme vivant, et abiotiques. En conséquence, elles ont développé des mécanismes physiologiques ainsi qu'un système immunitaire complexe, pour leur défense. Ces adaptations impliquent notamment des activités enzymatiques et des modifications d'expressions géniques. Pour cela, la phosphorylation et la déphosphorylation de protéines sont des modifications post-traductionnelles couramment utilisées chez les eucaryotes.

La transduction d'un signal est un processus par lequel des informations transitent dans un système vivant. Afin de comprendre les voies de signalisation impliquées, il est nécessaire d'en identifier les acteurs ainsi que leur mode de fonctionnement, leur localisation et leurs interactants, lorsque ces voies sont activées ou non. (Krysan et Colcombet, 2018).

Dans des contextes de stress, et également dans le cadre de leur programme développemental, des protéines appelées Mitogen-activated protein kinases (MAPKs) sont impliquées dans des réseaux de signalisation activés suite à des stimuli de nature biotiques et abiotiques. (Colcombet et Hirt, 2008).

Des protéines intégrant les variations de flux calciques en réponses cellulaires adaptées, les Calcium-dependent protein kinases (CDPKs), font également partie intégrante de ces réseaux (Schulz. *et al*, 2013). Cependant, la connaissance actuelle des fonctions de ces deux voies de signalisations est encore limitée.

Un module MAPK, aussi appelé cascade MAPK, est constitué au minimum de trois kinases s'activant mutuellement par phosphorylation en série de leur boucle d'activation. Lorsqu'un signal développemental ou de stress est détecté, l'information est relayée à une Mitogen Activated Protein Kinase Kinase Kinase (ou MAP3K ou MKKK), qui active par

phosphorylation une MAP2K (ou MKK) qui, à son tour phosphoryle en deux sites et active une MAPK (ou MPK). Les étapes précédant l'activation des MPKKK ne sont pas encore clairement élucidées (Fig.1).

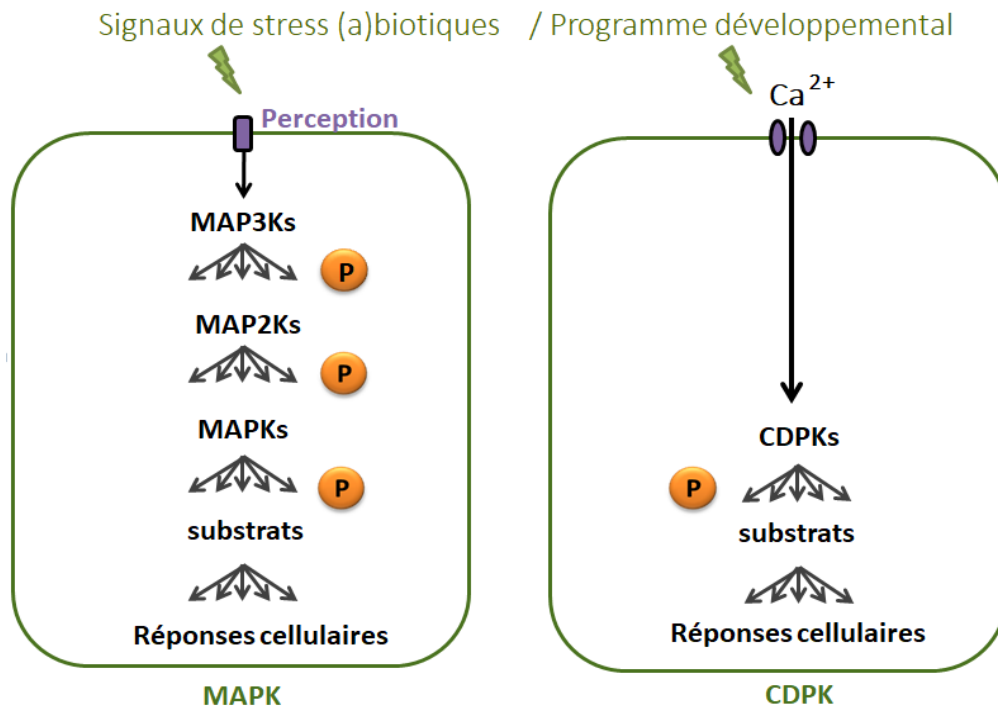


Figure 1 : Cascades de signalisation MAPK et CDPK.

Les MAPK, sont des kinases conservées chez les eucaryotes, impliquées dans différents processus développementaux, comme la mitose, mais également en réponse à des stress abiotiques tels que les stress osmotiques, les blessures, les stress thermiques, une exposition à l'ozone. (Fig.2) ou biotiques. En effet, les cascades MAPK sont ciblées par des agents de virulence de pathogènes et sont activées en présence de Pathogen associated molecular pattern (PAMPs), (J.Colcombet et H. Hirt, 2008).

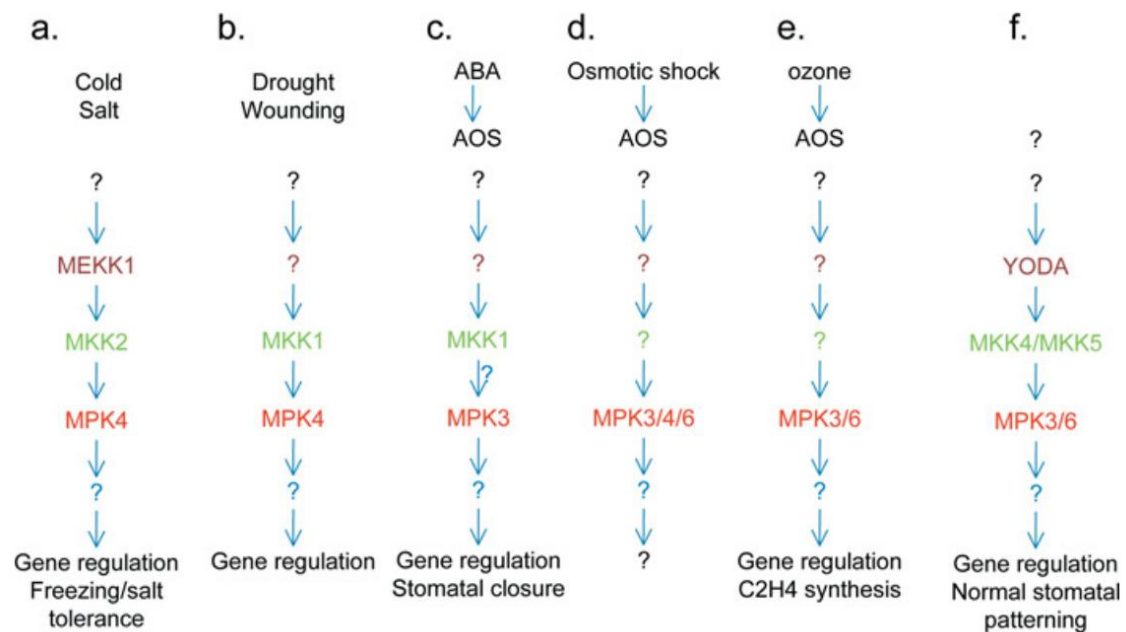


Figure 2 : Cascades de signalisation MAPK induites par stress abiotique (a) Le Froid et le stress salin induisent la cascade MEKK1–MKK2–MPK4. (b) La sécheresse et les blessures induisent MKK1–MPK4. (c) La production d’H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induite par l’ABA active MKK1–MPK4. (d) Les chocs osmotiques activent MPK3/4/6 via la production d’espèces réactives à l’oxygène (AOS). (e) Les AOS induits par l’ozone activent MPK3/6. (f) L’ouverture/fermeture stomatale est contrôlée par YODA–MKK4/5–MPK3/6.

Suite au séquençage complet d’*Arabidopsis thaliana* et d’après des prédictions basées sur des analyses d’homologies, cette espèce posséderait 80 MAP3K, 10 MAP2K et 20 MAPK. La cascade MKK4/5-MPK3/6 est particulièrement bien caractérisée. MKK4 and MKK5 peuvent tous deux activer MPK6 et MPK3, ces deux MAPKs possédant des fonctions largement redondantes. Les connaissances actuelles ont établi que la cascade MKK4/5-MPK3/6 (Fig.3), en aval de MKK3/5, joue un rôle critique pour la mise en œuvre des réponses immunitaires tandis qu’en aval de la MKK YODA, elle est impliquée dans des processus développementaux comme la formation des stomates (Fig.1). De plus, dans le cas des réponses immunitaires il a été montré que l’activation de MPK3/6 était rapide et transitoire lors de la Pattern Triggered Immunity (PTI) alors qu’elle est retardée et prolongée lors de l’Effector Triggered Immunity (ETI) (G. Bi. *et Al*, 2018).

Les CDPK sont, elles, activées en fonction des variations de concentrations intracellulaires de l’ion Ca<sup>2+</sup>, en réponse à différents stimuli d’origine similaires à ceux activant les voies MAPK (Fig.2 & 3). *Arabidopsis thaliana* possède 34 CDPKs. Parmi celles-ci CPK5 et CPK6 sont notamment connues pour jouer un rôle dans les réponses immunitaires. Tout comme MPK3/6, une activation rapide et transitoire de CPK5/6 est observée lors de la PTI, et une activation prolongée et retardée lors de l’ETI. Il a notamment été montré que, chez *A.thaliana*,

flg22 induit l'activation de CPK5 et CPK6, provoquant la synthèse d'espèces réactives à l'oxygène, l'expression de gènes de défenses, des changements dans la production de phytohormones et les signalisations hormonales ainsi que l'induction d'une mort cellulaire programmée (Schulz. *et Al*, 2013).

De manière générale, la phosphorylation de substrats par les MAPK et CDPK sur des sites spécifiques constitue une étape clef de leur fonctionnement, afin de mettre en place des réponses adaptées aux stimuli. Si par des approches à haut débit telles que la phosphoprotéomique, plusieurs dizaines de substrats putatifs ont pu être identifiés, pour certaines MAPKs et CDPKs, seule une poignée d'entre eux a à ce jour été caractérisée fonctionnellement. Entre autres, ACS2, jouant un rôle dans l'accumulation de l'éthylène, WRKY33 : un facteur de transcription, ICE1 : jouant un rôle dans la réponse au stress thermique et MAP65, intervenant dans la division cellulaire, sont substrats des MAPK 3 et 6. Certains facteurs de transcription tels que WRKY 8, 28 et 48 sont impliqués dans la PTI, la Mort cellulaire programmée (PCD) ou l'ETI et sont tous des substrats des CPK 5 et 6 (Fig.2). Cependant, tous les substrats et les rôles qui leur sont associés dans ces deux voies ne sont pas encore connus.

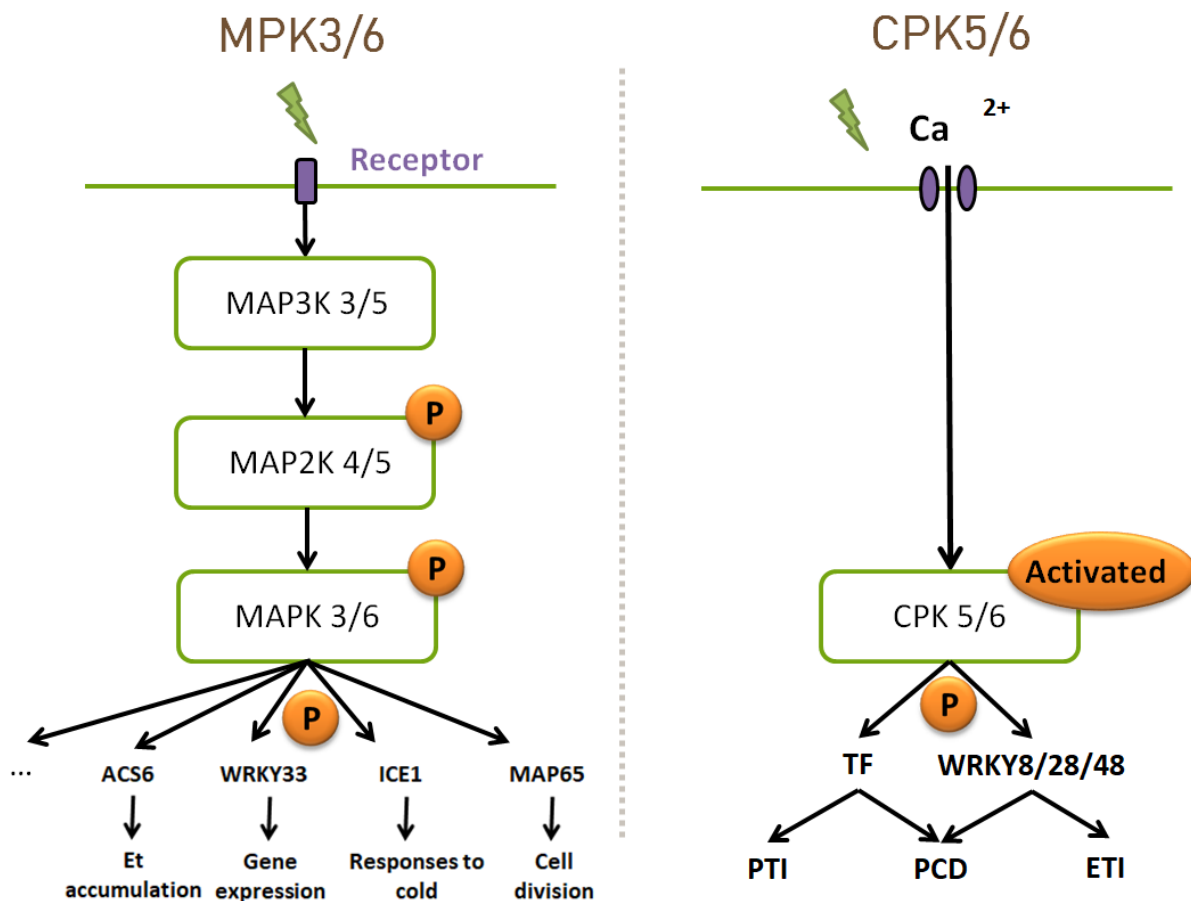


Figure 3 : Cascades de signalisation MAPK et CDPK étudiées, ainsi que certains de leurs substrats caractérisés



Ainsi déchiffrer le phosphocode de ces voies kinase (à savoir quels sont les sites phosphorylés, dans quelles conditions, et à quelles fins) demeure un objectif majeur afin de mieux comprendre leur rôle.

Par ailleurs le fait que certaines MAPKs et CDPKs soient activées dans des conditions analogues, notamment dans le cas des réponses aux stress soulève la possibilité d'interactions éventuelles et de substrats communs aux deux voies.

Par exemple, chez la tomate (*Solanum lycopersicum*), il a été montré que LeACS2, une enzyme impliquée dans la voie de synthèse de l'éthylène produit lors d'une blessure, est fonctionnelle uniquement si elle est phosphorylée par une CDPK d'une part et par une MAPK, d'autre part (Kamiyoshihara *et Al*, 2010). Aussi, identifier les sites respectifs de phosphorylation sur les substrats communs à certaines MAPKs et CDPKs, et déterminer s'il existe des liens de dépendance entre ces sites au cours de certains processus développementaux ou de certaines réponses aux stress, permettrait d'élargir encore notre compréhension du rôle de ces voies de signalisation et de leurs possibles communications.

Dans ce cadre, des résultats préliminaires de l'équipe ont permis d'identifier 2 nouveaux substrats potentiels : ATI-2 et TCP14, communs à MPK3 et CPK5/6. Pour cela, des techniques de crible double hybride en levure et de phosphoprotéomique ont été utilisées. Les données à haut débit ainsi criblées pour CPK5/6 et MPK3 ont mis en évidence ces deux substrats putatifs. Par la suite, des essais Kinase ont permis de mettre en évidence que TCP14 et ATI-2 sont effectivement des substrats *in vitro* de CPK5, CPK6 et d'une MPK3 constitutivement active. Par ailleurs il a également déjà été démontré que la phosphorylation *in vitro* de ATI-2 par CPK5/6 s'effectuait sur un seul site : la serine 102 (*Fig 4*).

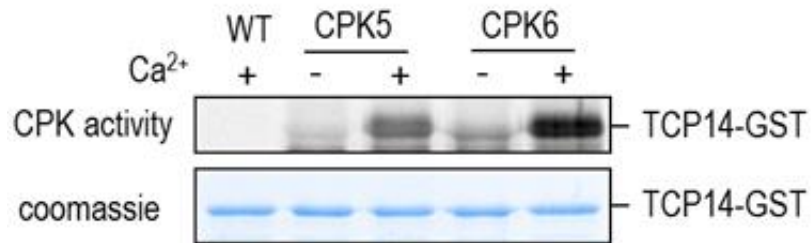
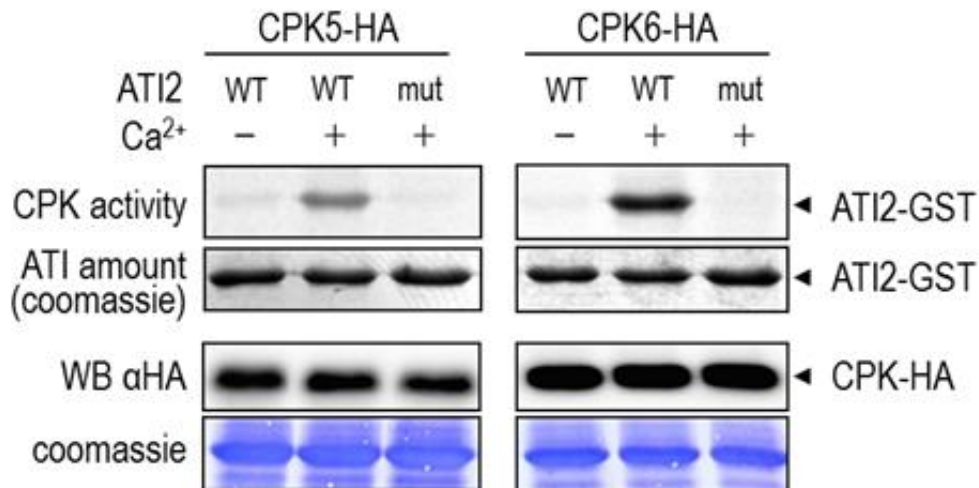
**A****B**

Figure 4 : Résultats préliminaires. (A) Essai kinase de TCP14 en présence de CPK5 et CPK6 et d'ion calcium. (B) Essai kinase des formes sauvage et mutée sur la sérine 102 d'ATI-2 en présence de CPK5 et CPK6 et d'ion calcium.

TCP14 fait partie d'une famille de facteurs de transcription de 24 membres chez *A.thaliana*. Le mutant simple *tcp14* présente un retard de germination. Le double mutant *tcp14/15* présente des phénotypes développementaux concernant les feuilles et les fleurs, dont la forme est affectée car la division cellulaire est inhibée dans ces tissus. Le triple mutant *tcp8/14/15* présente également des phénotypes immunitaires, notamment dans les réponses de type ETI (Li et Al, 2015).

ATI-2 est un inhibiteur de phosphatase TOPP. En sa présence, l'activité de différentes TOPPs est réduite. Un phénotype de plus grande sensibilité en réponse à l'acide abscissique (ABA) ainsi qu'au stress salin a en outre été mis en évidence pour le mutant *ati-2* (Hou *et al*, 2016). Il a également été montré qu'ATI-2 était une phosphoprotéine *in vivo* (Templeton *et al*, 2011).

# MATERIEL ET METHODES

## 1. Matériel

### 1.1 Souches bactériennes, transformation et conditions de culture

Les souches bactériennes utilisées dans cette étude sont *Escherichia. Coli* DH5 $\alpha$  pour la multiplication des plasmides et BL21 pour la production des protéines recombinantes.

Le milieu liquide LB enrichi en Carbéniciline contient, pour 1L : 10g de Tryptone, 5g d'extrait de levure 10g de chlorure de Sodium et 1000 $\mu$ L d'antibiotique..

### 1.2 Vecteurs, Miniprep et séquençage

Le vecteur utilisé dans cette étude est le pGEX dans lequel ont été clonées les séquences codantes de TCP14 et ATI-2. La fig. 5 présente la carte du pGEX. Ses traits caractéristiques sont : les séquences codant ATI-2 ou TCP14, un gène de résistance à l'ampicilline pour sélectionner les souches un promoteur inducible à l'IPTG pour produire les protéines et un tag GST pour les purifier.

Les vecteurs sont purifiés des souches par Miniprep (Kit MN Nucléospin Plasmid), en suivant le protocole standard du fournisseur. Les séquençages ont été effectués (Par Eurofins) avec les amorces en *Table 1*.

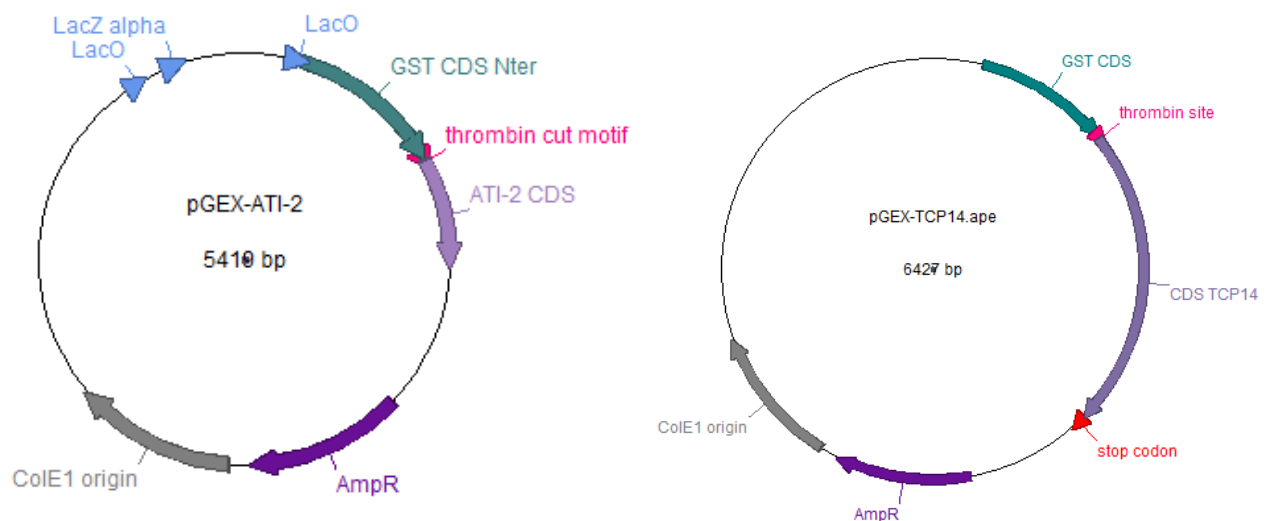


Figure 5 : Cartes des Vecteurs pGEX-ATI-2 et pGEX-TCP14

Table 1 : Amorces utilisées pour le séquençage dans pGEX.

NOM	SEQUENCE
pGEX-F	CGACCATCCTCCAAAATC
pGEX-F2	AACGTATTGAAGCTATCCC
pGEX-R	TTTCACCGTCATCACCGA

## 2. Méthode

### 2.1 Mutagénèse dirigée

L'amplification a été faite par PCR (98 °C/1 min de dénaturation, puis 20 cycles de 98 °C/15s, 57 °C/20 s, 72 °C/4 min, avec une étape d'élongation finale de 72 °C/7 min). Les souches sont transformées par choc thermique : 50 µl de cellules compétentes *E. Coli DH5α* ainsi que 2µl de produit de PCR, sont employés pour chaque transformation. Après rigidification des membranes plasmiques par incubation 10 minutes sur glace, un choc thermique de 45 secs à 42°C permet l'incorporation de l'ADN. Le tube est à nouveau placé 2min dans la glace afin de permettre l'expression du gène incorporé.

### 2.2 Production des protéines Recombinantes

Par mutagénèse dirigée sur la séquence WT d'ATI-2 ou de TCP14 clonés dans le plasmide pGEX, ces des sites de phosphorylation potentiels codant une sérine ou une thréonine ont été mutés pour coder une alanine. Quatre clones provenant de chaque transformation sont mis en culture LB-Carbéniciline liquide 6 heures. Cette pré-culture inocule une culture liquide, dont la densité optique est mesurée jusqu'à ce qu'elle atteigne 0,60 -0,70. Un échantillon non induit est prélevé et la protéine est produite par ajout de 102µl d'IPTG à 400 mM. La production a lieu toute une nuit à 18°C, sous agitation. Les culots bactériens sont récupérés après centrifugation et un lysat est produit pour chacun, par re-suspension dans du PBS-T (50mL PBS, 1% Triton, 40mg d'inhibiteur de protéase, Roche), lyse par lysozyme (10mg/ml, Sigma Aldrich) et sonication.

### 2.3 Purification des protéines recombinantes contenant un tag GST

Les extraits protéiques exprimés sont mélangés avec 500µl d'une solution de 60 % de glutathionne-sépharose (GE Healthcare, Réf : 11594935) dans du PBS-T une nuit à 4°C sous agitation lente. Trois éluions sont ensuite effectuées avec un tampon contenant 171µl de Tris 1M et 21 mg de glutathionne pour 3ml.

### 2.4 Essais Kinase in vitro

Les essais kinase sont effectués avec des protéines ATI-2 ou TCP14 recombinantes purifiées en présence des kinases MPK3 ou MPK6. Le mélange réactionnel est composé de Tampon (HEPES pH 7.5 20mM ; MgCl<sup>2</sup> 15mM ; EGTA 5mM ; DTT 1mM), 1.5 µl de mélange

protéique (Table 2), 0.15µl d'ATP à 10Mm et 11.6 µl D'AT<sup>33</sup>P (2µCi/µl), pour un volume total de 15µl. Après 30 minutes d'incubation sur glace, 10µl de Laemmli 5X sont ajoutés pour arrêter la réaction.

Les solutions protéiques contenant du DTT, sont chauffées, puis migrent sur un gel SDS-PAGE 10%, 55 minutes à ampérage constant de 30 mA. Les protéines sont colorées au Coomassie Brilliant Blue (CBB) (0,75% CBB R-250, 20% EtOH, 10% Acide acétique) et le gel est décoloré dans un tampon (81ml Acide acétique 1M, 5ml EtOH 1M, 914 ml H<sub>2</sub>O).

Les gels d'essais kinase sont séchés par aspiration sous vide et mis en cassette. La cassette est ensuite développée en 48 heures par autoradiographie. Une plaque absorbant les électrons émis par la radioactivité β- permet de collecter les signaux observés par le Typhoon (GE, Amersham).

Table 2 : Contenu en protéines des mélanges réactionnels des essais kinase

Protéine	Kinase	H <sub>2</sub> O	Réaction
ATI-2 WT (5µl)			1
ATI-2 S9A (5µl)	MPK3 (2µl)	4µl	2
ATI-2 S148A (5µl)			3
ATI-2 WT (9µl)			4
ATI-2 S9A (9µl)	MPK6 (2µl)	0	5
ATI-2 S148A (9µl)			6
TCP14 WT (9µl)			7
TCP14 S58A (9µl)	MPK3 (2µl)	0	8
TCP14 S209A (9µl)			9
TCP14 S215A (9µl)			10
TCP14 T255A (9µl)			11

## RESULTATS

### 1. Identification d'un site de phosphorylation unique par MPK3 chez ATI-2

#### 1.1.Création de 2 mutants ponctuels d'ATI-2

Les sites potentiels de phosphorylation ont d'abord été déterminés à l'aide du site internet PhosphAt (<http://phosphat.uni-hohenheim.de/>), qui rassemble les données de la littérature à ce sujet, chez *A. thaliana* et qui est également un outil de prédiction in silico de sites de phosphorylation. Ce faisant il a été défini que les sites potentiels de MPK3 étaient une Thréonine ou une Sérine suivie d'une Proline en +1 (sites S/TP) tandis que ceux de CPK5/6 étaient une thréonine ou une sérine suivie en +3 ou précédée en -2 d'une arginine ou une

lysine (sites R/KXXS/T et S/TXXXXR/K). Ainsi sur ATI-2 il y a 2 sites potentiels de phosphorylation pour MPK3 : S9A et S148A (Fig.6).

Pour chaque transformation, les clones obtenus par mutagénèse ciblée, ont été préparés avec les amorces pGEX sens et anti-sens (Table 3), selon la position de la mutation, puis séquencé. Les résultats obtenus sont comparés aux séquences des protéines sauvages, ce qui permet de sélectionner les clones présentant uniquement la mutation d'intérêt (Fig.7).

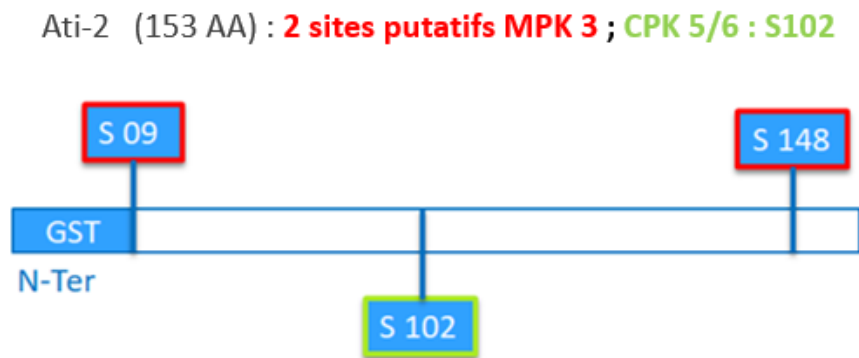


Figure 6 : Cartes des sites de phosphorylation putatifs déterminés chez ATI-2

Table 3 : Amorces synthétisées pour l'obtention des souches ATI-2 mutantes.

Proteine:mutation-sens	SEQUENCE	DESCRIPTION
Ati2:S9-F	GATGATGGTTCTTTGGCTCCTAGAGGAAGAG	Mutation ponctuelle du phosphosite d'ATI-2
Ati2S9-R	CTCTTCCTCTAGGAGCCAAAGAACCATCATC	Mutation ponctuelle du phosphosite d'ATI-2
Ati2:S148-F	CGTCGTCATCTCAGCCCCCTGAGTTAATA	Mutation ponctuelle du phosphosite d'ATI-2
Ati2:S148-R	TATTAACCTCAGGGGCTGAAGATGACGACG	Mutation ponctuelle du phosphosite d'ATI-2

**S 9**

<b>GCT</b>	TTG	TCT	CCT	AGA	GGA	AGA	GCG	TTT	45
Ser	Leu	Pro	Arg	Gly	Arg	Ala	Phe	15	

---

<b>G</b>	Ati-2 WT CDS	ATGATGGATGATGATGGTTCTTTG	TCT	CCTAGAGGA.
G	ATI-2 S9A Fw	.....	G	.....

Figure 7 : Séquencage du plasmide recombinant ATI-2 S9A, clone 1. A : Séquence sauvage d'ATI-2 (WT) contenant le codon sérine. GCT : codon muté prévisionnel. B : Alignement des séquences sauvage et de la séquence recombinante contenant une Alanine.

## 1.2. Production de 2 protéines recombinantes d'ATI-2

Les protéines recombinantes correspondantes, fusionnées à la GST en N-ter, ont été produites dans la souche BL21 d'Escherichia coli, par induction à l'IPTG (Fig.8). Les purifications des protéines recombinantes ont été effectuées par affinité avec le glutathion (Cf matériel et méthode) (Fig.9).

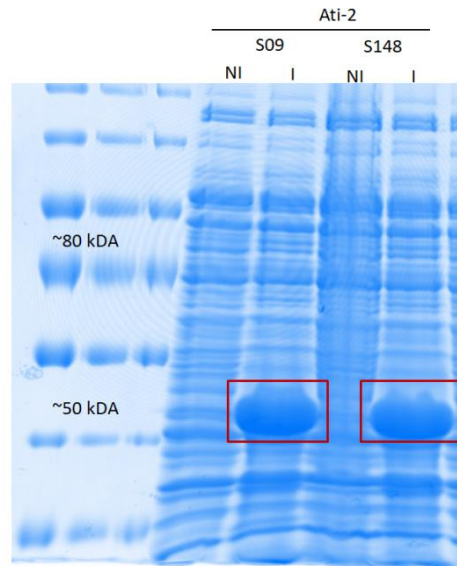


Figure 8: Induction des protéines recombinantes ATI-2 S9A et S148A. I : induit ; NI : Non Induit.

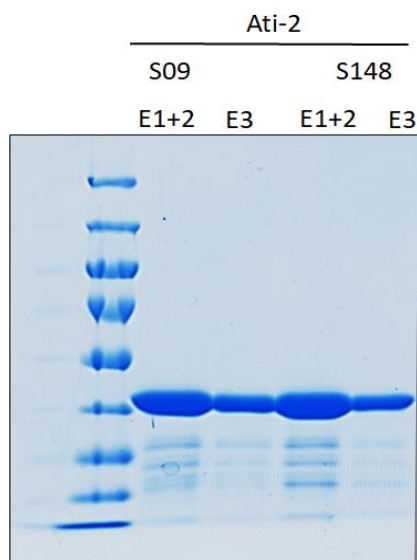


Figure 9: Purification des protéines recombinantes ATI-2 S9A et S148A

### 1.3. Identification du site de phosphorylation unique d'ATI-2 par MPK3

Des essais Kinase ont été effectués pour tester la phosphorylation des protéines recombinantes ATI-2 S9A, ATI-2 S148A, par MPK3. Les protéines de type sauvage ont également été testées pour chacune de ces kinases (*Fig.10*). La protéine recombinante mutée au site de la sérine 9 n'est plus phosphorylée de façon significative par MPK3 (*Fig.11*), les autres protéines recombinantes sont, elles, phosphorylées. On peut donc avancer qu'un site unique de phosphorylation par MPK3 a été identifié chez ATI-2 : La sérine 9.

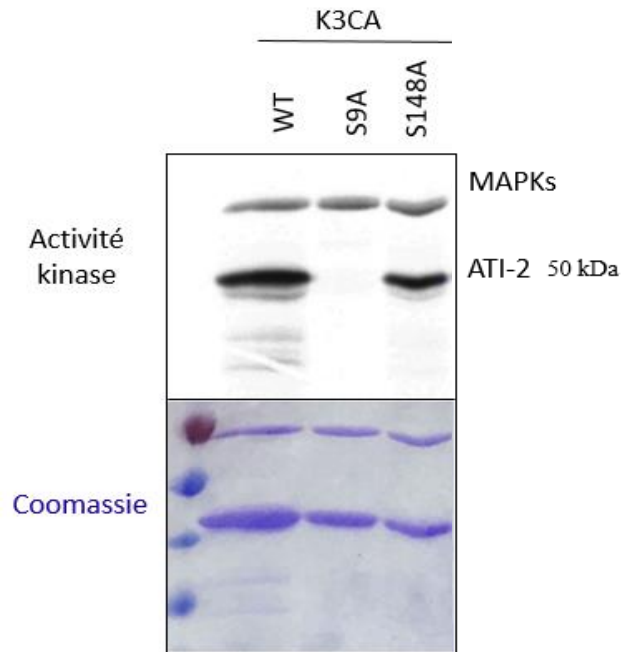


Figure 10 : Essais kinase de la protéine sauvage et des protéines recombinantes ATI-2 contenant un site de phosphorylation putatif pour MPK3.

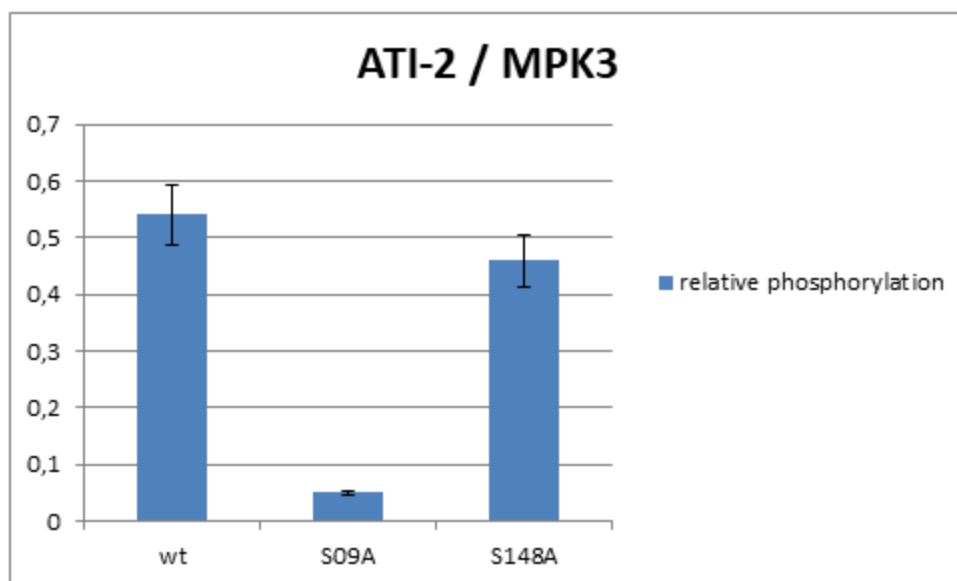


Figure 11: Taux de phosphorylations relatifs des protéines recombinantes et de la protéine sauvage ATI-2 par la kinase MPK3. Les barres d'erreur représentent 10% d'erreur allouées à la manipulation



## 2. Analyse de la phosphorylation d'ATI-2 par MPK6

Des essais kinase ont également été effectués pour les protéines en présence de MPK6, puisque cette kinase fait partie de la cascade impliquant également MPK3 et que ces deux kinases ont régulièrement des fonctions redondantes.

La protéine recombinante mutée au site de la sérine 9 n'est plus phosphorylée (Fig.12) de façon significative par MPK6 (Fig.13), les autres protéines recombinantes sont, elles, phosphorylées. On peut donc avancer qu'un site unique de phosphorylation par MPK6 a été identifié chez ATI-2 : La sérine 9.

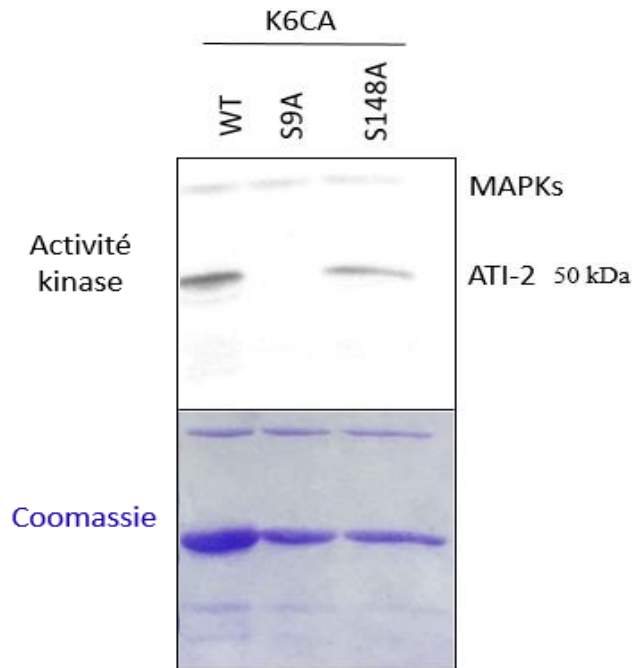


Figure 12 : Essais kinase de la protéine sauvage et des protéines recombinantes ATI-2 contenant un site de phosphorylation putatif pour MPK6.

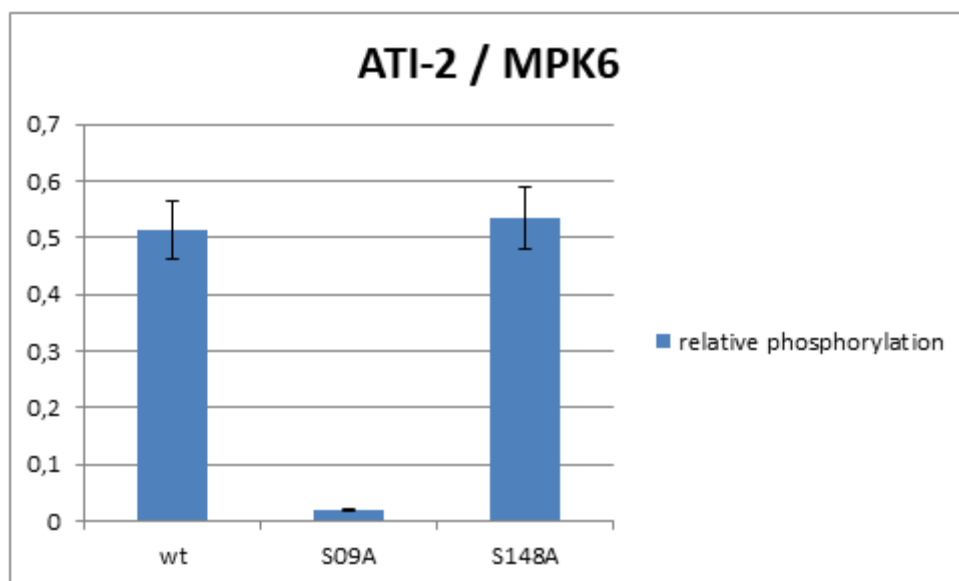


Figure 13 : Taux de phosphorylations relatifs des protéines recombinantes et de la protéine sauvage ATI-2 par la kinase MPK6. Les barres d'erreur représentent 10% d'erreur allouées à la manipulation

### 3 Identifications de 2 sites de phosphorylation par MPK3 chez TCP14

#### 3.1 Création de 9 mutants ponctuels de TCP14

Sur TCP14, on a déterminé 4 sites potentiels pour MPK3 : S58, S209, S215 et T255 et 5 pour CPK5 et CPK6 : S83, S116, T288, T444 et S470. Ces sites ont également été mutés pour coder une alanine puis séquencés (Fig.14, Table 4, Figure 15).

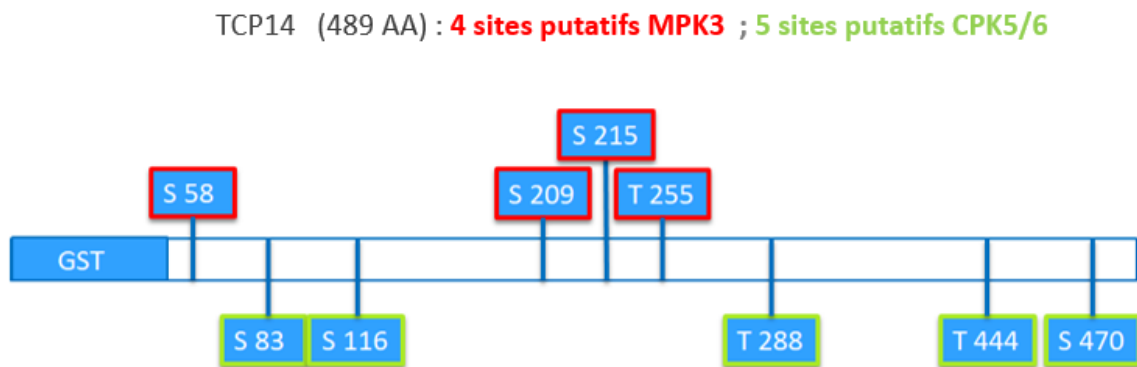


Figure 14 : Cartes des sites de phosphorylation putatifs déterminés chez TCP14

Table 4 : Amorces synthétisées pour l'obtention des souches TCP14 mutantes.

Proteine:mutation-sens	SEQUENCE	DESCRIPTION
TCP14:S58-F	CATCAACAACAACCTGCCCTTCCTCTCTCT	Mutation ponctuelle du phosphosite de TCP14
TCP14:S58-R	AGGAGGAGGAAGGGCAGGTTGTTGTTGATG	Mutation ponctuelle du phosphosite de TCP14
TCP14:S209-F	GCCGCTTCCACTTTTGGCCCTAATAACATAT	Mutation ponctuelle du phosphosite de TCP14
TCP14:S209-R	ATATGTTATTAGGGCCAAAAGTGAAGCGGC	Mutation ponctuelle du phosphosite de TCP14
TCP14:S215-F	CCTAATAACATATTTGCTCCGGCGATGCTTC	Mutation ponctuelle du phosphosite de TCP14
TCP14:S215-R	GAAGCATCGCCGGAGCAAATATGTTATTAGG	Mutation ponctuelle du phosphosite de TCP14
TCP14:S255-F	GGTATTGATAACTTCGCACCAACGACGTCGT	Mutation ponctuelle du phosphosite de TCP14
TCP14:S255-R	ACGACGTCGTTGGTGCGAAGTTATCAATACC	Mutation ponctuelle du phosphosite de TCP14
TCP14:S83-F	CAACCTCAATCGCAAGCGCAAAAAGTCACAAC	Mutation ponctuelle du phosphosite de TCP14
TCP14:S83-R	GTTGTGACTTTTGCCTTGCATTGAGGTTG	Mutation ponctuelle du phosphosite de TCP14
TCP14:S116-F	CCGTTGAAACGAGCGCGACGAAAGACCGAC	Mutation ponctuelle du phosphosite de TCP14
TCP14:S116-R	GTCGGTCTTTCGTGCGCCGCTCGTTTCAACGG	Mutation ponctuelle du phosphosite de TCP14
TCP14:T288-F	AAAAGAAGAATCCAAGCGACGTCGGATTTGC	Mutation ponctuelle du phosphosite de TCP14
TCP14:T288-R	GCAAATCCGACGTCGCTGGATTCTCTTTTT	Mutation ponctuelle du phosphosite de TCP14
TCP14:T444-F	GGTGATCATCATAATGCACAGACATCATC	Mutation ponctuelle du phosphosite de TCP14
TCP14:T444-R	GATGATGTCTCTGTGCATTATGATGATCACC	Mutation ponctuelle du phosphosite de TCP14
TCP14:S470-F	TACGGACGGCAAGTTGCCGGGACTCTCAAG	Mutation ponctuelle du phosphosite de TCP14
TCP14:S470-R	CTTGAGAGTCGCCGGCAACTTGCCTGCCGTA	Mutation ponctuelle du phosphosite de TCP14

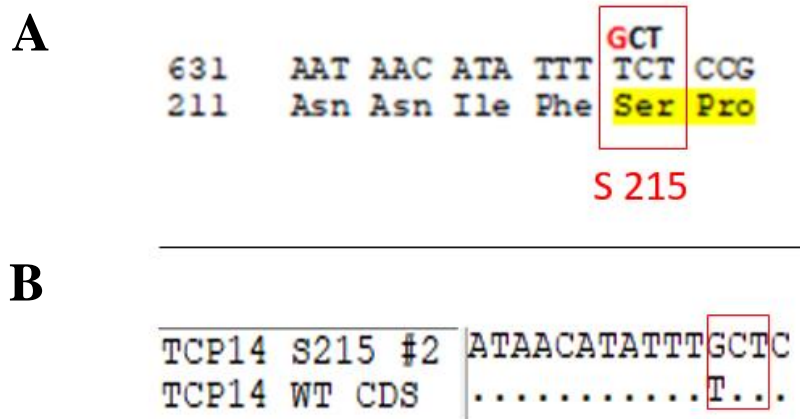


Figure 15 : Séquençage du plasmide recombinant TCP14 S215A, clone 2. **A** : Séquence sauvage de TCP14 contenant le codon sérine. **GCT** : codon muté prévisionnel. **B** : Alignement des séquences sauvage (WT) et de la séquence recombinante contenant une Alanine.

### 3.2 Production de 8 protéines recombinantes de TCP14 et de TCP14 WT

Les protéines recombinantes TCP14 S58, S209, S215A, T255A, S83A, T288A, T444A et S470A ont été produites par induction à l'IPTG (Fig.16) puis purifiées par affinité (Fig.17). La protéine TCP14 S116A n'a pas pu être produite. En conséquence nous avons décidé d'analyser, dans un premier temps, uniquement les mutants correspondants à des sites de phosphorylation par MPK3. La protéine sauvage (WT) TCP14 a également été produite et purifiée afin de servir de contrôle lors des essais kinase.

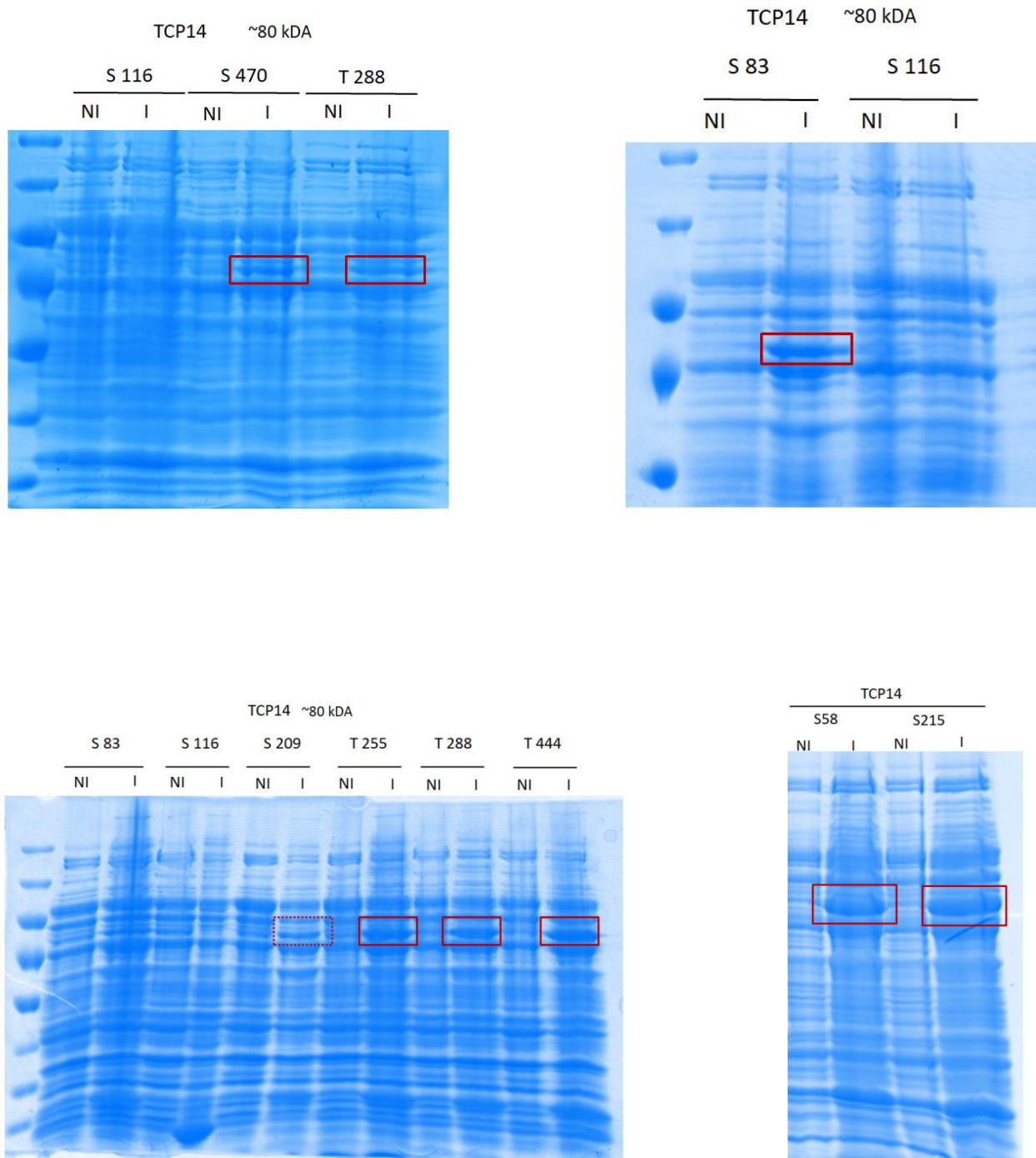


Figure 16 : Production des protéines recombinantes TCP14, S470A, T288A, S83A, S209A, T255A, T444A, S58A et S215A. I : induit ; NI : Non Induit.

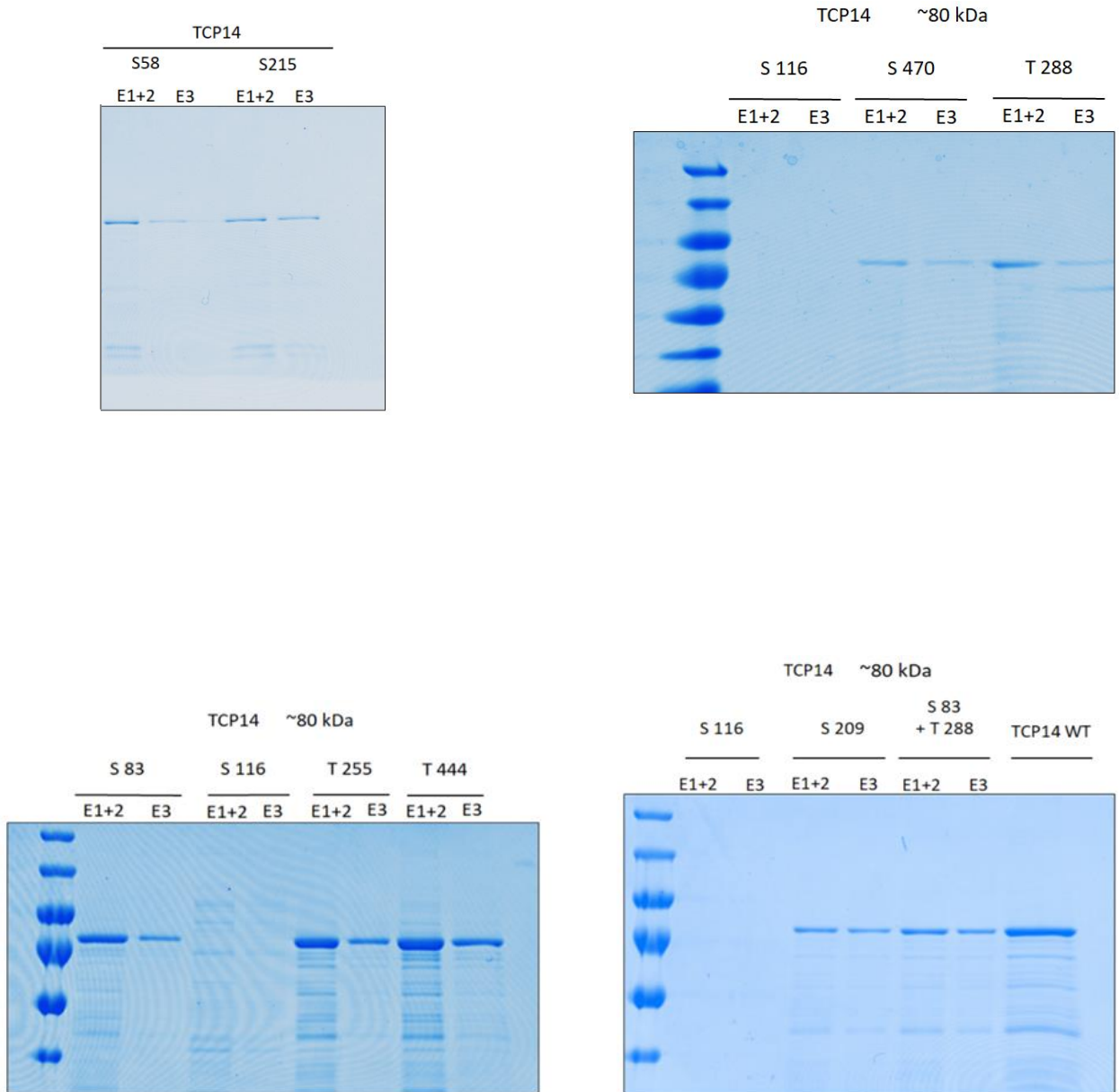


Figure 17: Purification des protéines recombinantes TCP14 S58A, S215A, S470A, T288A, S83A ; S215A, T255A ; T444A, S209A, de la protéine TCP14 WT

### 3.3 Identification de 2 sites de phosphorylation de TCP14 par MPK3

Chez TCP14, des essais kinase ont été conduits pour TCP14 WT, S58A, S209A, S215A et T255A. Toutes les versions de la protéine ont été phosphorylées par MPK3, cependant, deux protéines recombinantes présentent un taux de phosphorylation plus faible que celui de la protéine Sauvage : TCP14 S58A et TCP14 T255A (Fig.18 & 19). Cela pourrait indiquer deux sites de phosphorylation nécessaires à la phosphorylation complète de TCP14 Par MPK3 : la sérine 58 et la thréonine 255.

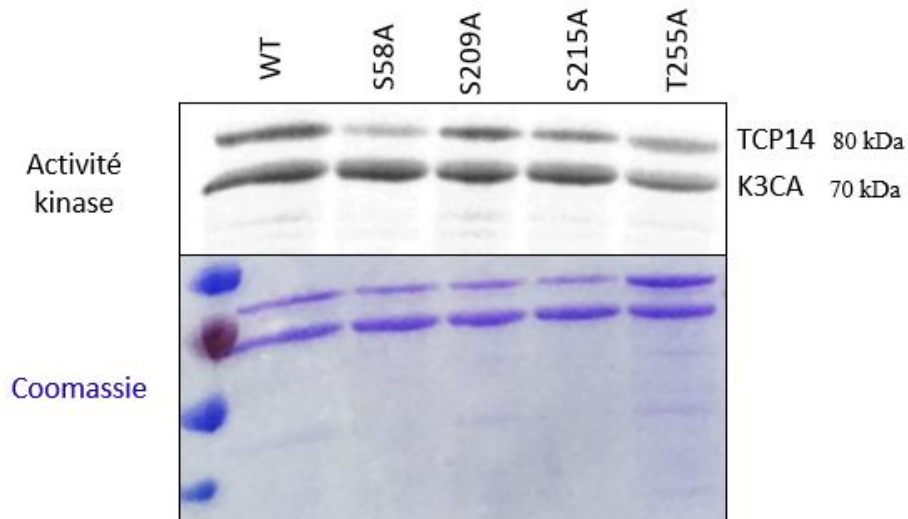


Figure 18 : Essais kinase de la protéine sauvage et des protéines recombinantes TCP14 contenant un site de phosphorylation putatif pour MPK3.

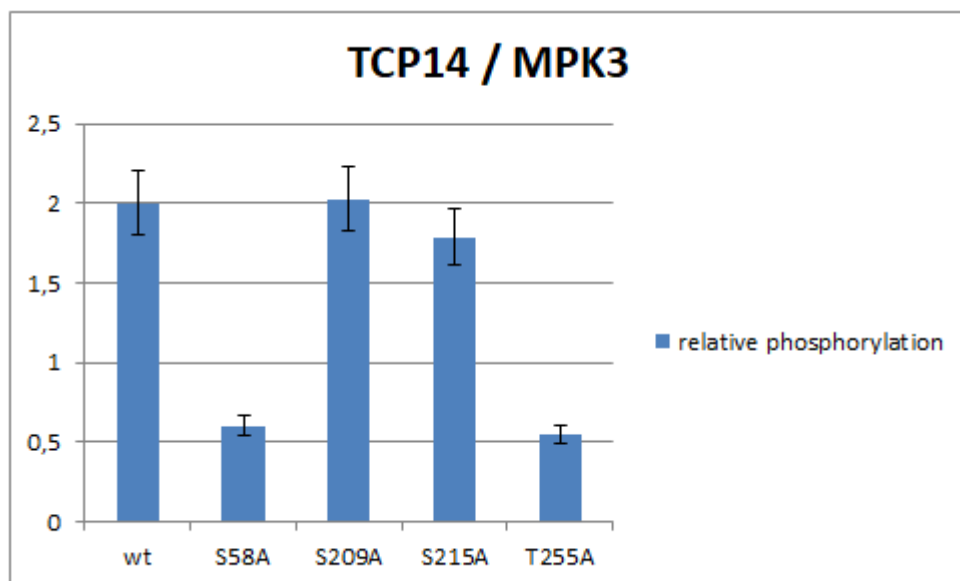


Figure 19 : Taux de phosphorylations relatifs des protéines recombinantes et de la protéine sauvage TCP14 par la kinase MPK3. Les barres d'erreur représentent 10% d'erreur allouées à la manipulation

# DISCUSSION ET CONCLUSION

---

Un site unique de phosphorylation commun à MPK3 et à MPK6 a été identifié chez ATI-2 : La sérine 9. Deux sites de phosphorylation par MPK3 ont également été identifiés chez TCP14 : la sérine 58 et la thréonine 255.

Concernant l'impossibilité de produire et purifier la protéine recombinante TCP14 S116A, l'hypothèse d'une mutation dans le promoteur inductible à l'IPTG, qui permet d'induire la production des protéines dans les souches *E.coli* BL21 a été avancée. En effet, le séquençage des souches *E.coli* DH5 $\alpha$  et BL21 permet de vérifier la séquence codant la protéine mais pas celle du promoteur inductible à l'IPTG. On pourrait effectuer un séquençage du promoteur afin de vérifier cette hypothèse. Une nouvelle transformation suivie d'une sélection d'un nouveau clone de DH5 $\alpha$  TCP14 S116A a d'ores et déjà été effectuée.

Lors des six semaines de stages qu'il me reste à effectuer, plusieurs manipulations vont être entreprises : La suite de l'étude implique la production de protéines recombinantes de TCP14 comprenant différentes combinaisons de deux (S58A/T255A) et trois mutations (S58A/S209A/T255A et S58A/S215A/T255A), ainsi que TCP14 S58A/S209A/S215A/T255A et les essais kinase correspondants, en présence de MPK3. L'objectif est de déterminer si la sérine 58 et la thréonine 255 sont bien les seuls sites de phosphorylation et s'ils ont un effet conjoint.

Des essais kinase vont également être effectués pour les protéines recombinantes de TCP14 mutées en S83, S116, T288, T444 et S470, ainsi que pour TCP14 S116A, préalablement produite et purifiée, en présence des CPK5 et CPK6, afin d'isoler le ou les sites de phosphorylation de CPK5 et CPK6 chez TCP14.

A moyen terme, le projet de thèse associé à ce sujet permettrait d'étudier les interactions in vivo entre TCP14, ATI-2, MPK3 et CDPK5/6 par complémentarité biomoléculaire de fluorescence (BiFC) dans des feuilles de tabac. L'analyse des statuts de phosphorylation des protéines dans différents contextes de stress sera ensuite effectuée, par spectrométrie de masse.

Des phénotypes de mutants *tcp14* et *ati-2* connus seront répétés et de nouveaux seront recherchés (recherche d'un phénotype immunitaire pour *ati-2*).

Ces mutants seront complétés avec des versions phospho-modifiées de TCP14 et ATI-2. Les versions dont l'acide aminé du site de phosphorylation n'est plus phosphorylable étudiées lors de ce stage (les sérines S9 et S102 pour ATI-2 et les sites déterminés à l'issue du stage pour TCP14) seront utilisés pour une complémentarité afin de vérifier une éventuelle réversion du phénotype. Les protéines dont l'acide aminé phosphorylable aura été remplacé par un acide aminé imitant une phosphorylation comme l'acide glutamique ou l'acide aspartique seront également utilisés pour obtenir des mutants gain de fonction, afin de vérifier l'existence de phénotypes hors conditions de stress.

Des études mécanistiques seront également conduites. On déterminera ainsi l'effet de la phosphorylation d'ATI-2 sur son inhibition de phosphatases TOPP, par essais enzymatiques, et l'effet de la phosphorylation de TCP14 sur sa capacité de liaison à l'ADN, par ChipSeq.

Ce projet devrait révéler les phosphosites requis pour les fonctions de TCP14 et Ati-2 au cours du développement et en réponse à des stress (a)biotiques. En associant de manière originale les phosphocodes de MAPK et CDPK, ce travail devrait également fournir une nouvelle vision des interférences et spécificités de signalisation médiées par ces deux types de kinase.



# REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

1. P. J. Krysan & J. Colcombet “Cellular Complexity in MAPK Signaling in Plants: Questions and Emerging Tools to Answer Them”. *Front Plant Sci.* (2018).
2. J. Colcombet & H. Hirt, “Arabidopsis MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes”. *Biochem J.* (2008).
3. G. Bi, Z. Zhou, W. Wang, L. Li, S. Rao, Y. Wu, X. Zhang, F. Menke, S. Chen, J. Zhou. “Receptor-Like Cytoplasmic Kinases Directly Link Diverse Pattern Recognition Receptors to the Activation of Mitogen-Activated Protein Kinase Cascades in Arabidopsis”. *The Plant Cell* (2018).
4. P. Schulz, M. Herde, T. Romeis. “Calcium-dependent protein kinases: hubs in plant stress signaling and development”. *Plant Physiol* (2013).
5. Y. Kamiyoshihara, M. Iwata, T. Fukaya, M. Tatsuki, H. Mori. “Turnover of LeACS2, a wound-inducible 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase in tomato, is regulated by phosphorylation/dephosphorylation”. *The Plant Journal* (2010)
6. S. Li “The Arabidopsis thaliana TCP transcription factors: A broadening horizon beyond development”, *Plant Signaling & Behavior* (2015).
7. Y-J. Hou, Y. Zhu, P. Wang, Y. Zhao, S. Xie, G. Batelli, B. Wang, C. Duan, X. Wang, L. Xing, M. Lei, J. Yan, X. Zhu, J. Zhu. “Type One Protein Phosphatase 1 and Its Regulatory Protein Inhibitor 2 Negatively Regulate ABA Signaling”. *PLoS Genet* (2016).
8. G. Templeton, M. Nimick, N. Morrice, D. Campbell, M. Goudreault, A. Gingras, A. Takemiya, K. Shimazaki, G. Moorhead “Identification and characterization of AtI-2, an Arabidopsis homologue of an ancient protein phosphatase 1 (PP1) regulatory subunit”. *Biochem J.* (2011).

# TABLEAUX ET FIGURES

Figure 1 : Cascades de signalisation MAPK induites par stress abiotique .....	2
Figure 2 : Cascades de signalisation MAPK et CDPK et mécanisme d'activation des CDPK...	3
Figure 3: Cascades de signalisation MAPK et CDPK étudiées, ainsi que certains de leurs substrats caractérisés.....	4
Figure 4: Résultats préliminaires.....	6
Figure 5 : Cartes des Vecteurs pGEX-ATI-2 et pGEX-TCP14.....	7
Figure 6: Cartes des sites de phosphorylation putatifs déterminés chez ATI-2.....	10
Figure 7: Séquençage du plasmide recombinant ATI-2 S9A, clone 1.....	10
Figure 8: Induction des protéines recombinantes ATI-2 S9A et S148A.....	11
Figure 9: Purification des protéines recombinantes ATI-2 S9A et S148A.....	11
Figure 10: Essais kinase de la protéine sauvage et des protéines recombinantes ATI-2 contenant un site de phosphorylation putatif pour MPK3.....	12
Figure 11: Taux de phosphorylations relatifs des protéines recombinantes et de la protéine sauvage ATI-2 par la kinase MPK3.....	12
Figure 12: Essais kinase de la protéine sauvage et des protéines recombinantes ATI-2 contenant un site de phosphorylation putatif pour MPK6.....	13
Figure 13: Taux de phosphorylations relatifs des protéines recombinantes et de la protéine sauvage ATI-2 par la kinase MPK6.....	13
Figure 14: Cartes des sites de phosphorylation putatifs déterminés chez TCP14.....	14
Figure 15: Séquençage du plasmide recombinant TCP14 S215A, clone 2.....	15
Figure 16: Production des protéines recombinantes TCP14, S470A, T288A, S83A, S209A, T255A, T444A, S58A et S215A.....	16
Figure 17: Purification des protéines recombinantes TCP14 S58A, S215A, S470A, T288A, S83A ; S215A, T255A ; T444A, S209A, de la protéine TCP14 WT.....	17
Figure 18 : Essais kinase de la protéine sauvage et des protéines recombinantes TCP14 contenant un site de phosphorylation putatif pour MPK3.....	18
Figure 19 : Taux de phosphorylations relatifs des protéines recombinantes et de la protéine sauvage TCP14 par la kinase MPK3.....	18
Table 1: Amorces utilisées pour le séquençage dans pGEX.....	8
Table 2 : Contenu en protéines des mélanges réactionnels des essais kinase.....	9
Table 3 : Amorces synthétisées pour l'obtention des souches ATI-2 mutantes.....	10
Table 4: Amorces synthétisées pour l'obtention des souches TCP14 mutantes.....	14

# RESUME

---

Chez les plantes, les Mitogen Activated Protein Kinases (MAPK) et les Calcium Dependent Protein Kinases (CDPK) forment deux groupes de protéines de signalisation intracellulaire impliquées dans les réponses aux stress biotiques et abiotiques. La caractérisation des substrats de MAPK et CDPK est un élément essentiel de la compréhension de leurs fonctions.

Dans le présent travail nous nous intéressons à la caractérisation de deux nouveaux substrats communs à MPK3 et CPK5/6 : TCP14, un facteur de transcription, et ATI-2 un inhibiteur de phosphatase. Combinant mutagenèse dirigée et tests d'activité kinase *in vitro*, nous avons réussi à isoler un site de phosphorylation unique pour MPK3 chez ATI-2 : la sérine 9 et deux sites pouvant fonctionner de façon conjointe concernant la phosphorylation de TCP14 par MPK3 : la sérine 58 et la thréonine 255. Nous avons également montré qu'ATI-2 était substrat de MPK6 *in vitro*, en un site unique, la sérine 9. Ces résultats serviront par la suite à mieux comprendre le rôle des deux substrats en fonction de leur phosphocode.

# ABSTRACT

---

In plants, mitogen activated Protein kinases (MAPK) and Calcium dependent Protein kinases (CDPK) form two groups of intracellular signalling proteins involved in biotic and abiotic stress responses. Characterization of MAPK and CDPK substrates is an essential element in understanding their functions.

In this work, we are interested in the characterization of two new substrates common to MPK3 and CPK5/6: TCP14, a transcription factor, and ATI-2 a phosphatase inhibitor. Combining directed mutagenesis and *in vitro* kinase assays, we were able to isolate a single phosphorylation site for MPK3 at ATI-2: serine 9 and two sites that could work together for the phosphorylation of TCP14 by MPK3: serine 58 and threonine 255. We have also shown that ATI-2 is a substrate of MPK6 *in vitro*, in a single site, serine 9. These results will later be used to better understand the role of the two substrates according to their phosphocode.