



HAL
open science

Rôle d'un module MAPK atypique dans la voie de signalisation déclenché par les PAMPs chez Arabidopsis

Julien Lang, Taha Chlyah

► **To cite this version:**

Julien Lang, Taha Chlyah. Rôle d'un module MAPK atypique dans la voie de signalisation déclenché par les PAMPs chez Arabidopsis. Life Sciences [q-bio]. 2022. hal-04226979

HAL Id: hal-04226979

<https://hal.inrae.fr/hal-04226979v1>

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.



Université de Montpellier
Faculté des Sciences
Master Biologie-Agrosciences



Parcours : Interaction Plante-Microorganismes

Année Universitaire 2021-2022

TITRE

Rôle d'un module MAPK atypique dans la voie de signalisation déclenché par les PAMPs chez Arabidopsis

Prénom NOM

Taha CHLYAH

**Laboratoire ou Entreprise
Encadrant**

Institute of Plant sciences

**Julien Lang
&
Jean Colcombet**

Soutenu le

14 06 2022

Remerciement

Je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont apporté de l'aide au cours de mon stage.

Premièrement, j'adresse mes sincères remerciements à mes encadrants Julien Lang et Jean Colcombet pour le temps qu'ils m'ont consacré, par un suivi quotidien et des réunions hebdomadaires, pour m'encadrer au cours de ce stage. Je les remercie de m'avoir accompagné le long de ce stage pour la prise en mains des expériences, la compréhension du sujet ainsi que la rédaction de ce manuscrit. J'aimerais les remercier également pour les explications et les conseils qu'ils m'ont fournis avec bienveillance et bonne humeur.

Je tiens à remercier également les membres de mon équipe Sarah Regnard et Jean Bigerad pour leur aide et leurs précieux conseils qu'ils ont fournis de plein cœur.

Je voudrais aussi remercier tous les membres de l'équipe pour les moments de détente et de plaisanterie que nous avons partagés, et notamment, au cours des pauses café et au bureau avec Sarra, Sarah et Axelle.

Je suis très heureux d'avoir fait partie de cette équipe qui m'a tant apporté au niveau des connaissances qu'au niveau moral.

Les plantes sont capables de reconnaître des motifs moléculaires conservés chez les pathogènes pour induire ces réponses immunitaires. Ces motifs sont appelés Pathogen-associated molecular pattern (PAMP), Ils sont reconnus par les récepteurs Pattern recognition receptor (PRR) pour induire une réponse de type pattern-triggered immunity (PTI). L'établissement de cette réponse implique l'activation des voies de signalisation immunitaires et s'accompagne d'une multitude de réaction tel que l'accumulation d'espèces réactives d'oxygène et l'accumulation de calcium. Les modules Mitogen-activated protein kinases (MAPK) sont des acteurs clé de cette voie. Dans le cadre des signalisation immunitaires deux modules MAPK « classiques » sont particulièrement étudiés : MAPKKK3/5-MKK4/MKK5-MPK3/MPK6 et MEKK1-MKK1/MKK2-MPK4. Ces modules sont activés rapidement (15 min après l'infection) en aval de la perception du PAMP, flg22, par son récepteur FLAGELLIN SENSING2(FLS2). Dans le cadre de ce stage, je me suis intéressé à caractérisation d'un module MAPK atypique dans la voie de signalisation immunitaire déclenché par le PAMP et plus particulièrement en réponse à la flg22. Ce module été caractérisé précédemment dans des contextes de blessure et de sécheresse, il est dit atypique car il présente des cinétiques d'activation tardives par rapport aux modules « classiques » et dont l'activation est dépendante de la néosynthèse de MAP3K du clade 3. Au cours de ce stage, Par des approches de biochimie et de biologie moléculaire, j'ai eu l'occasion de faire des immunoprécipitations, des tests d'activité kinase, des western blot ainsi que des RTqPCR pour répondre aux différentes questions. A l'issue de ce projet, j'ai pu caractériser pour la première fois l'activation module MKK3-MPK7 en réponse à la flg22 ainsi que l'indépendance du module MKK4/MKK5-MPK3/MPK6 pour cette activation, j'ai également identifié deux MAP3Ks candidats pour médier l'activation du module en réponse à la flg22. Par ailleurs, j'ai montré également la convergence des deux modules pour l'expression du gène marqueur de la voie de l'acide salicylique, *PRI*.

Table des matières

I.	Introduction	1
1.	Perception, réponses et adaptation des plantes aux pathogènes	1
2.	Les modules MAPK sont des acteurs clé des signalisations immunitaires	2
a.	Qu'est-ce qu'un module de signalisation MAPK chez les plantes ?	2
b.	Rôle des MAPK dans les voies de signalisations immunitaires	3
c.	Un nouveau module activé par les stress biotiques	4
3.	Problématique du stage	4
II.	Matériel et méthodes	5
1.	Matériel végétal	5
2.	Culture & Traitement	6
a.	In vitro	6
b.	Plantes en pot « in vivo »	6
3.	Extraction des protéines & normalisation	7
4.	Immunoprécipitation, test d'activité kinase, western blot	8
a.	Immunoprécipitation	8
b.	Test d'activité kinase	8
c.	Western blots	9
5.	RTqPCR	9
III.	Résultats	10
1.	Caractérisation du module atypique en réponse la flg22	10
a.	Vérification de l'activation des modules « classiques » dans nos conditions expérimentales 10	
b.	Activation de MPK7 en réponse à la flg22 et dépendance de MKK3 pour cette activation .	11
c.	Identification de MAP3K candidates pour médier via une régulation transcriptionnelle l'activation du module MKK3-MPK7 par la flg22.	11
2.	Dépendance du module classique pour l'activation de MPK7 par la flg22	12
3.	Rôle du module atypique dans l'expression du gène PR1	14
IV.	Discussion	14

I. Introduction

1. Perception, réponses et adaptation des plantes aux pathogènes

Les plantes sont des organismes sessiles. En raison de leur incapacité à se déplacer, pour survivre, elles doivent faire face aux contraintes environnementales et notamment à divers stress biotiques et abiotiques. Les stress biotiques sont ceux causés par des organismes vivants (champignons, insectes, bactéries ...) ayant un effet néfaste, alors que les stress abiotiques peuvent avoir plusieurs origines : disponibilité en éléments nutritifs, la température, la salinité du sol, sécheresse ...

Afin de lutter contre les pathogènes, les plantes disposent d'un arsenal de systèmes de défenses. Les premiers se présentent sous forme de barrières physiques telles que la cuticule, couche cireuse recouvrant la surface des feuilles ainsi que la paroi des cellules qui permettent de prévenir l'entrée de la majorité des pathogènes (Hamann 2012). Malgré ces barrières, certains pathogènes arrivent à pénétrer dans la plante par diverses voies, comme : l'ostiole des stomates, les blessures ou ont développés des mécanismes pour la dégradation des parois cellulaires (Bigéard et al., 2015).

Par conséquent, via l'induction de ses réponses immunitaires, la plante va répliquer de diverses manières pour stopper l'avancement du pathogène. Au niveau local, on retrouve une production de callose au site de l'infection, un renforcement des parois des cellules autour de ce site qui permet de bloquer l'entrée du pathogène, la production de composés à effet antimicrobiens tels que les phytoalexines et d'enzymes digestives contre le pathogène telles que les chitinases. Dans certains cas, la plante provoque une mort cellulaire programmée. Au niveau systémique, on retrouve la réponse systemic acquired resistance (SAR) induite suite aux réponses locales et dont l'établissement se produit plus tardivement (Vlot et al., 2021).

Les réponses immunitaires chez les plantes sont induites à la suite de la perception d'un pathogène grâce à un récepteur (fig. 1). On distingue 2 types de récepteurs : les Pathogen Recognition Receptor (PRR) et les Nucleotide-binding Leucine-rich Repeat-containing Proteins (NLR), respectivement responsables des réponses Pattern-Triggered-Immunity (PTI) et Effector Triggered Immunity (ETI). Ces modes de perception sont décrits dans le modèle en zigzag et permettent d'expliquer le dialogue moléculaire qui s'opère entre un pathogène et sa plante hôte (fig. 2 ; Jones and Dangl, 2006). Selon ce modèle, dans la première phase de l'interaction, la détection de Pathogen-Associated Molecular pattern (PAMP) et de Damage-

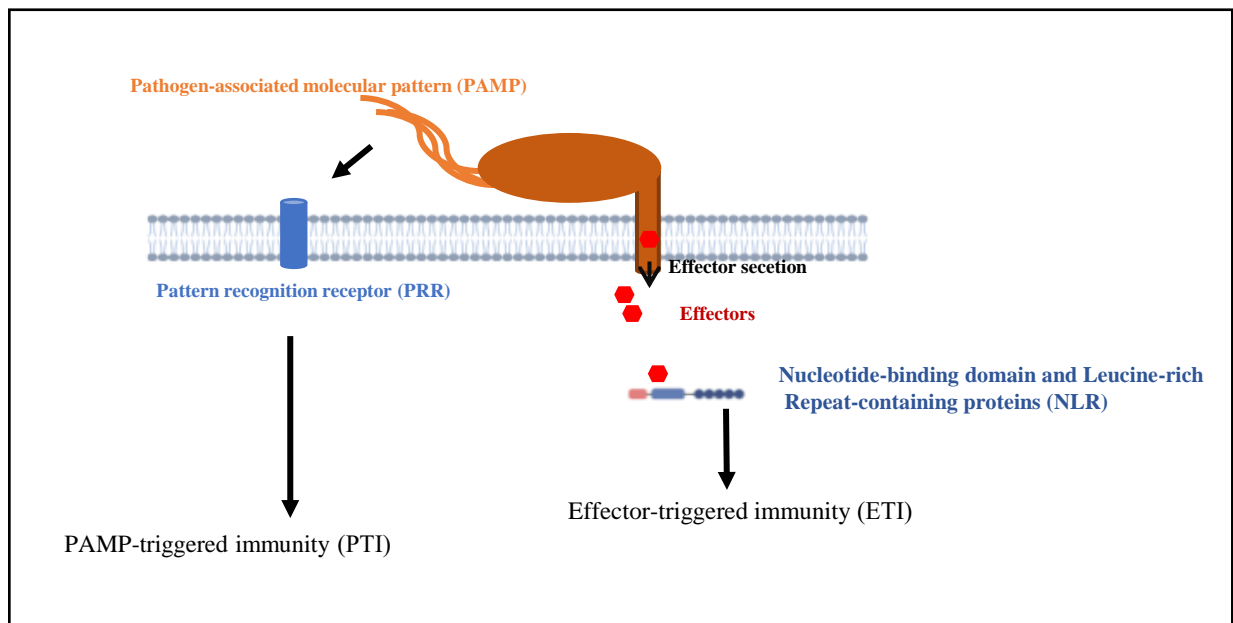


Figure 1 : Modes de perception des pathogènes et les réponses immunitaires qu'ils induisent.

Associated Molecular Pattern-Triggered (DAMP) déclenche la réponse PTI pour fournir un niveau basal de résistance. Dans la deuxième phase, cette résistance peut être contournée par des pathogènes qui produisent puis injectent dans le cytosol des protéines appelées effecteurs qui vont perturber l'établissement de la réponse PTI, cette réponse est appelée Effector-Triggered Susceptibility (ETS). Au cours de la troisième phase, certaines plantes ont acquis un système de défense basé sur la reconnaissance de certains effecteurs par des récepteurs de type NLR. Cette perception induit la réponse ETI, qui fournit un état de résistance plus fort que celui de la PTI et induit une réponse dite "hypersensible" (HR) se traduisant par une mort cellulaire programmée des cellules au site d'infection. Dans la quatrième phase, les pathogènes qui ont perdu ou modifié l'effecteur déjà reconnu par la plante vont induire, via la suppression de ETI, à leur tour le retour à état de sensibilité ETS. Dans la cinquième phase, grâce à la sélection certaines plantes vont acquérir de nouveaux allèles de gènes de résistance capable de reconnaître un des effecteurs nouvellement acquis pour induire de nouveau une ETI. La finalité de l'interaction va dépendre en fin de compte de la coévolution entre la plante et le pathogène.

2. Les modules MAPK sont des acteurs clés des signalisations immunitaires

a. Qu'est-ce qu'un module de signalisation MAPK chez les plantes ?

Les Mitogen-Activated Protein kinases (MAPK) sont des protéines kinases, c'est-à-dire, des enzymes capables de catalyser la phosphorylation des protéines sur des groupements OH des acides aminés: serine, thréonine et tyrosine. En effet, cette modification post-traductionnelle est la plus abondante chez les eucaryotes, elle permet de réguler de la fonction des protéines par la modification de leurs propriétés, telles que l'activité enzymatique, la localisation subcellulaire ou la stabilité (Bigeard et al., 2015).

Un module de signalisation MAPK est composé de trois protéines kinases : une MAPKKKinase (MAP3K), MAPKKinase (MAP2K), MAPK qui s'activent les unes les autres, de manière séquentielle, par une cascade de phosphorylations (fig. 3). Ces cascades fonctionnent généralement en aval des récepteurs et sont activées suite à la perception d'un signal par ces récepteurs. Une fois la dernière kinase de la chaîne active, elle phosphoryle ses substrats pour induire une réponse cellulaire adaptée au signal perçu (Xu and Zhang, 2015).

Les modules MAPK sont des acteurs ubiquitaires de la signalisation chez les eucaryotes. A cause de leur implication dans les différents processus biologiques, ils sont indispensables à la survie de ces organismes. Chez les plantes, ils sont impliqués dans la croissance, le

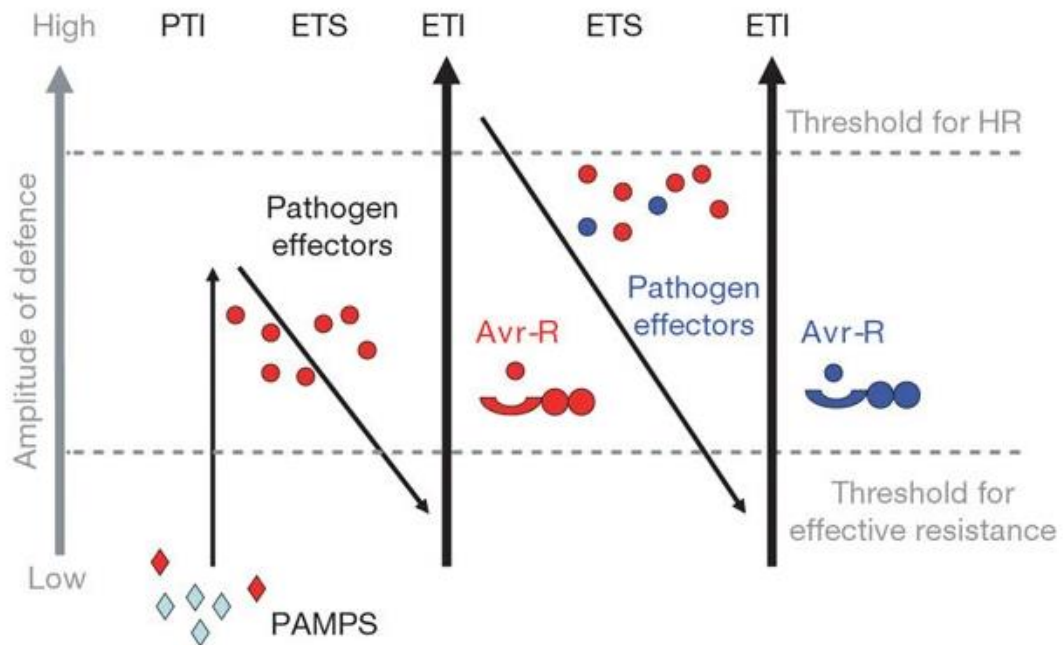


Figure 2 : Modèle en zigzag représentant le dialogue moléculaire qui s'opère entre la plante et le pathogène (Jones and Dangl, 2006).
 PAMP: Pathogen-Associated Molecular Pattern; Avr-R : reconnaissance de l'effecteur du pathogène par le récepteur de la plante; HR: Réponse Hypersensible

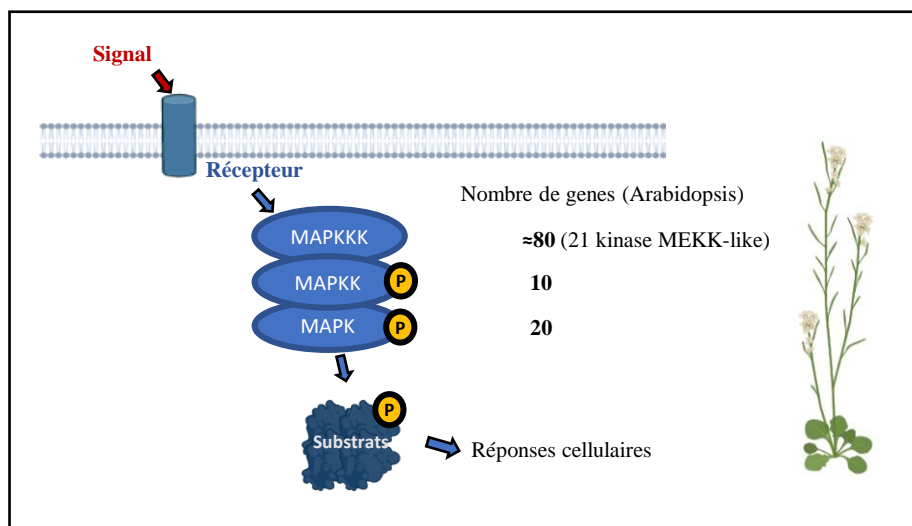


Figure 3 : Les modules MAPK sont impliqués dans la transduction d'un signal extracellulaire pour l'établissement d'une réponse cellulaire adaptée au signal perçu.

développent ainsi que dans les réponses aux stress biotiques et abiotiques (Xu and Zhang, 2015). Chez les plantes les modules MAPK sont codés par des familles multigéniques. Chez *Arabidopsis*, le génome code pour 20 MAPKs, 10 MAP2Ks et 80 MAP3Ks. Ces MAP3Ks sont classées en 3 sous familles par homologie avec les animaux. La sous famille MEKK like est la seule prouvée pour son implication dans les cascades MAPK (Cristina et al., 2010). Elle est constituée de 21 membres (Ichimura et al., 2002).

b. Rôle des MAPK dans les voies de signalisations immunitaires

L'établissement des réponses immunitaires passe par des étapes cruciales de perception, de transduction puis de réponse cellulaire pour permettre une réponse adéquate en fonction du stress subi. Les modules MAPK sont des acteurs indispensables dans la voie de transduction d'un signal de stress et notamment dans la perception des PAMPs où ils ont été particulièrement étudiés. Cette perception est assurée par les récepteurs de type PRR.

Plusieurs modules MAPKs sont impliqués en aval de ces récepteurs, notamment dans le cas PTI (fig. 4). La réponse PTI est stimulé par la perception PAMP. Ces motifs correspondent à des molécules abondamment produites par les pathogènes comme la flg22 qui est un peptide de 22 acides aminés constituant de la protéine du flagelle de la bactérie *Pseudomonas syringae* DC3000. La perception de ce motif est assurée par le récepteur FLAGELLIN SENSING2 (FLS2), en complexe avec son corécepteur, BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1 (BAK1). Dans les premières minutes suivant la perception, une multitude de réactions se produisent au niveau de la cellule, dont la formation de bursts oxydatif et calcique ainsi que l'activation de cascades de signalisation intracellulaires pour permettre l'établissement des réponses immunitaires. La NADPH oxydase, RBOHD va former les espèces réactives d'oxygènes (ROS) pour permettre l'établissement du burst oxydatif, les canaux calciques vont permettre l'accumulation Ca^{2+} dans le cytoplasme pour la formation du burst calcique, les protéines kinases dont les protéines kinases activées par le calcium, Calcium-dependent protein kinases (CDPK), interviennent dans la régulation d'une large gamme de protéines notamment les facteurs de transcription, enzymes métaboliques, et protéines du cytosquelette. En parallèle plusieurs modules MAPK sont activés. Le premier est constitué des kinases MAPKKK3/5-MKK4/MKK5-MPK3/MPK6, Le deuxième module est défini par les kinases MEKK1-MKK1/MKK2-MPK4. L'activation de ces 2 modules est rapide avec un pic d'activation entre 10 et 15 min. Une fois actives, les dernières kinases des modules, MPK3, MPK6, MPK4, vont phosphoryler leurs substrats, dont des facteurs de transcription et des enzymes. L'ensemble de

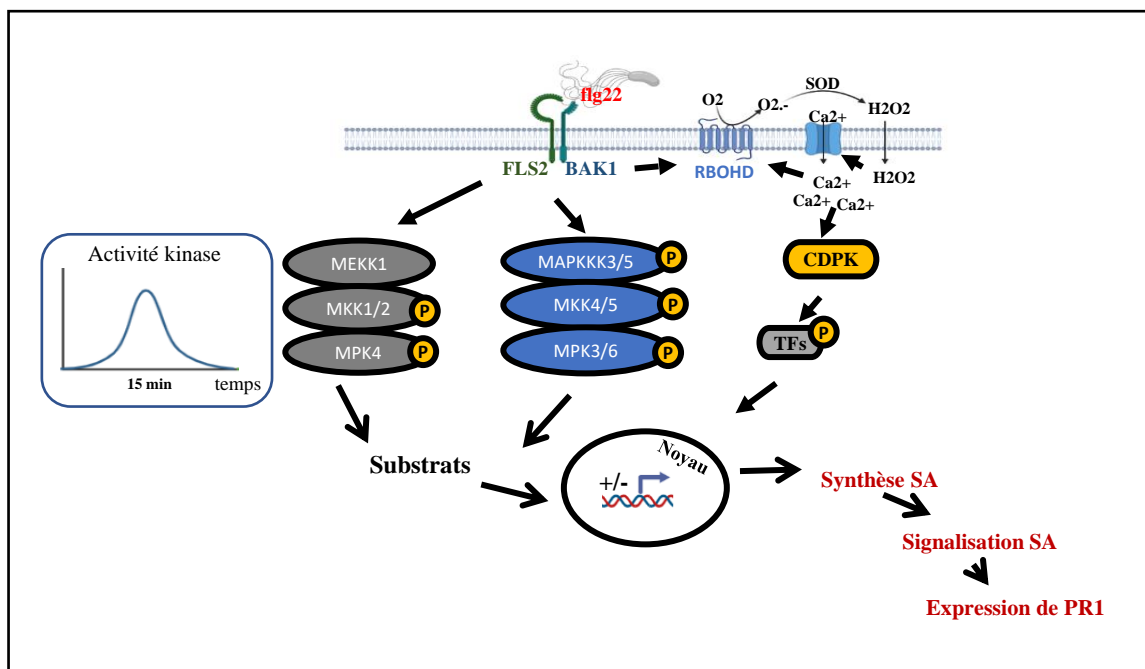


Figure 4 : Implication des modules « classiques », à activation rapide, dans la voie de signalisation déclenché par la flg22.
 SA : Acide Salicylique; SAR : Systemic Acquired Resistance; CDPK : Calcium-dependent protein kinase; TF : Transcription factors, PR1 : pathogenesis-related protein 1

ces réactions mène à une reprogrammation génétique pour permettre l'établissement des réponses immunitaires dont la résistance systémique acquise (SAR). Ceci implique la synthèse des phytohormones : l'acide salicylique (SA), l'éthylène (ET) et le jasmonate (JA), ainsi que la synthèse de composés antimicrobiens comme les PR protéines dont certains tel PR1 sont des marqueurs de la voie SA (Lang and Colcombet; Métraux, 2013)

c. Un nouveau module activé par les stress biotiques

Des résultats préliminaires du laboratoire suggèrent l'implication d'un troisième module MAPK dans la réponse immunitaire déclenchée par les PAMPs. En effet, l'activité de MPK7 a été vérifiée à partir de plantules cultivées in vitro et a permis de détecter une activation de cette MAPK en réponse au PAMP, flg22. MPK7 appartient à la famille des MAPK du sous-groupe C. Ce module est constitué de cette MAPK, de MKK3 et des MAP3K du clade III (13 à 21). Ce module a été caractérisé au laboratoire dans les contextes de blessure, en réponse à l'acide jasmonique et la sécheresse, en réponse à l'ABA (fig. 5). Des travaux en cours suggèrent aussi son rôle dans la signalisation nutritionnelle et la dormance. Le module est dit « atypique », car son activation dans les deux cas dépend de la néosynthèse des *MAP3K* du clade III ce qui résulte en une activation tardive (entre 1h et 2h). Le mutant *mkk3* du module est plus sensible à des stress biotiques et abiotique. En effet, il est plus sensible à l'infection par *Pseudomonas syringae* et présente une sensibilité face un herbivore, il est également sensible a la sécheresse à cause d'un problème de fermeture des stomates (Dóczi et al., 2007; Danquah et al., 2015; Sözen et al., 2020)

3. Problématique du stage

J'ai réalisé mon stage de deuxième année de Master à l'institut des sciences des plantes (IPS2) au sein de l'équipe stress signalling. Cette équipe s'intéresse à l'étude des voies de signalisation en réponse au stress et cherche à identifier le rôle de différents acteurs de ces voies tels que les modules MAPKs et les CDPK impliqués dans la transduction de divers signaux extracellulaires.

Dans le cadre de mon stage, je m'intéresse à définir le rôle du module atypique MKK3 dans la voie de signalisation immunitaire déclenchée par les PAMPs et plus particulièrement

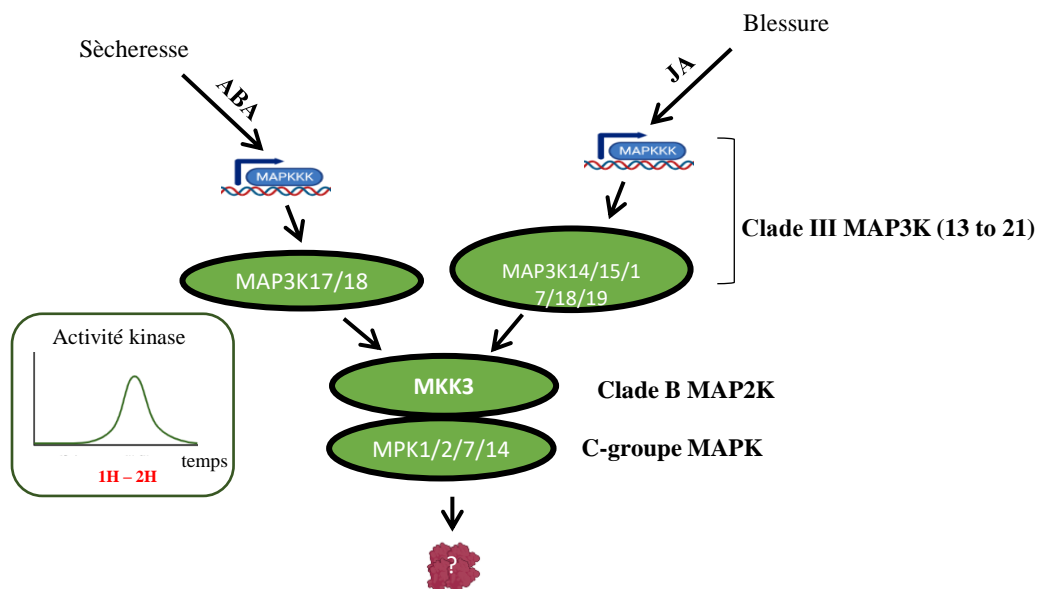


Figure 5 : Caractérisation du module atypique, MKK3, dans les contextes de la blessure et la sécheresse.

en réponse à flg22. Les objectifs de mon projet peuvent être organisés sur 3 axes de recherche :

Le premier cherche à identifier le module complet activé en réponse à la flg22. Puis si c'est le cas, je vérifierai si l'on retrouve une dépendance à la MAP2K, MKK3, pour l'activation du module ainsi que des cinétiques « lentes » d'activation similaires à celles retrouvées en réponse à l'ABA et à la blessure. Ensuite, je chercherai des *MAP3Ks* du clade III activés transcriptionnellement en réponse à la flg22 candidates pour médier l'activation du module en amont.

Le second axe a pour but de vérifier, dans le cas où l'activation du module en réponse à flg22 est confirmée, si cette activation est dépendante du module « rapide » MAPKKK3/5 - MKK4/MKK5 - MPK3/MPK6 déjà connu pour son activation en réponse à la flg22.

Le dernier vise plutôt à tester l'implication du module dans la résistance aux pathogènes et plus précisément dans les réponses immunitaires dépendantes du SA.

Afin de répondre à ces différentes questions, on réalise d'une part des traitements flg22 avec différentes cinétiques allant de 0 à 8h chez le fond génétique sauvage, Col0, et les fonds mutés pour les deux modules : *mkk3*, *mkk4mkk5* et *mkk3mkk4mkk5*. Puis on réalise des tests d'activité kinase qui permettent de mesurer l'activation du module, à travers l'activation de MPK7 ainsi que des RTqPCR pour vérifier les niveaux d'expression des *MAP3Ks* du clade 3. D'autre part, on effectue RTqPCR pour vérifier les niveaux d'expression un gene marqueurs de la voie SA, PR1.

II. Matériel et méthodes

1. Matériel végétal

L'ensemble des fonds génétiques ont été générés antérieurement à mon stage. L'ecotype Col-0 a été utilisé comme génotype sauvage. Le simple mutant *mkk3* a été généré par insertion T-DNA (Dóczi et al., 2007). Le double mutant *mkk4mkk5* a été obtenu par croisement des simples mutants générés par mutagène EMS et identification par TILLING (Su et al., 2017).

Le triple mutant a été généré au sein de l'équipe par croisement des mutants *mkk3* et *mkk4 mkk5* préalablement rétrocroisés.

2. Culture & Traitement

a. In vitro

Avant le semis, les graines sont stérilisées dans une solution de javel à 9,6 % pendant 15 min sous agitation, puis lavées 3 fois 5 min dans l'éthanol 70%, ensuite elles sont séchées sur du papier wathman stérile. Une quinzaine de graines sont semées à la volée sur du milieu MS/2 (1% sucrose, annexe 1) dans des boîtes de pétri 60x15mm. Afin de permettre une germination homogène, les graines sont mises 3 jours à l'obscurité à 4°C pour lever la dormance. Ensuite, elles sont mises à pousser une semaine dans une chambre de culture en condition de jours longs (16 heures de lumière/8h obscurité) à 20°C le jour et à 18 °C la nuit et à une hygrométrie de 50% le jour et la nuit. J'ai travaillé au départ avec des plantules cultivées in vitro, mais avec ce système j'ai eu beaucoup de contaminations que je n'est pas pu supprimées malgré plusieurs essais de protocole de stérilisation. Par conséquent, j'ai dû passer à un système de culture avec des plantes en pot qui a permis d'éviter ces problèmes.

Pour réaliser le traitement in vitro, il faut le préparer la veille du traitement. On sort les boîtes de pétri de la chambre de culture, on les dispose sur paillasse puis on rajoute un volume de milieu MS/2 liquide de manière à ce que toutes les plantules soient immergés. Ce volume doit être le même pour toutes les boîtes. Le lendemain on applique les traitements ABA, flg22 et mock. Les concentrations finales utilisées pour ABA et flg22 sont respectivement 10µM et 1µM.

J'ai réalisé deux répliques in vitro pour lesquels j'ai testé 5 points de cinétiques de traitement flg22 : 0', 15 min, 1h, 2h, 8h ou 24h. Le point 8h pour le premier répliques et 24h pour le deuxième. A chaque point de cinétique, les plantes sont rapidement collectées à la pince, mises dans du papier aluminium puis plongé dans l'azote liquide.

b. Plantes en pot « in vivo »

Quatre à cinq graines sont semées dans des pots sur du terreaux puis mises à pousser dans une chambre de culture en condition de jours court (8 heures de lumière) à 20°C le jour et 18°C la nuit et une HR à 50 pendant 6 semaines. Dans les premiers jours (4 à 5j) suivant le semis, on garde les deux plantes les plus espacées dans le pot et on élimine les autres. Les traitements sont réalisés par infiltration des feuilles à la seringue, on infiltre 2 feuilles par plante. La concentration utilisée pour le traitement flg22 est la même que celle in vitro. J'ai réalisé 3 répliques biologiques et pour lesquels j'ai testé 5 points de cinétiques de traitement

flg22 : 0', 15 min, 1h, 2h, 8h (annexe 2). A chaque point de cinétique, les feuilles infiltrées sont rapidement récoltées, mises dans des tubes puis plongé dans l'azote liquide. Pour chaque condition, on collecte dans deux tubes différents, l'un destiné à l'extraction de protéine et l'autre à l'extraction d'ARN.

3. Extraction des protéines & normalisation

L'extraction des protéines, l'immunoprécipitation de MPK7, les lavages des billes ainsi que le test d'activité kinase sont réalisés en deux jours. L'extraction des protéines et l'immunoprécipitation sont réalisés le premier jour puis la suite de l'immunoprécipitation et le test d'activité kinase sont réalisés le deuxième.

Avant d'entamer l'extraction des protéines, le matériel végétal est broyé. Le broyage est réalisé différemment pour les plantes cultivées in vitro et celles in vivo. Pour les échantillons in vitro j'ai broyé au mortier alors que les échantillons in vivo ont été broyés congelés grâce aux broyeurs à billes TissueLyser (deux fois 30 secondes à 26 Hz).

Afin d'extraire les protéines, le broyat est suspendu dans un tampon d'extraction non dénaturant (10% Laccus Buffer 10X, 20 mM NaF, 20 mM β -glycerophosphate, 5 mM DTT and EDTA-free protease inhibitors cocktail (cOmplete™, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail – Roche). Ce tampon est constitué du tampon Laccus-Ortiz-Masia 10X (annexe 3), des inhibiteurs de protéases, des inhibiteurs de phosphatases (NaF et β -glycerophosphate, DTT) pour maintenir l'état natif des protéines kinases. Les extraits sont ensuite centrifugés à 14000 rpm pour faire précipiter les débris cellulaires, puis on récupère le surnageant.

La quantité de protéines est mesurée à partir d'une dilution au 20^{ième} du surnageant par une coloration au Bradford. Dans les puits d'une plaque à 96 puits, on dépose 10 μ l d'échantillons dilués ainsi que série de la gamme de concentration de BSA puis on rajoute le même 250 μ l de Bradford (Coomassie (Bradford) Protein Assay reagent (Sigma aldrich N°23200)). Ensuite on relève les DO grâce au spectromètre Tecan à 595 nm et suivant le Protocol standard du constructeur. Apres quantification, on calcule les concentrations en protéines dans les échantillons grâce à la gamme d'étalonnage de BSA. Ces concentrations vont servir à la normalisation des échantillons destinés à l'immunoprécipitation et aux western blots. Pour l'immunoprécipitation on utilise entre 100 et 150 μ g de protéines en fonction de la disponibilité en protéines dans les extraits dans un même volume final. Alors que pour les westernblot on prépare classiquement des échantillons à 1 μ g/ μ l mais si la concentration de certains extraits

est plus faible on se met à la concentration la plus faible. On rajoute à un alicot un volume de leamli 6X (30% glycerol, 10% SDS, 0.6M DTT, 0.012% Bromophenol blue, 20% 1.75M Tris-HCl (pH 6.8)) de tel sorte à avoir une concentration finale de 1X leamli.

4. Immunoprécipitation, test d'activité kinase, western blot

a. Immunoprécipitation

L'immunoprécipitation de MPK7 consiste à faire précipiter spécifiquement la protéine MPK7 à l'aide d'un système de billes de sépharose couplé à l'anticorps spécifique à MPK7. A partir des échantillons normalisés, on rajoute un volume équivalent d'un mélange de billes de sépharose et de l'anticorps contre MPK7 puis on incube les échantillons sur une roue à 4°C toute la soirée.

Le lendemain, les échantillons sont centrifugés à 10000 rpm à 4°C pour faire précipiter les billes couplé à l'anticorps dirigé contre l'épitope de MPK7 (LYYHPEAEISNA). Avant de procéder au test d'activité kinase, les billes sont lavées trois fois. Les deux premiers lavages sont réalisés avec du tampon LOB 1X alors que le dernier est réalisé par un tampon kinase ((30 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EGTA, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT and 20 mM β-glycerophosphate)), un lavage consiste en premier à centrifuger les échantillons, pour la précipitation des billes, retirer le surnageant en gardant les billes au fond du tube puis rajouter le tampon. Le liquide résiduel est ôté avec une pipette.

b. Test d'activité kinase

Les tests d'activités kinases ont été réalisés par mon superviseur Julien LANG car ils nécessitent une habilitation pour manipuler de la radioactivité. Après le séchage les billes sont reprises dans du tampon kinase ((30 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EGTA, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT and 20 mM β-glycerophosphate)) contenant le substrat de phosphorylation Myelin basic protein (MBP), de l'ATP froid puis de l'ATP radioactif (³³P). Au bout de 30 minutes d'incubation la réaction est arrêtée par ajout de leamli X6 et chauffage 5 minutes à 95 °C puis les échantillons sont déposés sur gel SDS PAGE (en gel de polyacrylamide contenant du dodécylsulfate de sodium) à 15% d'acrylamide à 30mA par gel . Ensuite, les gels sont séchés puis mis dans une cassette d'autorographie pendant 24h. Le jour suivant, le signal de radioactivité est révélé par autorographie à l'aide d'un scanner Typhoon.

c. Western blots

Les échantillons sont déposés et mis à migrer par électrophorèse SDS-PAGE 10% avec un ampérage constant (30 mA par gel pendant 1h). Après migration, les protéines sont transférées sur des membranes PVDF préalablement activées à l'éthanol 100% suivant les recommandations du fabricant (BioRad). Les membranes sont ensuite bloquées, pendant 1h sous faible agitation, dans une solution de Tris-buffered saline with 0.1% Tween® 20 detergent (TBS-T) + 5% BSA pour l'anticorps α -pTpY, ou de TBS-T + 5% lait pour l'anticorps α -MPK7. Après le blocage, les anticorps primaires dilués dans du TBS-T+5% BSA pour l'anticorps α -pTpY ou dans TBS-T pour MPK7 sont ajoutés aux membranes puis laissés incuber toute la nuit à 4°C sous faible agitation. Les solutions de blocage et de dilution des anticorps primaires et secondaires ainsi que les dilutions utilisées sont résumées dans (annexe 4).

Le lendemain les membranes sont lavées 3 fois 10 min au TBS-T puis incubées pendant 1h avec l'anticorps secondaire couplé à l'enzyme peroxydase de raifort (HRP) diluée dans une solution de TBS-T+5% BSA pour l'anticorps α -pTpY ou dans TBS-T pour MPK7. Après 3 derniers lavages au TBS-T, l'activité HRP de la membrane est révélée grâce au réactif de chemiluminescence (Clarity Western ECL Substrate – Biorad). Le signal de chemiluminescence est ensuite acquis à l'aide du système d'imagerie ChemiDoc (Biorad). Après révélation, les membranes sont colorées par incubation avec du bleu de Coomassie pour vérifier la charge totale des protéines.

5. RTqPCR

L'extraction d'ARN est réalisée à partir d'un broyat des différents échantillons, à l'aide du kit Nucleospin™ RNA Plus, en suivant les instructions du fabricant. J'ai ensuite quantifié à l'aide d'un spectrophotomètre Nanodrop, puis normalisé les ARN pour avoir une concentration de 100ng/ μ l destinée à la transcription inverse. La synthèse du premier brin d'ADNc a été réalisée grâce à la transcriptase inverse SuperScript™ II en suivant les instructions du fabricant (annexes 5). J'ai utilisé des amorces Oligo(dT) pour la transcription inverse de tous les ARNm. À la fin de la réaction les ADNc sont dilués avec 80 μ l d'eau (sans DNAase) pour avoir une concentration finale de 10ng/ μ l. Les PCR quantitatives (qPCR) ont été réalisées avec un système LightCycler® 480 (96 puits), en utilisant le mélange prêt à l'emploi LightCycler® 480 SYBR Green I (Roche) et en suivant les instructions du fabricant. L'*actin2* (AT3G18780) a été utilisée comme gène de normalisation. À l'issue de cette

analyse, les Ct ont été mesurés pour chaque échantillon et chaque couple de primer. Le ct correspond au nombre de cycles nécessaires pour que le niveau de fluorescence atteigne le seuil de référence. Dans chaque échantillon et pour chaque couple d'amorces l'abondance est calculée grâce à l'équation $10^{(ct-24.313)/-3.4}$. L'expression relative pour chaque gène est ensuite obtenue par le rapport entre son abondance et celle de l'actine dans le même échantillon. J'ai réalisé ces qPCR sur trois réplicats biologiques. Les moyennes des niveaux d'expression entre les trois réplicats biologiques a été calculé pour les *MAP3K13* à *21* ainsi que pour *PRI* et ont été exploités pour les représentations graphiques des expressions relatives.

III. Résultats

1. Caractérisation du module atypique en réponse la flg22

a. Vérification de l'activation des modules « classiques » dans nos conditions expérimentales

Afin de vérifier le bon fonctionnement de notre système expérimental, j'ai réalisé des western blot pour détecter les formes phosphorylées sur la boucle d'activation de MPK3, MPK6 et MPK4 (fig. 5). Cette phosphorylation est connue pour provoquer l'activation des MAPKs et représente un bon indicateur, facilement détectable, de l'activation des modules. Par ailleurs, MPK3/4 et 6 n'ont pas le même poids moléculaire et migrent à différents niveaux, les trois bandes détectées en partant du haut correspondent à MPK6, MPK3 et MPK4. J'ai testé l'activation des modules classiques pour leur activation en réponse à la qui est bien connue (Bigeard, Colcombet, and Hirt 2015). Mes western blot confirment une activation des modules classiques en réponse à la flg22. En effet, à 15 min on détecte une forte phosphorylation de MPK3, MPK4, MPK6 chez Col-0 traité à la flg22 par rapport au temps 0 qui diminue fortement dès 1h. Le traitement à la seringue seul active également les MAPKs, est observée chez le Col-0 mock à 15 min et 1h pour MPK3 et MPK6 mais sans activation de MPK4 est spécifique à la flgg22. L'activation à 15 min n'est pas affectée chez le mutant *mkk3* par rapport au Col-0 alors que pour les mutants *mkk4mkk5* et *mkk4mkk5mkk3*, on détecte une réduction de l'activation du module par rapport au Col-0. Ces résultats montrent que phosphorylation MPK6, MPK3 et MPK4 est indépendante de MKK3. Il est connu que le mutant *mkk4mkk5* est un mutant partiel du module ce qui peut expliquer la forte activation résiduelle dans le background.

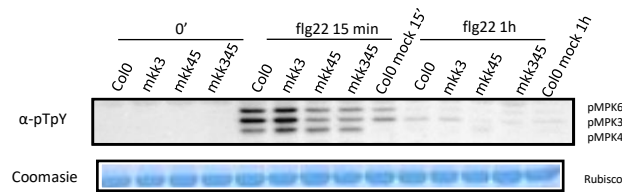


Figure 6: Activation des modules classiques en réponse à la flg22 dans nos conditions expérimentales. L'activation de MPK3, MPK6 et MPK4 a été testé par Western blot avec un anticorps anti-pTpY qui reconnaît les formes phosphorylés de ces MAPK, à partir de feuilles prétraitées à la flg22 dans le fond génétique sauvage, Col0, et les fonds mutants mkk3, mkk4mkk5 et mkk3mkk4mkk5 au temps de cinétiques indiqués (panneau du haut)

Le contrôle de charge a été réalisé par une coloration au bleu de Coomassie (panneau du bas)

mkk45: mkk4mkk5, mkk345: mkk3mkk4mkk5

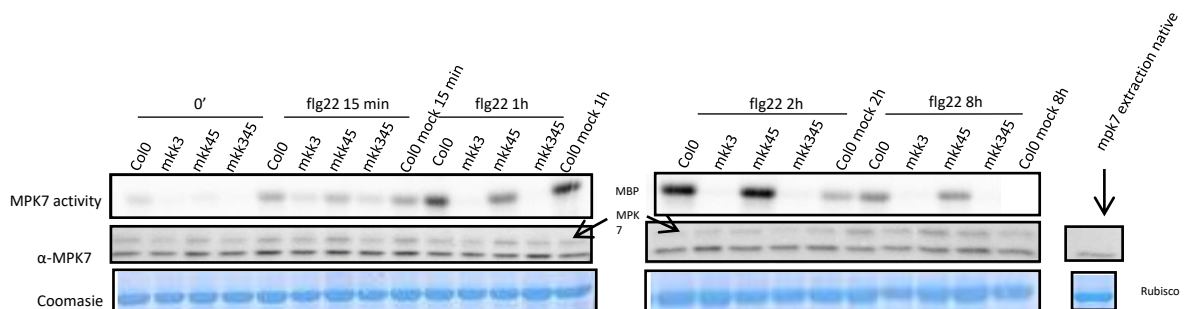


Figure 7 : Activation de MPK7 en réponse à la flg22, dépendance de MKK3 pour cette activation et indépendance du module MKK4/5-MPK3/6.

Test d'activité kinase sur MPK7 après immunoprécipitation avec un anticorps spécifique anti-MPK7 à partir de feuilles prétraitées à la flg22 dans le fond génétique sauvage, Col0, et les fonds mutants mkk3, mkk4mkk5 et mkk3mkk4mkk5 au temps de cinétiques indiqués (panneau du haut)

L'accumulation de la protéine MPK7 a été mesuré par Western Blot avec un anticorps spécifique anti-MPK7 à partir de feuilles prétraitées à la flg22 et à partir des mêmes extraits protéiques utilisé pour le test d'activité kinase (panneaux du milieu), en plus d'un extrait du mutant mpk7 (panneaux du milieu, à droite)

Le contrôle de charge a été réalisé grâce a une coloration de la membrane au bleu de Coomassie

mkk45: mkk4mkk5, mkk345: mkk3mkk4mkk5

b. Activation de MPK7 en réponse à la flg22 et dépendance de MKK3 pour cette activation

Les tests d'activité kinase ont détecté une activation de MPK7 chez Col-0 traité à la flg22 sur les temps de cinétiques de 15 min, 1h, 2h et 8h par rapport au temps 0 ou l'activité n'est pas observable (fig. 6). Cette activation augmente entre 15 min et 2h pour atteindre l'activité la plus importante à 2h puis rediminue à 8h pour atteindre un niveau d'activation similaire à celui observé à 15 min. La manipulation (mock) semble également activer MPK7, aux cinétiques 15 min et 1h on observe une activation chez le Col-0 mock similaire à celle détectée chez les plantes Col-0 traitées à la flg22 mais la différence reste observable à 2h et à 8h. Donc, les points 2h et 8h sont les seuls où on peut conclure une activation en réponse à la flg22. Ces cinétiques d'activation sont similaires aux premières expériences que j'ai réalisées in vitro (annexe 6) à la différence de l'effet de la manipulation (mock) sur l'activation de MPK7 qui se manifeste plus fortement in vivo que in vitro. In vitro, l'activation de MPK7 en réponse à la flg22 est plus forte que celle induite par le traitement mock pour tous les points de cinétiques avec l'activation la plus forte observée à 2h. Contrairement au génotype sauvage, aucune activation de MPK7 n'est détectée en réponse à la flg22 chez le mutant *mkk3* quelles que soient les conditions de traitement, ce qui permet de conclure que l'activation de MPK7 est dépendante de MKK3 (fig. 6). Les western blots utilisant l'anticorps contre la protéine MPK7 ont permis de détecter deux bandes avec une accumulation de protéines globalement similaire entre les différentes conditions. La bande du haut est celle qui se rapproche le plus de la taille de MPK7 (42 kDA), la perte de cette bande chez le mutant *mpk7* permet de conclure qu'elle correspond bien à la protéine MPK7 (fig. 6).

c. Identification de MAP3K candidates pour médier via une régulation transcriptionnelle l'activation du module MKK3-MPK7 par la flg22.

Le module MKK3-MPK7 a été caractérisé pour son activation en réponse à la blessure et à l'ABA. Dans ces contextes de stress, l'activation du module passe une néosynthèse de *MAP3K* du clade III. Par conséquent, leur surexpression en réponse à la flg22 suggère leur implication pour l'activation du module dans ce contexte. Pour identifier les MAP3Ks candidates pour médier cette réponse, j'ai réalisé des qPCR sur les *MAP3Ks* du clade III en réponse à des traitements mock et flg22. Les niveaux d'expression des *MAP3K* du clade III (13 à 21), en réponse aux traitements flg22 et mock ont été exprimés en fold-change par rapport au contrôle 0 qui n'a subi aucun traitement (fig. 7). Le rapport des niveaux

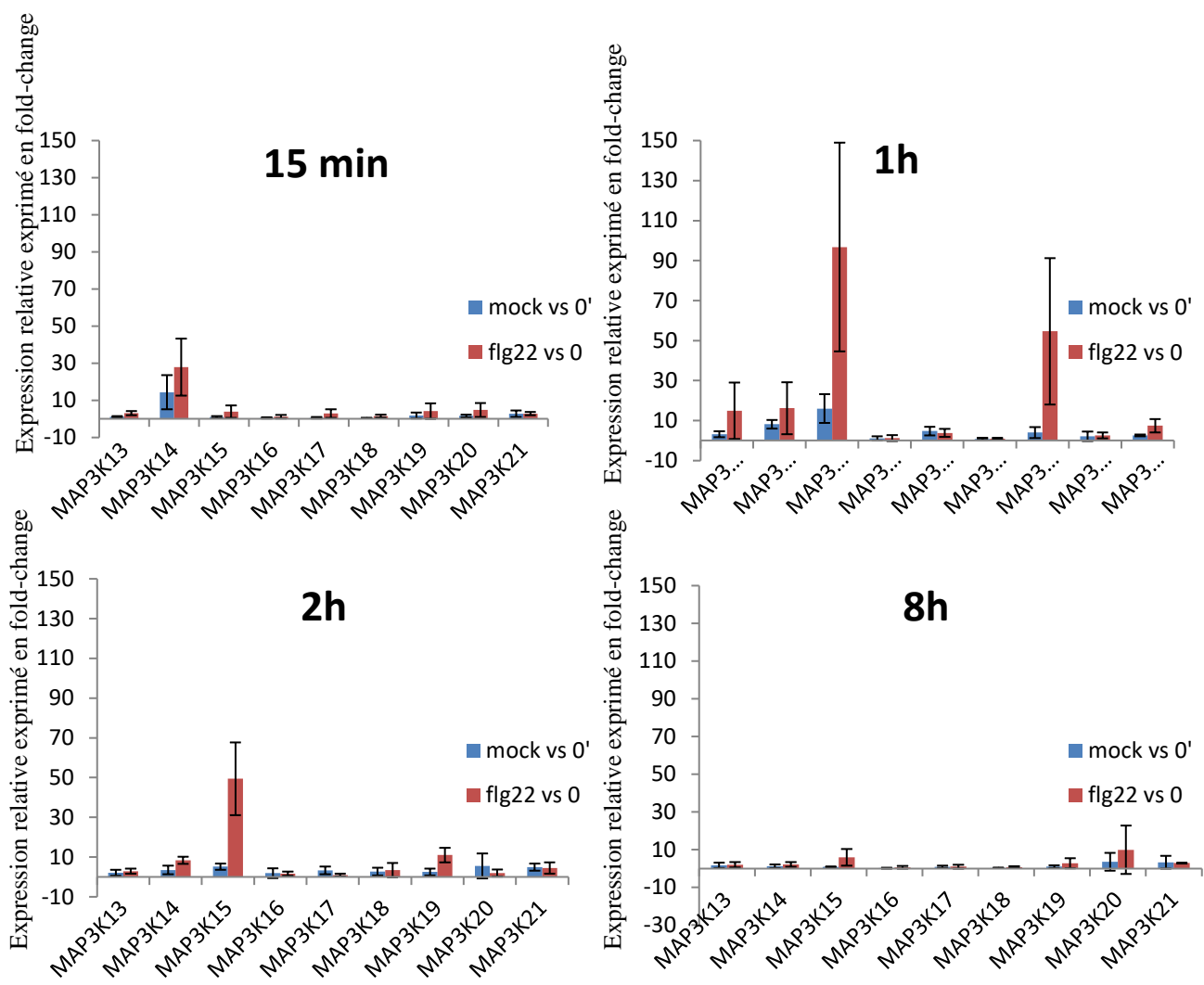


Figure 8: Identification de MAP3K du clade III surexprimés en réponse à la flg22.

RTqPCR représentant les expressions relatives exprimés en fold-change par rapport au contrôle 0 des gènes de MAP3Ks du clade III dans le fond génétique sauvage Col-0.

mock vs 0 : rapport des niveaux d'expression entre le traitement mock et le contrôle 0

flg22 vs 0 : rapport des niveaux d'expression entre le traitement flg22 et le contrôle 0

Les barres d'erreurs représente l'écartype calculé à partir des trois réplicats biologiques

mkk45: mkk4mkk5, mkk345: mkk3mkk4mkk5

d'expression entre le traitement mock et le contrôle 0 représente l'effet unique du traitement mock (histogramme bleu). La comparaison de l'effet mock avec le rapport des niveaux d'expression entre le traitement flg22 et le contrôle 0 (histogramme rouge) permet de discerner l'effet du traitement flg22. L'effet du traitement mock semble globalement un effet faible pour toutes les *MAP3K*, avec des fold changes qui ne dépassent pas 5 sauf pour la *MAP3K14* à 15 min et la *MAP3K15* à 1h. En réponse à la flg22, on détecte une forte surexpression des *MAP3K15* et *MAP3K19*. A 1 h, la *MAP3K15* est 6 fois plus surexprimée par rapport à l'effet mock et la *MAP3K19* est 10 fois plus surexprimé par rapport à l'effet mock. A 2h, on retrouve une forte surexpression de la *MAP3K15*, 10 fois plus que l'effet mock, ainsi qu'une plus faible surexpression de la *MAP3K19*, 4 fois plus que l'effet mock. D'autre part, en réponse à la flg22, les *MAP3K14* (à 15 min, 1h et 2h), *MAP3K20* (à 8h) et *MAP3K21* (à 1h) sont plus faiblement surexprimées, de l'ordre de deux fois plus que l'effet mock avec des barres d'erreurs chevauchantes.

D'une part, ces résultats montrent que globalement le traitement mock ne semble pas induire la surexpression des *MAP3Ks* sauf pour les *MAP3K14* à et *MAP3K15* à 15 min et à 1h respectivement. D'autres part, en réponse à la flg22, les *MAP3K15* et *MAP3K19* sont fortement surexprimé à 1h et à 2h mais plus faiblement à 2h par rapport à 1h pour *MAP3K19*. Par ailleurs, les *MAP3K14*, *MAP3K20* et *MAP3K21* sont plus faiblement surexprimées en réponse à la flg22. Donc, les *MAP3K15* et *MAP3K19* sont les meilleurs candidats pour médier l'activation du module MKK3-MPK7.

2. Dépendance du module classique pour l'activation de MPK7 par la flg22

J'ai montré précédemment l'activation de MPK7 en réponse au PAMP, flg22, ainsi que la dépendance de MKK3 pour cette activation. J'ai confirmé également que dans nos conditions expérimentales le module classique MKK4/MKK5 - MPK3/MPK6 déjà caractérisé en réponse à la flg22 était activé par ce PAMP. L'activation des deux modules en réponse à la flg22 suggère une possibilité de dépendance du module classique activé rapidement pour l'activation de MPK7, activé plus tardivement. Pour vérifier cela, j'ai mesuré l'activité kinase de MPK7 chez le mutant du module classique *mkk4mkk5* (fig. 6).

En réponse à la flg22, on détecte une activation de MPK7 chez le mutant *mkk4mkk5*. Cette activation est similaire à celle observée chez le Col-0 traité à la flg22 à 15 min, 1h, 2h et 8h. Ce résultat suggère que l'activation de MPK7 en réponse à la flg22 est indépendante du module classique, par conséquent les deux modules sont indépendants. Comme attendu

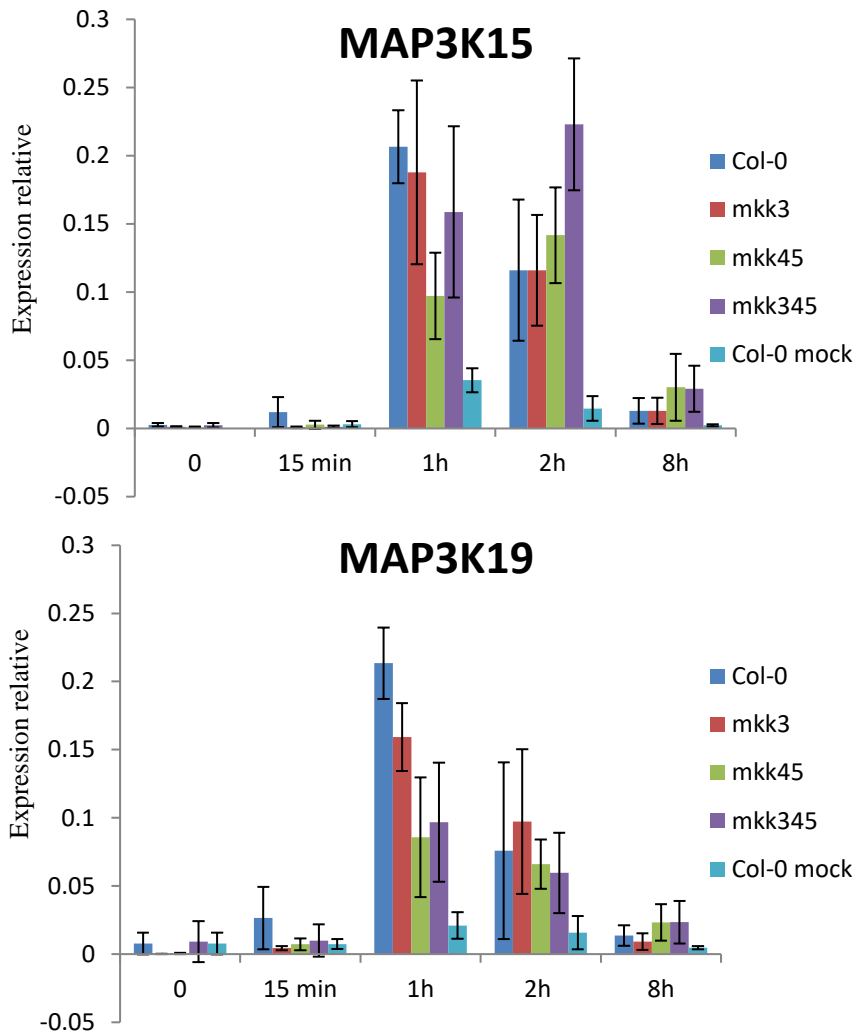


Figure 9 : Dépendance du module atypique et du classique pour l'expression des MAP3K15 et MAP3K19 en réponse à la flg22.

RTqPCR représentant les expressions relatives des gènes des MAP3K15 MAP3K19 dans le fond génétique sauvage, Col0, et les fonds mutés pour les deux modules : mkk3, mkk4mkk5 et mkk3mkk4mkk5. Les barres d'erreurs représentent l'écartype calculé à partir des trois réplicats biologiques. mkk45: mkk4mkk5, mkk345: mkk3mkk4mkk5

l'activité de MPK7 n'est pas détectable dans de triple mutant *mkk3mkk4mkk5*, confirmant que MKK3 est strictement nécessaire pour l'activation du module atypique (fig. 6).

J'ai montré précédemment que les *MAP3K15* et *MAP3K19* semblent de bons candidats, à cause de leur forte expression en réponse à la flg22, pour médier l'activation du module MKK3-MPK7 en réponse à ce PAMP (fig. 7). Pour comprendre comment l'expression de ces *MAP3K* est régulé en réponse à la flg22, j'ai analysé leur expression dans les fonds génétiques *mkk4mkk5*, *mkk3*, *mkk4mkk5mkk3*. J'ai pu ainsi vérifier la dépendance du module classique MKK4/5-MPK3/6, la dépendance de la MAP2K, MKK3, ainsi que la contribution des deux pour leur surexpression (fig. 8).

Au temps 0, les niveaux d'expression sont faibles. Cette expression représente le niveau basal de l'expression en absence de traitement. A 15 min et à 8h les niveaux d'expression restent similaires au temps 0 avec des différences relativement faibles entre les différents fonds génétiques et traitements sauf pour le Col-0 traité à flg22 qui est 5 à 10 fois surexprimé par rapport au Col0 mock. Les niveaux d'expression les plus importants pour le Col0 traité à la flg22 comparé aux Col0 mock sont détectés à 1h et à 2h pour les deux *MAP3K* mais les différences entre les fonds génétiques se manifeste le plus à 1h. Sur ce point de cinétique, en réponse à la flg22, on observe une réduction des niveaux d'expression des *MAP3K15* et *MAP3K19* chez les mutants par rapport au Col0. D'une part, le mutant *mkk3* perd un quart de son niveau d'expression par rapport au Col0 pour la *MAP3K19* mais cette différence reste moins évidente pour la *MAP3K15* car les barres d'erreur sont chevauchantes. Ces résultats suggèrent que MKK3 est partiellement impliqué dans la surexpression de *MAP3K19* en réponse à la flg22 mais pas pour la *MAP3K15*. D'autre part, le mutant *mkk4mkk5* perd 50% environ de son niveau d'expression des *MAP3K15* et *MAP3K19* par rapport au Col0. Ceci suggère que le module classique contrôle la moitié de la surexpression des *MAP3K15* et *MAP3K19* induite en réponse à la flg22. Par ailleurs, le triple mutant *mkk3mkk4mkk5* présente un niveau d'expression comparable à celui du mutant *mkk4mkk5* pour la *MAP3K19* et un quart plus faible que le Col0 pour la *MAP3K15*, ce qui suggère que la contribution de MKK3 pour la surexpression de *MAP3K19* est dépendante du module classique.

3. Rôle du module atypique dans l'expression du gène PR1

L'activation du module MKK3-MPK7 en réponse au PAMP, flg22, que j'ai montré précédemment suggère fortement une implication dans les voies de signalisation immunitaires chez Arabidopsis. Pour tester le rôle du module dans la voie de l'acide salicylique, j'ai réalisé des qPCR pour un gène marqueur de cette voie, *PR1* (fig. 9). Ces résultats montrent une forte induction de *PR1* chez le Col-0 après 8h du traitement flg22. Au point 8h, en réponse à la flg22, les niveaux d'expression sont 7 à 8 fois plus faibles chez tous les mutants par rapport au Col-0. La réduction de cette surexpression chez les mutants *mkk4mkk5*, *mkk3*, *mkk4mkk5mkk3* montre que la surexpression de *PR1* en réponse à la flg22 dépend du module classique MKK4/5-MPK3/6, de la MAP2K, MKK3 et d'une implication commune du module classique MKK4/5-MPK3/6 et de la MKK3 qui permet cette régulation.

IV. Discussion

J'ai pu montrer précédemment que mon mode expérimental fonctionne correctement grâce à la reproduction d'un résultat déjà décrit dans la littérature. En effet, j'ai pu vérifier l'activation des modules classiques en réponse à la flg22 et avec les mêmes cinétiques décrites dans la littérature, grâce à la détection des MPK3, MPK6, MPK4 phosphorylés sur leur boucle d'activation chez les plantes sauvages (fig. 5). Cette activation par la flg22 est observée chez *mkk4mkk5* mais avec un niveau plus faible que chez Col-0. En fait, le mutant *mkk4mkk5* est un mutant partiel du module (Zhao et al., 2014; Su et al., 2017). Le mutant *mkk4* à partir duquel le mutant a été généré porte une substitution (proline-240 à serine) et n'est pas un mutant nul (Zhao et al., 2014). D'autre part, le traitement mock activait MPK3 et MPK6 mais pas MPK4, ce traitement à la seringue inflige une blessure qui active MPK3 et MPK6 mais pas MPK4 dont l'activation est indépendante de la blessure mais qui est plutôt activée en réponse à la flg22 (Sözen et al., 2020 ; Bigeard et al., 2015).

Les tests d'activité kinase analysés précédemment ont permis de caractériser pour la première fois le module MKK3-MPK7 en réponse à la flg22 (fig. 6). Comme dans les contextes de la blessure et de la sécheresse l'activation du module se produit entre 1h et 2h, en réponse à la flg22, on retrouve une activation tardive du module, l'activité la plus importante étant enregistrée à 2h. Les essais *in vitro* confirment également l'activation de MPK7 en réponse à la flg22 avec les mêmes cinétiques d'activation (annexe 6). Cependant, le mode de traitement *in vitro* semble plus optimal car il n'inflige pas des blessures à la plante contrairement au

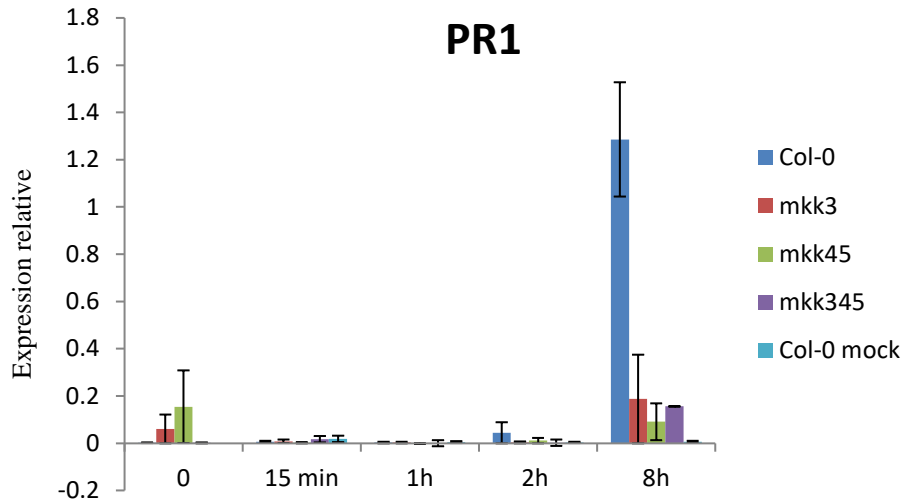


Figure 10 : Dépendance du module atypique et du classique pour l'expression du gène *PR1* en réponse à la flg22.

RTqPCR représentant les expressions relatives des gène *PR1* dans le fond génétique sauvage, Col0, et les fonds mutés pour les deux modules : *mkk3*, *mkk4mkk5* et *mkk3mkk4mkk5*

Les barres d'erreurs représente l'écartype calculé à partir des trois réplicats biologiques
mkk45: *mkk4mkk5*, *mkk345*: *mkk3mkk4mkk5*

traitement par infiltration qui blesse la plante et qui par conséquent induit l'activation de MPK7 en réponse à la blessure, c'est probablement pour cette raison qu'on n'arrive pas à discerner l'effet du mode de traitement (mock) du traitement flg22 en lui-même sur certains points de cinétiques *in vivo* mais pas *in vitro*.

Les MAPK du sous-groupe C (MPK1, MPK2, MPK7 et MPK14) ont été identifiés et intégrés au module atypique (fig. 5) d'une part grâce à leur capacité d'interagir avec MKK3 et d'autre part à cause de leur activation médiée par MKK3 (Dóczi et al., 2007). MPK7 est la seule MAPK du sous-groupe C pour laquelle j'ai testé l'activation en réponse à la flg22. Par conséquent, MPK1, MPK2 et MPK14 constituent de bons candidats à intégrer au module en plus de MPK7 en réponse à la flg22.

D'autre part, j'ai montré l'importance de MKK3 pour l'activation de MPK7. Cette dépendance se manifeste par une perte totale d'activation de MPK7 en réponse à la flg22 chez le mutant *mkk3* par rapport au Col-0 (fig. 6). L'activité de MPK7 n'est plus détectable dans les mutants *mkk3* et *mkk3mkk4mkk5*, donc MKK3 est strictement nécessaire pour l'activation du module atypique. C'est ce qui a été déjà montré dans le laboratoire dans les contextes de la blessure et la sécheresse (Danquah et al. 2015; Dóczi et al. 2007; Sözen et al. 2020).

La caractérisation du module atypique MKK3 dans les contextes de réponse à l'ABA et de blessure a permis d'identifier un mode d'activation du module médié par la néo-synthèse des MAP3K du clade III et qui résulte en une activation tardive (entre 1h et 2h) (Danquah et al. 2015; Sözen et al. 2020). Ces éléments suggèrent que le module MKK3-MPK7 est activé par ce même système. Pour tester partiellement cette hypothèse, j'ai réalisé des RTqPCR pour l'expression des *MAP3K* du clade III en réponse à la flg22. J'ai ainsi identifié les *MAP3K15* et *MAP3K19* comme les meilleurs candidats pour médier l'activation du module par la flg22. Pour démontrer leur implication, il faudrait réaliser des tests d'activité kinases sur MPK7 en réponse à la flg22 chez les simples et double mutant de ces *MAP3Ks* puis regarder si l'activation de MPK7 est affectée.

Par ailleurs, j'ai aussi trouvé une surexpression des *MAP3K14* et *MAP3K15* à 15 min et à 1h respectivement en réponse au traitement mock. Ces deux MAP3K font partie des MAP3K du clade III surexprimé en réponse à la blessure (Sözen et al. 2020). En effet, les traitements *in vivo* appliqués à la seringue infligent des blessures et pourraient expliquer cet effet.

J'ai également pu montrer que l'activation du module MKK3-MPK7 en réponse à la flg22 est indépendante du module classique MKK4/5-MPK3/6. En effet, les tests d'activité kinase

montrent que l'activation de MPK7 en réponse à la flg22 chez Col-0 est maintenue chez le mutant *mkk4mkk5* (fig.6). Cette indépendance a été également prouvée dans le contexte de la blessure (Sözen et al. 2020).

L'expression des *MAP3K15* et *MAP3K19* a été analysée par RTqPCR dans les fonds génétiques *mkk4mkk5*, *mkk3*, *mkk4mkk5mkk3* pour vérifier la dépendance du module classique MKK4/5-MPK3/6, la dépendance de la MAP2K, MKK3, ainsi que la contribution des deux en réponse à la flg22. L'analyse de ces résultats suggère qu'au temps de cinétique 1h, MKK3 est partiellement impliqué dans la surexpression de *MAP3K19* en réponse à la flg22 mais pas pour la *MAP3K15*. Les mécanismes par lesquels MKK3 pourrait contrôler les niveaux d'expression des *MAP3Ks* en amont du module restent à déterminer. Pareillement il apparaît que le module classique contrôle la moitié de la surexpression des *MAP3K15* et *MAP3K19* induite en réponse à la flg22 à 1h. Cette interprétation est toutefois à prendre avec précaution puisque nous n'observons pas une diminution de l'expression de *MAP3K15* dans le fond *mkk3mkk4mkk5*. En outre la dépendance de l'expression des *MAP3K15* et *MAP3K19* vis-à-vis du module MKK4/5 est a priori contradictoire avec nos résultats décrits plus haut et montrant que l'activation de MPK7 n'est pas affectée par la mutation *mkk4mkk5*. Ceci mène à deux hypothèses explicatives: soit les niveaux d'expression de *MAP3K15* et *MAP3K19*, bien que diminués dans le fond *mkk4mkk5*, restent suffisants pour provoquer une activation complète du module, soit ces deux *MAP3Ks* contribuent en fait prioritairement à l'activation en aval d'autres MAPKs que MPK7. En ce sens mesurer l'activité en réponse à Flg22 des autres MAPKs du sous-groupe C (MPK1/2/14) s'avérerait particulièrement intéressant.

J'ai montré précédemment que le module MKK3-MPK7 est activé en réponse au PAMP, flg22. La reconnaissance de ce motif est déjà connue pour déclencher la réponse PTI où les modules MAPK jouent un rôle clé pour la transduction du signal et ainsi permettre l'établissement de la réponse immunitaire (Bigéard et al. 2015). L'activation du module MKK3-MPK7 en réponse au PAMP, suggère fortement une implication de celui-ci dans la réponse immunitaire en général et dans la PTI en particulier.

L'analyse des niveaux d'expression du gène marqueur de la réponse SA, *PR1*, a permis de détecter une forte surexpression tardive de *PR1* chez le Col-0 traité à la flg22. Sur ce même point de cinétique, cette surexpression est fortement réduite et de la même manière chez les mutants *mkk3*, *mkk4mkk5*, *mkk4mkk5mkk3* (7 à 8 fois moins que Col-0) en réponse à la flg22. Comme attendu, l'expression tardive de *PR1* ainsi que la perte de sa surexpression chez le mutant *mkk4mkk5* était déjà décrits (Lang et al., 2022). En revanche, la perte de la

surexpression de PR1 chez les mutants *mkk3* et *mkk4mkk5mkk3* représente un résultat nouveau et très prometteur qui tend à prouver l'implication de la MAP2K, MKK3 dans la réponse SA. En outre le fait que la diminution d'expression de PR1 soit similaire dans les fonds *mkk3*, *mkk4mkk5* et *mkk3mkk4mkk5* semble indiquer que les 3 MAP2Ks agissent à ce niveau-là dans une même voie de signalisation.

Pour vérifier plus directement le rôle du module MKK3-MK7 dans l'immunité des plantes des pathoassays sont prévus plus tard au cours de ce stage. Cette expérience va consister à tester la sensibilité chez le fond génétique sauvage, Col0, et les fonds mutés pour les deux modules : *mkk3*, *mkk4mkk5* et *mkk3mkk4mkk5* pour voir la contribution individuelle et commune des modules atypique et classique.

A plus long terme une question qu'il sera important d'adresser concerne la nature des substrats du module.....