

Université de Montréal

**Caractérisation de la protéine ScFRK3 une protéine kinase de type MAP4K
impliquée dans le développement du fruit et des graines chez *Solanum
chacoense* Bitt.**

Par Geneviève Major

Département de Sciences biologiques

Faculté des Arts et des Sciences

11641126

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M. Sc.)

Mars, 2005

© Geneviève Major 2005



QK

3

U54

2005

v. 003



Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Page d'identification du jury

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :
**Caractérisation de la protéine ScFRK3 une protéine kinase de type MAP4K
impliquée dans le développement du fruit et des graines chez *Solanum
chacoense* Bitt.**

Présenté par :
Geneviève Major

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Président-rapporteur: Dr Hargurdeep Saini
Membre du jury : Dr Nathalie Beaudoin
Directeur de recherche : Dr Daniel P. Matton

Mémoire accepté en mars 2005

Résumé

Le présent mémoire porte sur la caractérisation d'une protéine de type MAP4K fortement exprimée dans les ovaires de la plante *Solanum chacoense* Bitt. nommée *S. chacoense* Fertilization Related Kinase 3 (ScFRK3). La comparaison de la séquence en acides aminés de cette protéine avec la base de donnée informatique du NCBI a permis le classement de cette protéine dans le groupe des sérine/thréonine kinases, plus spécifiquement dans la famille des « Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinases » (MAP4K). Les protéines de type MAP4K sont impliquées dans les voies de signalisation intracellulaire des cascades de MAPK, dans l'apoptose et dans le réarrangement du cytosquelette chez les animaux et les levures. Cette famille de protéine kinase est bien caractérisée chez les animaux et les levures, mais aucune protéine de ce type n'a de fonction connue chez les végétaux. Aussi, avons-nous entrepris une caractérisation de la protéine ScFRK3 basée sur l'analyse des patrons d'expression d'ARNm isolé de divers tissus de la plante, sur l'observation de phénotypes résultant de la transformation de plantes avec une construction causant un phénomène d'interférence d'ARN ciblé contre le messenger de la protéine ScFRK3, et enfin par la recherche d'interactants protéiques obtenus dans le système de double-hybride chez la levure. Les résultats obtenus indiquent que la protéine ScFRK3 est principalement exprimée dans les organes reproductifs femelles avant et après fécondation, qu'elle est indispensable à la production de fruits de tailles comparables à celles des fruits des plantes de type sauvage et de la production de graines matures. Aussi, les interactants protéiques identifiés lors des criblages de double-hybride sont presque tous impliqués dans les étapes de la reproduction, allant de la formation des ovules, au guidage du tube pollinique lors de la fécondation jusqu'à l'abscision des fruits. La protéine ScFRK3 agirait donc dans de multiples voies de signalisation impliquées dans la reproduction sexuée végétale, ajoutant des indices pour appuyer notre hypothèse impliquant ScFRK3 dans la reproduction végétale.

Mots-clefs : MAP kinase, MAP4 kinase, embryogénèse, plantes transgéniques

Abstract

The present master thesis is about the characterization of a MAP4K protein expressed in ovaries of the organism *Solanum chacoense* Bitt., named *S. chacoense* Fertilization Related Kinase 3 (ScFRK3). The comparison of the amino acids sequence of this protein with the database publicly available showed that ScFRK3 is closely related with protein of the serine/threonine kinase group, more specifically in the Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase Kinases (MAP4K). MAP4K proteins are component of MAPK intracellular signal transduction pathway, apoptosis and have been shown to be involved in the cytoskeleton rearrangement. This protein family is well characterized in the animal kingdom and yeast , but no function has yet been ascribed to any plant MAP4K proteins. With this in mind, we decided to characterize the ScFRK3 protein using the RNA expression patterns, the observations of phenotypes resulting in RNAi plant transformations, and by doing two-hybrid screening experiences to find interacting protein partners. The results showed that the ScFRK3 protein is mostly expressed in the female reproductive organ, before and after fertilization, and that this protein is necessary for the production of fruits of normal sizes and for mature seed formation. The proteins isolated through a two-hybrid screening are all involved in various reproductive processes, from ovule formation to fertilization and fruits abscission. The ScFRK3 protein is thus most probably involved in numerous signaling pathways involved in fruit development and plant sexual reproduction.

Keyword: MAP kinase, MAP4 kinase, embryogenesis, transgenic plants, two-hybrid

Table des matières

<i>Résumé</i>	<i>iii</i>
<i>Abstract</i>	<i>iv</i>
<i>Table des matières</i>	<i>v</i>
<i>Liste des graphiques</i>	<i>viii</i>
<i>Listes des tableaux</i>	<i>ix</i>
<i>Liste des figures</i>	<i>x</i>
<i>Liste des sigles et des abréviations</i>	<i>xii</i>
1. Introduction	1
1.1. Reproduction végétale	1
1.1.1. Formation des gamètes femelles ou mégaspores.....	1
1.1.2. Développement des gamètes mâles ou microspores.....	3
1.1.3. Fécondation : deux fois c'est mieux!.....	4
1.1.4. Développement embryonnaire, fructification et abscission.....	6
1.1.5. Types de reproductions asexuelles.....	6
1.1.6. Rôles de l'éthylène.....	7
1.1.7. Interaction entre les protéines de signalisation et les récepteurs.....	8
1.1.8. Protéines G hétérotrimériques et récepteurs : végétaux versus animaux.....	8
1.2. Cascades de MAPK	10
1.2.1. Voies de MAPK chez les plantes.....	12
1.2.2. Contrôle et organisation des cascades.....	15
1.2.3. MAPK.....	16
A) Présentation générale de la protéine.....	16
B) MAPK végétale.....	17
1.2.4. MAP2K.....	17
A) Présentation générale de la protéine.....	17
B) MAP2K végétale.....	17
1.2.5. MAP3K.....	18
A) Présentation générale de la protéine.....	18
B) MAP3K végétale.....	18
1.2.6. MAP4K.....	19
A) Présentation générale de la protéine.....	19
B) Classement des MAP4K en deux sous-groupes.....	20
C) Rôles et actions des MAP4K.....	21
C.i Activation des voies de MAPK.....	21
C.ii Autres rôles.....	22
D) MAP4K végétale.....	22
D.i BnMAP4K α 1 et BnMAP4K α 2.....	23
D.ii MIK.....	24
1.4. Présentation du projet de recherche	24
2. Matériel et méthodes	26
2.1. Matériel végétal	26
2.2. Isolement d'ADN plasmidique par Miniprep	27

2.3. Transformation de bactéries électrocompétentes avec les vecteurs plasmidiques d'intérêt	27
2.4. Séquençage	27
2.5. Analyses de séquences	28
2.6. Analyse phylogénique	28
2.7. Transfert d'ARN sur membrane et hybridation	29
2.7.1. Extraction d'ARN des tissus végétaux	29
2.7.2. Transfert d'ARN sur membrane	29
2.7.3. Hybridation, marquage de la sonde et lavage des membranes	30
2.8. Création de plantes transgéniques par interférence d'ARN	31
2.8.1. Construction du plasmide.....	31
2.8.2. Transformation et sélection de bactéries <i>E. coli</i> XLI	33
2.8.3. Sélection des bactéries <i>E. coli</i> possédant la construction plasmidique	33
2.8.4. Transformation de bactéries <i>Agrobacterium tumefaciens</i> électrocompétentes	34
2.8.5. Préparation des tissus végétaux	34
2.8.6. Infection des disques foliaires avec la solution d' <i>A. tumefaciens</i>	34
2.8.7. Génération de plantules transformées par la construction plasmidique.....	35
2.8.8. Recherche de phénotypes	36
2.9. Criblage double-hybride dans le système Hybri-Zap	36
2.9.1. Construction des plasmides utilisés	36
2.9.2. Transformation des levures	38
2.9.3. Transformation des levures pour le criblage de banques	38
2.10. Transfert de protéines sur membrane et immunodétection	40
2.10.1. Extraction de protéines	40
2.10.2. Migration des protéines et transfert sur membrane	40
2.10.3. Immunodétection	40
3. Résultats	42
3.1 Analyse de la séquence de ScFRK3	42
3.1.1 Séquence générale	42
3.2 Analyse phylogénique	51
3.2.1 Classement de ScFRK3 comme une sérine/thréonine kinase de type MAP4K.....	51
3.2.3 : Classement phylogénique de ScFRK3 chez les protéines des familles de MAPK	54
3.3. Expression de FRK3	57
3.3.1. Déduction du nombre de copies du gène	57
3.3.2. Patron d'expression de ScFRK3	58
3.4. Lignées transgéniques par interférence d'ARN	59
3.4.1. Analyse de phénotypes.....	59
3.4.1.1. Petits fruits	59
3.4.1.2. Nombre de graines.....	60
3.4.1.3. Types de graines	64
3.4.3. Vérification du niveau d'expression de ScFRK3 chez les lignées transgéniques	66
3.5. Recherche de protéines interagissant avec ScFRK3 par double-hybride	70
3.5.1. Protéine hybride riche en proline.....	72
3.5.2. Sous-unité β de la protéine polygalacturonase isoenzyme 1	72
3.5.3. « Tomato ripening associated membrane protein »	73
3.5.4. Ascorbate peroxidase.....	73

3.5.5. 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase.....	73
3.5.6. Signal Sequence Receptor α	74
3.5.7. ACC oxidase	74
3.5.8. Histone H2A	75
4. Discussion.....	80
4.1. ScFRK3, une MAP4K inhabituelle.....	80
4.1.1. Séquence.....	80
4.1.2. Le domaine N-termial de ScFRK3, un domaine qui crée des liens.....	81
4.1.3. Un domaine C-terminal aussi attachant?.....	82
4.2. Déduction des rôles et fonctions de ScFRK3.....	84
4.2.1. Selon le patron d'expression d'ARNm	84
4.2.2. Selon les phénotypes des transgéniques.....	85
4.2.3. Selon ScFRK3 et ses partenaires de double-hybride.....	89
5. Bibliographie.....	91
6. Remerciements.....	106

Liste des graphiques

Graphique 1 : Présentation des courbes de croissance du diamètre des fruits.....62

Graphique 2 : Diamètre moyen des fruits.....62

Graphique 3 : Comparaison entre le nombre de graines matures et avortées par fruit.....63

Listes des tableaux

Tableau 1. Pourcentage de similarité des protéines homologues choisies par rapport à ScFRK3.....	52
Tableau 2 : Nombre et pourcentage de graines matures et avortées des fruits.....	63
Tableau 3 : Amplification ou non du fragment codant pour le gène de résistance à la kanamycine	66
Tableau 4 : Fiche technique des interactants de double-hybride.....	77
Tableau 5 : Fiche technique des interactants de double-hybride hors phase.....	79

Liste des figures

Figure 1 : Formation du sac embryonnaire.....	3
Figure 2 : Développement de l'embryon.....	5
Figure 3 : Représentation schématique d'une voie de transduction de signaux par cascade de MAPK.....	12
Figure 4 : Exemple de la variété des stimuli induisant les voies de MAPK.....	14
Figure 5 : Schéma de la construction clonée dans le vecteur pBIN 35 S.....	32
Figure 6 : Représentations schématiques de la protéine ScFRK3 ainsi que des protéines des deux familles de MAP4K : STE20/PAK et GCK/SPS1.....	46
Figure 7 : Séquence en acides aminés de ScFRK3.....	47
Figure 8 : Séquence codante de la protéine ScFRK3 en acides nucléiques ainsi qu'en acides aminés correspondant.....	48
Figure 9 : Alignement de domaines kinases de protéines de type MAP4K.....	53
Figure 10 : Arbre phylogénique de protéines isolées chez <i>A. thaliana</i> représentant les différentes familles de MAPK, soit les MAPK, les MAP2K, les MAP3K, ainsi que les MAP4K.....	54
Figure 11 : Arbre phylogénique des domaines catalytiques de protéines de type MAP4K isolées de divers organismes.....	56

- Figure 12** : Transfert de Southern composé d'ADN génomique de feuilles de *S. chacoense* digéré avec les enzymes de restriction Hin dIII, Eco RV, Eco RI, et Bam HI hybridé avec une sonde correspondant au domaine N-terminal de ScFRK3 marquée au [α^{32} P]dATP.....57
- Figure 13** : Transfert de northern composé d'ARN de différents tissus de *S. chacoense* hybridé avec une sonde correspondant au domaine N-terminal de ScFRK3 marquée au [α^{32} P]dATP.....58
- Figure 14** : Photos comparatives de la taille des fruits de plantes transgéniques modifiées par interférence d'ARN présentant un phénotype de petits fruits.....61
- Figure 15** : Phénotype des graines provenant de fruits des plantes transgéniques, 30 jours après pollinisation.....65
- Figure 16** : Patron d'hybridation de 10 μ g ADNg coupé avec l'enzyme Eco RI de la plante contrôle G4 et des plantes transformées 6, 12, 20, 26, 30, 40, et 50.....68
- Figure 17** : Test du taux d'expression d'ARNm réalisé avec 10 μ g d'ARN d'ovaires et de styles de plantes G4 contrôles et des plantes transformées par interférence qui présentent le phénotype de petits fruits (plantes 6, 12, 26, 30, 40 et 50)69
- Figure 18** : Transfert de western réalisé avec cinq μ g de protéines d'ovaire de la plante contrôle G4, et de plantes transformées sans phénotypes (6,12 et 20) et avec phénotypes (26, 30, 40 et 50).....70
- Figure 19** : Vérification des interactants de double-hybride inclus dans le vecteur pAD interagissant avec le domaine C-terminal de ScFRK3 inséré dans le vecteur pBD.....78

Liste des sigles et des abréviations

%	pourcentage
°C	degré Celcius
µg	microgramme
ng	nanogramme
µL	micro litre
µM	micromolaire
2n	diploïde
5' RACE	« Rapid Amplification of cDNA Ends » en 5'
ABA	acide abscissique
ACC	1-aminocyclopropane-1-carboxylate
ACC oxidase	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
ADNg	acide désoxyribonucléique génomique
ARN	acide ribonucléique
ARNi	interférence d'ARN
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Bn	<i>Brassica napus</i>
BnMAP4K α 1/2	<i>B. napus</i> mitogen activated protein 4 kinase
BSA	albumine de sérum bovin
ca	cellules antipodales
CDC42	« cell division cycle 42 »
CDC7	« cell division cycle 7 protein »
cm	centimètre
CRIB	Cdc42/Rac1 interaction domain
ERK	« Extracellular Signal-regulated Kinases »
ERK-1/2	« Extracellular Signal-reulated Kinases 1/2 »
EST	« Expressed Sequence Tag »
<i>fie</i>	<i>fertilization-independant endosperm</i>

<i>fis2</i>	<i>fertilization-independent seed2</i>
FLS2	Flagellin sensor 2
GBB	« Gβ binding site »
GCK	« Germinal center kinase »
GCR1	« G Protein-Coupled Receptor 1 »
GPCR	« G Protein Coupled Receptor »
GTPase	Protéine G phosphatase
h	heure
H ₂ O ₂	peroxyde d'hydrogène
His	histidine
HPK1	hematopoietic progenitor kinase 1
J	Joule
j	jour
JNK-1/2/3	« Jun amino-terminal Kinases-1/2/3 »
Kb	kilo base
Leu	leucine
LRR-PRK	récepteurs kinase riche en leucine
MAPK	« Mitogen Activated Protein Kinase »
MAP2K	« Mitogen Activated Protein Kinase Kinase »
MAP3K	« MAP Kinase Kinase Kinase »
MAP4K	« MAP Kinase Kinase Kinase Kinase »
MARK	« Maize Atypical PRK »
<i>mea</i>	<i>medea</i>
MEKK	MEK kinase
MEKK1	MEK kinase 1
MIK	« MARK interacting kinase »
MKK4	MAPK kinase 4
MKP1	MAPK phosphatase 1
MLK	« Mixed Lineage Kinase »
MLK-3	« Mixed Lineage Kinase-3 »
mm	millimètre

np	noyaux polaires
oo	oocyte
P	Phosphorylation
p38 $\alpha/\beta/\gamma/\delta$	« p38 protein $\alpha/\beta/\gamma/\delta$ »
PAK	« p21-activated kinases »
Pbs2	« Polymyxin B resistance protein kinase »
PCR	réaction de polymérisation en chaîne
PERK	« Plant ERK »
PG2	« polygalacturonase isoenzyme 2 »
PKR	protéine récepteur kinase
PMEKKkinases	« Plant MEKK »
PP	double phosphorylation
PP2C	« Phosphatase Protein 2 C »
PPP	« Phosphatase Protein »
PRAF	« Plant RAF »
PRK	récepteurs de type kinase
SAPK	Stress-activated protein kinase
Sc	<i>Solanum chacoense</i>
ScFRK3	« <i>S. Chacoense</i> Fertilization Related Kinase 3 »
SH3	Src-homology 3
SIMK	Stress induced MAPK
SPS1	« Solanesyl diphosphate Synthases »
SSR- α	« Signal Sequence Receptor α »
Ste11p	« Sterile protein 11 »
Ste20p	« Sterile protein 20 »
Ste5p	« Sterile protein 5 »
sy	synergides
TMM	TOO MANY MOUTHS
Trp	tryptophane
V	volt

1. Introduction

Si l'air est respirable, si plusieurs maladies ont un traitement et si les populations humaines peuvent se nourrir, c'est grâce au règne végétal. Les plantes ont réussi à coloniser presque tous les écosystèmes terrestres, elles se sont adaptées aux prédateurs et aux organismes pathogènes et elles profitent de modes de reproduction et de dispersion d'une inimaginable variété. Les plantes possèdent leurs propres voies de développement et cycle de vie, bien qu'une partie de leur génome soit commun aux autres règnes eucaryotiques. Les voies de signalisation intracellulaires de type « Mitogen Activated Protein Kinase » (MAPK) sont les mêmes chez les animaux, les levures et les végétaux, mais elles sont adaptées aux besoins différents de chacun, que ce soit lors du développement, de la réponse aux stress ou des changements se produisant au moment de la reproduction. Des protéines homologues aux fonctions différentes entre les règnes sont étonnamment souvent interchangeableables. Bref, si les voies de signalisation par MAPK ont été aussi bien conservées chez les animaux, les végétaux et les champignons, c'est que leurs rôles sont d'une grande importance.

1.1. Reproduction végétale

1.1.1. Formation des gamètes femelles ou mégaspores

Pour qu'une plante se reproduise sexuellement, elle doit entrer dans un nouveau cycle de vie qui culminera par la formation d'une fleur pouvant contenir les gamètes haploïdes reproducteurs mâles ou femelles, ou une combinaison des deux. La formation d'une fleur dépend du passage du méristème caulinaire végétatif en méristème inflorescent puis en méristème floral (Evans et Malmberg., 1989; Ray *et al.*, 1996). Les gamètes femelles sont cachés au cœur de la fleur, dans les carpelles, qui renferment les ovules. Ceux-ci protègent le sac embryonnaire qui contient l'oocyte. Le sac de type *Polygonum* est le plus commun, il est présent chez 70% des espèces végétales examinées, dont *Solanum chacoense* (Huang et Russel, 1992); il

renferme l'oocyte, deux noyaux polaires, trois cellules antipodales ainsi que deux synergides.

Les gamètes femelles sont formés par la succession de deux phases de divisions non symétriques. Lors de la mégasporogénèse, la cellule mère diploïde —le mégaspore— (cellule issue du nucelle), se divise en une tétrade de mégaspores haploïdes, dont seule la cellule la plus près du chalaze survit, tandis que les trois autres dégénèrent. Vient ensuite la phase de mégagamétogénèse, durant laquelle il se produit trois divisions mitotiques donnant une cellule à huit noyaux. Lors de la troisième mitose, il se forme des phragmoplastes et des plates-formes cellulaires entre les noyaux, puis chaque cellule est entourée d'une paroi cellulaire. Deux de ces cellules fusionnent pour former les deux noyaux polaires. À la fin de la formation du mégagamétophyte, les cellules antipodales meurent. Cette organisation polarisée du sac, ainsi que la structure de l'ovule facilitent la fécondation. Les synergides et l'oocyte sont situés du côté du micropyle, à savoir le pore formé par la jonction des téguments de l'ovule qui permet le passage du tube pollinique qui va ensuite pénétrer l'ovule en perçant une des synergides. On trouve les cellules antipodales du côté de la chalaze, c'est-à-dire la section qui rejoint le funicule qui assure la jonction entre l'ovule et le placenta.

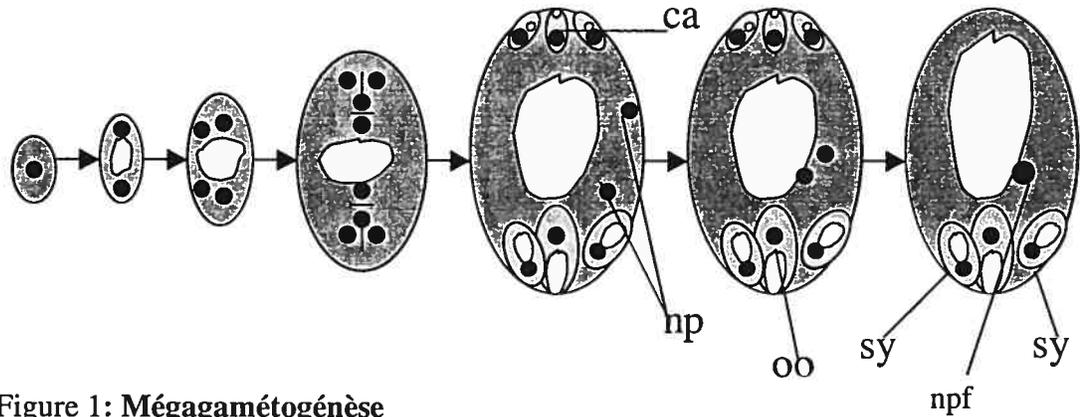


Figure 1: **Mégagamétogénèse**

- Légende :
- Le gris représente le cytoplasme
 - Le blanc représente les vacuoles
 - Les lignes noires séparant les noyaux représentent les parois cellulaires partielles
 - ca : cellules antipodales
 - oo : oocyte
 - np : noyau polaire
 - sy : synergides
 - npf : noyau polaire fusionné

1.1.2. Développement des gamètes mâles ou microspores

Les cellules sexuelles mâles se développent dans les sacs spermatiques aux bouts des anthères. Chaque cellule mère des microspores se divise en une tétrade de spores qui forme les microgamétophytes, appelé pollen lorsqu'il se divise en deux cellules. L'une d'elles formera le tube pollinique et l'autre se divisera pour donner les deux cellules spermatiques servant à la double fécondation. Plus de 20 000 gènes sont ainsi exprimés lors du développement du microgamétophyte, et probablement beaucoup plus lors de celui du mégagamétophyte (Drews et Yadegari, 2002).

1.1.3. Fécondation : deux fois c'est mieux!

L'accès à l'oocyte est difficile et génétiquement contrôlé. Deux systèmes d'auto-incompatibilité —sporophytique et gamétophytique— présents chez plusieurs espèces végétales veillent à la diversité génétique en inhibant les pollinisations incompatibles. Si un grain de pollen se pose sur le stigmate d'une fleur réceptrice, la plante doit vivre de grands changements, des modifications génétiques et métaboliques aboutissant à la formation d'un fruit portant les graines, qui renferment l'albumen et l'embryon. Une fois sur le style, le pollen est hydraté et germe pour former un tube pollinique. Ce dernier s'enfonce dans le tissu du style, guidé entre autres par divers signaux dont certains émanent des deux synergides (Higashiyama *et al.*, 2001). Le tube pénètre dans l'ovule par le micropyle et perce la paroi à l'endroit où se trouvent les synergides. Ces dernières meurent avant l'entrée du tube, permettant une pénétration plus facile (Grossniklaus et Schneitz, 1998). Une fois le sac perforé, le tube pollinique éjecte les deux cellules spermatiques. La première féconde l'oocyte pour former le zygote diploïde. La seconde s'unit aux deux noyaux polaires formant une cellule triploïde qui, en se divisant, donnera le tissu nourricier de l'embryon, l'albumen. La fusion des gamètes est facilitée par une absence ou une discontinuité de la paroi cellulaire dans la région comprenant les synergides, l'oocyte et les noyaux polaires (Grossniklaus et Schneitz, 1998). De plus, les membranes plasmiques sont en contact direct entre elles. Il s'ensuit donc la formation d'albumen et d'un embryon protégés par la graine portée dans le fruit.

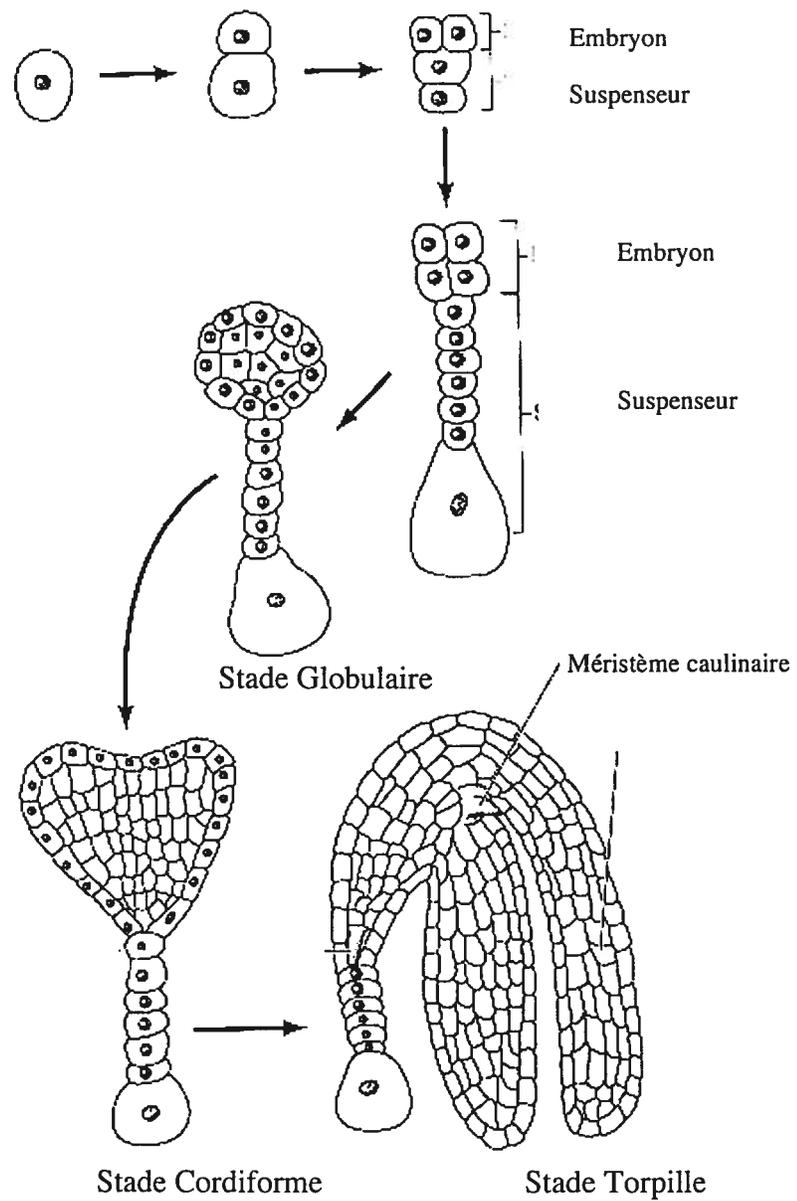


Figure 2 : Formation de l'embryon et du suspenseur du stade unicellulaire au stade mature

1.1.4. Développement embryonnaire, fructification et abscission

L'embryon dicotylédone mature (Figure 2) est formé de cinq structures majeures : le méristème apical caulinaire, les deux cotylédons, l'hypocotyle, la radicule et le méristème racinaire. Ces structures sont formées par le zygote qui entreprend une suite de divisions asymétriques aux destins cellulaires différents. Les cellules apicales formeront l'embryon, alors que les cellules basales donneront naissance au suspenseur, organe nécessaire pour puiser l'énergie emmagasinée dans l'albumen. En se divisant, l'embryon passe par les stades globulaire, cordiforme — lors duquel les cotylédons se forment—, torpille et enfin embryonnaire mature (Harada, 1999). Il s'ensuit une période de dormance, jusqu'à ce que les conditions idéales à la germination et au développement de l'embryon soient réunies.

Une fois fécondé, l'ovule dépend de l'auxine pour se développer en fruit. D'ailleurs, on réussit à obtenir des fruits sans graines par simple application de cette hormone, la pollinisation devenant inutile à la fructification chez certaines espèces (O'Neil, 1997).

Une fois le développement du fruit terminé, ce dernier se disperse pour implanter ailleurs la nouvelle génération végétative qu'il contient. Les fruits de types climactériques se détachent de la plante mère par abscission causé en partie par l'augmentation de la production d'une autre hormone : l'éthylène (Vrebalov *et al.*, 2002).

1.1.5. Types de reproductions asexuelles

Il existe des exceptions dans lesquelles il y a formation d'une graine et du fruit sans qu'il y ait fécondation, cette reproduction asexuée se produit entre autre lorsqu'une mégaspore non réduite, diploïde donc, produit un embryon. Ce type de reproduction asexué se nomme apomixie. Certains gènes sont responsables de cette reproduction non conventionnelle. Les mutants *fertilization-independant endosperm (fie)*, *medea (mea)*, et *fertilization-independent seed2 (fis2)* donnent des fruits sans

qu'il y ait fécondation, leur rôle serait donc de réprimer la prolifération de l'albumen avant la fécondation. Lors de la fécondation, ces gènes sont alors régulés négativement, peut-être même par le pollen (Koltunow et Grossniklaus, 2003). La pollinisation, sans qu'il y ait fécondation peut en effet être un événement déclencheur de l'apomixie (O'Neil, 1997).

Il existe un autre phénomène, la parténocarpie, qui est dû à la défaillance de gènes contrôlant la formation des fruits. En effet, les fruits parténocarpiques se forment sans qu'il y ait fécondation, et sans qu'il y ait formation de graines. Ce phénomène est intéressant pour l'industrie agroalimentaire, puisque de nombreux consommateurs préfèrent les fruits sans graines, pépins ou noyaux. L'ovule se développe en graine par l'action d'hormones. La production de fruits parténocarpiques est liée à l'accumulation de gibbérellines et d'auxines dans les ovaires. Une mutation des gènes impliqués dans le contrôle de ces hormones doit être responsable de cette aberration du développement. Les fruits formés sont sans graines et généralement de plus petite taille, environ 2/3 de leur taille normale (Mazzucato *et al.*, 1998).

1.1.6. Rôles de l'éthylène

Si l'auxine est importante lors de la fructification, l'éthylène l'est dans les premiers moments suivant la pollinisation. Cette molécule très simple ($\text{CH}_2=\text{CH}_2$) est ultimement formée grâce à l'enzyme ACC oxidase qui transforme l'ACC en éthylène, hormone végétale volatile. Dès que le pollen se pose sur le style d'une fleur réceptrice, avant même qu'il ne germe et ne pénètre dans le style, la chaîne d'évènements reliés à la fécondation est initiée. Chez plusieurs espèces, on remarque une augmentation du taux d'éthylène dans le style immédiatement après son contact avec le pollen. Ce phénomène est d'abord causé par la conversion des molécules d'ACC venant du pollen en éthylène, puis par la production d'éthylène par la fleur elle-même. La production d'éthylène du pollen induirait alors la production d'éthylène indigène de la fleur (O'Neil, 1997). L'éthylène pourrait donc servir de

messenger lors de la pollinisation pour indiquer à la fleur qu'elle doit se préparer à la fécondation.

L'éthylène est aussi impliqué dans la réponse aux stress et aux agents pathogènes, dans la croissance et le développement des plantes, dans la sénescence et l'abscission des fruits, fleurs et feuilles (Johnson et Ecker, 1998). La perception de l'éthylène par les cellules se fait par un ou plusieurs récepteurs à deux composantes qui activent une voie de MAPK. Par exemple, chez *Arabidopsis thaliana*, cinq récepteurs d'éthylène ont été identifiés (Johnson et Ecker, 1998; Chang et Shockey, 1999; Bleeker, 1999; Bleeker et Kende, 2000 et Wang et al., 2002).

1.1.7. Interaction entre les protéines de signalisation et les récepteurs

Des récepteurs de type kinase (PRK) semblent impliqués dans les processus de différenciation cellulaire tels que le fonctionnement du méristème, l'élongation cellulaire, la résistance aux maladies et la réponse aux hormones. Ils participeraient donc à plusieurs étapes du développement végétatif et reproductif (Ferrandiz et al., 1999). Les récepteurs de type kinase sont possiblement des activateurs des voies de signalisation intracellulaire de type MAPK chez les plantes. Ces voies seraient impliquées dans les mêmes mécanismes cellulaires que les PRK. Par exemple, il semble que le récepteur TOO MANY MOUTHS (TMM), faisant partie de la famille des récepteurs kinase riche en leucine (LRR-PRK), mais sans domaine kinase cytoplasmique tout comme CLAVATA 2, pourrait interagir avec une MAP3K (YODA). Ces deux protéines seraient impliquées dans une voie de transmission de signaux menant à la différenciation cellulaires lors de la formation des stomates et de l'embryon (Bergman et al., 2004; Lukowitz et al., 2004 et Nadeau et Sack., 2003).

1.1.8. Protéines G hétérotrimériques et récepteurs : végétaux versus animaux

En plus des récepteurs et des protéines de type kinase qui y sont associés, de nombreuses voies de signalisation intracellulaire, dont plusieurs voies de MAPK,

sont activées par des récepteurs transmembranaires heptoïdaux couplés à des protéines G hétérotrimériques (GPCR). Ces protéines G hétérotrimériques sont formées de trois sous-unités ($G\alpha$, $G\beta$, et $G\gamma$) qui, une fois activées par la présence d'une molécule de GTP, se dissocient en deux fractions, $G\alpha$ et $G\beta\gamma$. La sous-unité $G\beta$ interagit entre autres avec des protéines de type MAP4K du sous-groupe des Ste20/PAK pour ensuite activer certaines cascades de MAPK. Il existe plus d'un millier de GPCRs chez les animaux, 23 sous-unités $G\alpha$, six sous-unités $G\beta$, et 12 sous-unités $G\gamma$, permettant une multitude de combinaisons possibles entre ces éléments. Le tableau est tout autre chez les végétaux. En effet, chez *A. thaliana*, on ne recense qu'un ou deux complexes hétérotrimériques de protéines G et il n'y a qu'une sous-unité $G\alpha$, une sous-unité $G\beta$ et peut-être deux sous-unités $G\gamma$. Ces complexes sont associés à plusieurs voies de signalisation, mais il existe très peu de récepteurs associés aux protéines G (Ullah *et al.*, 2001). Il y aurait environ 27 récepteurs semblables aux GPCR, et un seul possède les sept boucles transmembranaires : MLO1, qui est impliqué dans la résistance au mildiou. Jusqu'à présent, on ne connaît qu'un exemple d'interaction entre un récepteur de type GPCR interagissant avec une sous-unité de la protéine G hétérotrimérique chez *A. thaliana*. Il s'agit du récepteur G Protein-Coupled Receptor 1 (GCR1) qui interagit avec la sous-unité α (GPA1) et qui régule la signalisation de l'acide abscissique (Pandey et Assman, 2004). Il se peut donc que les protéines G hétérotrimériques interagissent avec un autre type de récepteur, ou qu'il se produise une activation d'une voie de signalisation indépendante d'un récepteur. Ce que possèdent les végétaux et qui les différencient des animaux et des levures, c'est la présence d'une grande quantité de récepteurs de type kinase (PRK), ainsi que la présence de récepteurs histidine kinase à deux composantes. Il semble donc que les protéines G hétérotrimériques puissent s'associer à d'autres types de récepteurs. Quand on pense aux 600 PRK disponibles chez les plantes, on peut imaginer un lien entre ces derniers et les voies de transduction de signaux par MAPK (Jones, 2002; The Arabidopsis genome initiative, 2000; Meyerowitz, 2002).

Bref, si les voies de MAPK sont conservées chez les eucaryotes, les voies identifiées chez les végétaux semblent avoir évoluées différemment quant à leurs structures, leurs méthodes de régulation, leurs protéines activatrices ainsi que leurs variétés.

1.2. Cascades de MAPK

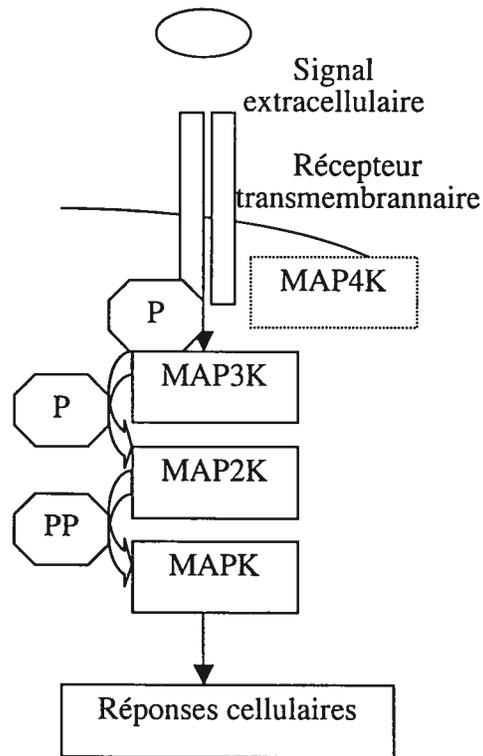
Si les cellules perçoivent les signaux extracellulaires et réagissent convenablement, c'est que ces derniers sont habituellement captés par des récepteurs transmembranaires. Par la suite, le signal voyage dans la cellule et va jusqu'au noyau où les facteurs de transcription activent les gènes impliqués dans la réponse cellulaire nécessaire.

L'ajout ou le retrait d'un groupement phosphate peut-être la cause d'importants changements de structure et (ou) de propriété de la protéine modifiée. La phosphorylation transitoire de protéines est essentielle au fonctionnement cellulaire au même titre que le métabolisme, le cycle cellulaire, le transport d'ions, le contrôle du développement et la réponse aux stress. Le nombre élevé de protéines kinases et phosphatases identifié est une autre preuve de l'importance de la phosphorylation (Luan, 2003).

Les deux groupes de kinases les plus répandus sont caractérisés par le résidu qu'elles phosphorylent. Les sérine/thréonine kinases ajoutent un groupement phosphate à une sérine ou une thréonine, alors que les tyrosines kinases préfèrent les résidus tyrosines. Le classement vaut également pour les phosphatases, qui retirent le groupement phosphate (Hunter, T. 1997). Si les plantes ne semblent pas posséder des tyrosines kinases, elles disposent néanmoins d'un troisième groupe phosphorylant : les histidines kinase.

Les voies de transduction de signaux par les MAPK sont présentes chez tous les eucaryotes. Elles impliquent généralement trois protéines, parfois quatre, qui se

phosphorylent successivement et permettent la transduction d'un signal d'origine extracellulaire, capté par un récepteur membranaire (Figure 3). Ensuite, ce dernier active par phosphorylation une MAP3K qui phosphoryle une MAP2K qui, à son tour, phosphoryle une MAPK qui phosphoryle son substrat. Ce substrat est souvent un facteur de transcription qui active les gènes nécessaires à la réponse cellulaire spécifique requise. Cette organisation de transmission de message permet une activation et une inhibition rapide par l'ajout ou le retrait de groupements phosphates. Les cascades de MAPK sont déphosphorylées par des protéines sérine/thréonine phosphatases, nommées PPP (Luan, 2003). Il semble que les PP2C soient les protéines phosphatases les plus souvent impliquées dans la régulation de l'activation des kinases agissant dans les voies de signalisation de MAPK (Schweighofer *et al.*, 2004). Chez les plantes, on a répertorié 76 PP2C et, bien que ce groupe ne soit pas bien caractérisé, certaines de ces protéines sont impliquées dans la régulation de la voie de réponse à l'acide abscisique (ABA) (Meyerowitz, 2002; Schweighofer *et al.*, 2004). Certaines phosphatases comme MKP1 peuvent également retirer les deux phosphates se trouvant sur la MAPK ERK : il s'agit alors d'une phosphatase à double spécificité, puisque ERK est doublement phosphorylé sur des résidus sérine et thréonine (Millward *et al.*, 1999). Le transfert de signaux par des protéines rapidement activables et inactivables selon la présence de phosphates permet un contrôle rapide et une réponse cellulaire efficace.



Légende : P : phosphorylation

PP : double phosphorylation

▭ (pointillés) : Protéine pas toujours présente dans les cascades de MAPK

▭ (plein) : Protéine toujours présente dans les cascades de MAPK

Figure 3 : Représentation schématique d'une voie de transduction de signaux par cascade de MAPK

1.2.1. Voies de MAPK chez les plantes

Les cascades de MAPK sont très bien connues et caractérisées chez les animaux et les levures. Des protéines homologues aux MAP4K, MAP3K, MAP2K et MAPK sont présentes chez les plantes et on peut affirmer que des cascades de MAPK sont impliquées dans les réactions de défense (Hirt et Scheel, 2000; Cardinale *et al.*, 2002), dans la régulation de la division cellulaire et le réarrangement du cytosquelette (Bögre *et al.*, 2000; Nishihama et Machida, 2001; Calderini *et al.*, 2001,

Jouannic *et al.*, 2001), dans la réponse aux hormones (Hirt, 1997, Tena *et al.*, 2001), dans la perception de l'éthylène (Salvadi-Goldstein et Fluhr, 2000), bien que très peu de cascades de signalisation soient complètes, et qu'aucune n'ait été vérifiée *in vivo* (Zhang et Klessig, 2001) malgré l'annonce récente de Jonak *et al.*, en 2004 et démenti par le groupe de Ecker *et al.*, en 2005.

Les voies de MAPK sont les mieux connues et étudiées lorsqu'elles sont impliquées dans la réponse aux stress, aux blessures mécaniques ou aux organismes pathogènes (Figure 4). La plupart des différents stimuli entraînent la même réponse cellulaire, soit la production d'espèces réactives d'oxygène, ainsi que l'activation de gènes de défense hâtifs. Il y a donc convergence des stimuli lorsqu'ils atteignent les voies de transduction de signaux par MAPK (Zhang et Klessig, 2001). Fait intéressant, le contrôle négatif de l'activation des réactions de défense se fait aussi par voie de MAPK : une autre cascade semble bloquer les voies d'activation des gènes de défense et la production d'espèces réactives d'oxygène lorsque la plante n'est pas attaquée (Hirt, 2000; Bent, 2001; Innes, 2001 et Cardinale *et al.*, 2002). Il y a donc un équilibre complexe entre l'activation et l'inhibition des réactions de défense, contrôlée par les voies de MAPK. Aussi, une expérience menée par Teige *et al.* et 2004 sur des plantes d'*A. thaliana* surexprimant la protéine MAP2K MKK2 agissant en amont des deux MAPK MPK4 et MPK6 montre des changements dans le taux d'expression de 152 gènes impliqués dans la réponse aux stress. Il semble donc que les voies de MAPK sont d'une grande importance dans la réponse aux stress et que leur activité touche de nombreux gènes.

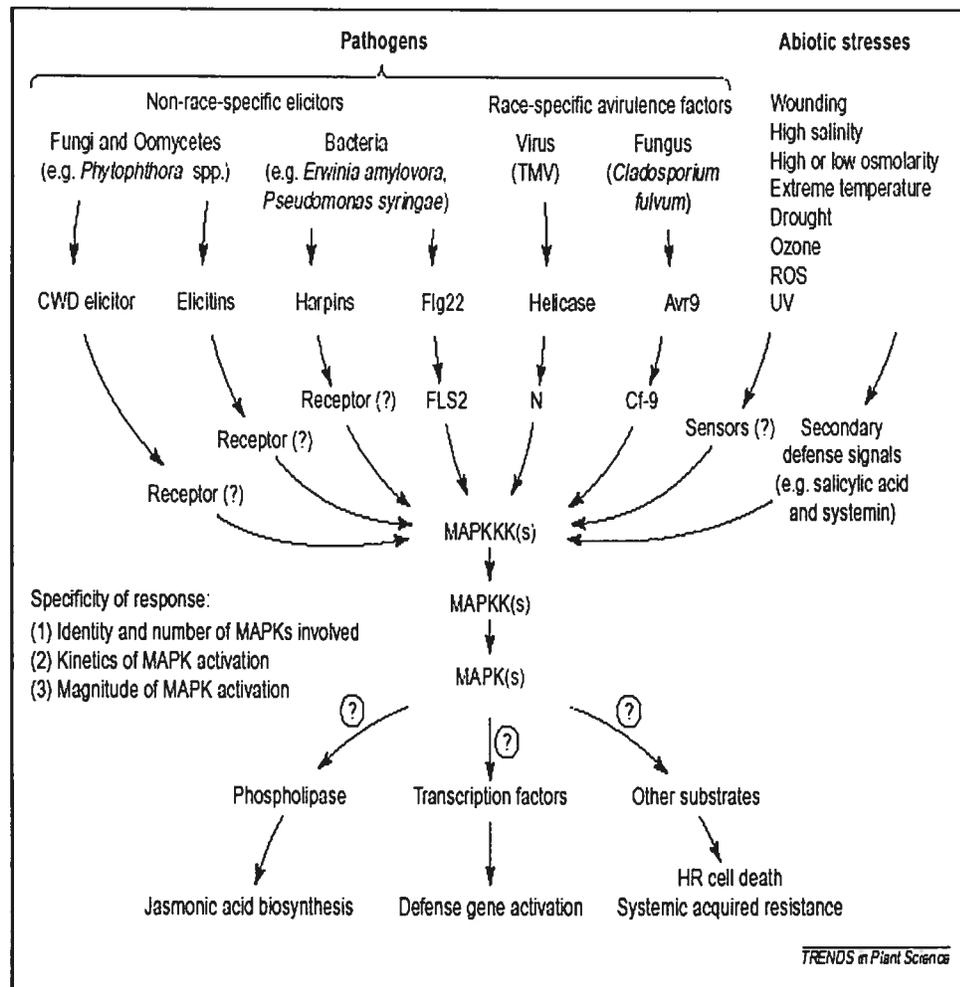


Figure 4 : Exemple de la variété des stimuli induisant les voies de MAPK (Zhang et Klessig, 2001)

Mizogushi et *al.* en 1998 ont construit la première cascade hypothétique complète de MAPK végétales. Ils y sont parvenus en démontrant des interactions entre une MAP3K et une MAP2K et entre cette dernière et une MAPK par des tests de double-hybride. Ils ont également réalisé des tests de complémentation de mutants de levures pour déterminer si ces protéines étaient fonctionnelles. Puis, en 2002, Asai et *al.* ont assemblé la cascade complète de défense en réponse aux flagellines en identifiant le ligand (une flagelline), le récepteur de type PRK FLS2, les trois MAPK de la cascade et enfin les deux facteurs de transcription WRKY22/29, par des tests d'expression transitoire dans des protoplastes. En utilisant le même stratagème que

Asai et *al.*, Ouaked et *al.* en 2003 ont réussi à assembler la voie de défense induite par l'éthylène. Toutes ces voies sont encore à prouver *in vivo* et aucune MAP4K ne semble impliquée.

1.2.2. Contrôle et organisation des cascades

Les cascades de MAPK étant composées de plusieurs éléments qui peuvent participer à plus d'une voie, selon les signaux activateurs et les besoins cellulaires, il est nécessaire d'avoir des domaines régulateurs sur les MAPK ainsi que des protéines associées qui régulent et organisent les membres des voies de transduction de signaux. Il existe des transferts de signaux croisés impliquant plusieurs voies de MAPK en même temps, certaines régulant les autres, négativement ou positivement. Parfois, une même MAP3K est impliquée dans trois voies de signalisation donnant des réponses cellulaires complètement différentes, comme c'est le cas de Ste11p chez la levure. La présence de contrôles à plusieurs endroits tout au long des cascades est donc nécessaire pour gérer toutes ces possibilités de réponse et obtenir celle qui est spécifique. Les cellules possèdent des protéines d'ancrage et des protéines d'échafaudage qui coordonnent les liaisons distinctes entre les différents éléments des voies de MAPK. Ces protéines peuvent agir de façon antagoniste en séquestrant ou en séparant les protéines dans des régions cellulaires différentes afin d'empêcher les interactions non désirées; ou, au contraire, en groupant les éléments requis et permettant une activité rapide entre eux (Bauman et Scott, 2002). L'exemple le mieux connu de protéines d'échafaudage se trouve chez *Saccharomyces cerevisiae*. En effet, la MAP4K Ste20p et la MAP3K Ste11p sont impliquées dans trois voies de signalisation distinctes. Des protéines d'échafaudage sont présentes dans deux de ces voies : premièrement la protéine Ste5p rassemble les éléments de réponse aux phéromones, alors que la MAP2K Pbs2, qui sert aussi de protéine d'échafaudage, rassemble les éléments de réponse à un taux osmotique élevé. La troisième cascade est impliquée dans la réponse à une carence en azote, mais aucune protéine d'échafaudage n'est impliquée dans cette voie. Ces systèmes permettent d'éviter l'activation de la mauvaise voie par Ste20p ou Ste11p

(Garrington et Johnson, 1999; Ptashne et Gann, 2003). Bien qu'on extrapole le contrôle des voies de MAPK végétales par des protéines d'échafaudage, aucune protéine pouvant exercer une telle fonction n'est connue à ce jour.

1.2.3. MAPK

A) Présentation générale de la protéine

Les MAPK sont des protéines catalytiques de la famille des sérine/thréonine kinases. Elles sont présentes chez tous les eucaryotes et ajoutent de façon spécifique à une protéine substrat des groupements phosphates sur des résidus sérine ou thréonine immédiatement suivis d'une proline (Johnson et Lapadat, 2002; Widmann *et al.*, 1999). Ce contexte précis d'activation permet la spécificité de l'interaction entre la MAPK et son substrat. Les résidus entourant les résidus phosphorylés ajoutent aussi à la spécificité (Chang et Karin, 2001). La majorité de leurs protéines substrats sont des facteurs de transcription, mais les MAPK phosphorylent également des protéines kinases, des phospholipases, des protéines associées au cytosquelette, ou d'autres protéines cytosoliques (Widmann *et al.*, 1999). Elles peuvent aussi, dans certains cas, phosphoryler des MAP2K ou des MAP3K, ayant ainsi un effet direct sur l'amplification ou la diminution de la transduction de signal par la cascade de MAPK (Kültz, 1998). Elles sont elles-mêmes phosphorylées par une protéine MAP2K sur les résidus thréonine et tyrosine de leur site actif : TXY (Wrzaczek et Hirt, 2001; Bertram *et al.*, 1997). Les protéines de type MAPK sont classées en quatre sous-groupes que sont les « extracellular signal-related kinases » (ERK)-1/2, les « Jun amino-terminal kinases »(JNK)-1/2/3, les « p38 protein »(p38 α / β / γ / δ) ainsi que les ERK5 selon Chang et Karin (2001). Les MAPK sont cytoplasmiques, mais une fois phosphorylées, elles pénètrent dans le noyau en entier ou en partie où elles peuvent alors phosphoryler des facteurs de transcription (Robinson et Cobb, 1997).

B) MAPK végétale

Les végétaux ne possèdent que des MAPK de la famille des ERK qui sont donc appelées Plant ERK (PERK). Les ancêtres des MAPK chez les plantes se seraient isolés des animaux et des levures avant l'apparition des autres familles de MAPK (Tena *et al.*, 2001; Ichimura *et al.*, 2002). Le génome d'*A. thaliana* comporte 20 protéines de type MAPK qui sont divisées en quatre groupes (A-D) selon leur motif d'activation.

1.2.4. MAP2K

A) Présentation générale de la protéine

Il y a beaucoup moins de protéines de types MAP2K recensées chez les eucaryotes que de MAPK, ou de MAP3K. Toutefois, elles sont extrêmement spécifiques à leur substrat (MAPK). En général, elle ne phosphorylent qu'une ou deux MAPK différentes, ou un petit nombre de protéines substrats, alors que les MAP3K peuvent phosphoryler plusieurs MAP2K différentes (Johnson et Lapadat, 2002; Raman et Cobb, 2003 et Robinson et Cobb, 1997). Les MAP2K sont des protéines phosphorylées par des MAP3K qui reconnaissent et phosphorylent les deux résidus tyrosine et thréonine de la boucle d'activation des MAP2K, elles sont ainsi des sérine/thréonine kinase à double spécificité (Widmann *et al.*, 1999; Gartner *et al.*, 1992). Elles sont phosphorylées sur deux résidus sérine et/ou thréonine dans le motif conservé S/TXXXXS/T chez les mammifères et levures, et dans le motif S/TXXXXXS/T chez les plantes (Canagarajah *et al.*, 1997, Ichimura *et al.*, 2002; Jonak *et al.*, 2002 et Yang *et al.*, 2001).

B) MAP2K végétale

On recense jusqu'à présent 10 MAP2K chez *A. thaliana* dont le génome est entièrement séquencé. Elles phosphorylent probablement plusieurs MAPK chacune, puisque leur nombre est moins élevé que celui des MAPK. Les MAP2K végétales semblent différentes des autres protéines de même type trouvées chez les autres eucaryotes, car elles sont moins spécifiques à un petit nombre de protéines MAPK

substrat (Jonak *et al.*, 2002). Il a été prouvé par exemple que les protéines SIMKK et PRKK de la luzerne peuvent activer jusqu'à trois MAPK différentes, selon le stimulus employé (Cardinale *et al.*, 2002).

1.2.5. MAP3K

A) Présentation générale de la protéine

Il existe beaucoup plus de protéines de type MAP3K que de types MAPK ou MAP2K. Les MAP2K sont donc possiblement activées par plus d'une MAP3K. Il se peut également que les MAP3K activent alternativement d'autres substrats à l'extérieur des voies classiques de MAP3K. La présence de nombreuses MAP3K différentes permet à la cellule de réagir à de nombreux stimuli extracellulaires différents, mais qui sollicitent parfois la même réponse cellulaire. Les MAP3K font converger le signal vers un module de MAP2K-MAPK précis, permettant une réponse cellulaire spécifique (Johnson et Lapadat, 2002). Ces protéines sont les premières de la cascade classique de transduction de signaux par voies de MAPK. Elles peuvent être activées par une protéine sérine/thréonine kinase de type Ste20p, (parfois identifiée comme une MAP4K), par de petites protéines G ou par interaction directe avec le domaine récepteur d'un récepteur histidine kinase à deux éléments (Chang et Karin, 2001; et Jouannic *et al.*, 1999). Elles possèdent une plus grande variété de structures et de compositions de domaines que les MAPK et les MAP2K (Ichimura *et al.*, 2002). Une analyse phylogénique permet de classer les MAP3Ks en quatre sous-familles distinctes : les MEKK/Ste11, les Ccd7, les Raf et les Mlk (Ichimura *et al.*, 2000).

B) MAP3K végétale

On trouve deux sous-familles de MAP3K chez les végétaux, les MEKK, et les Raf, nommées Plants MEKK (PMEKKkinases) et Plants Raf (PRAF). Le génome d'*A. thaliana* possède 12 PMEKK et 48 Praf (Tena *et al.*, 2001; Jonak *et al.*, 2002; Ichimura *et al.*, 2002). Toutefois, il est à noter qu'on n'a prouvé l'activation d'une MAP2K végétale par une MAP3K végétale au sens strict que dans très peu

de cas. Les MAP3K végétales n'activant pas de MAP2K ne seraient peut-être pas de véritables MAP3K, du moins dans la définition classique impliquant les voies de MAPK (Jonak *et al.*, 2002).

1.2.6. MAP4K

A) Présentation générale de la protéine

« Une MAP4K est une kinase qui active une voie de MAPK par son interaction avec une MAP3K, sans qu'il y ait obligatoirement phosphorylation » (Dan *et al.*, 2001). La première protéine de ce type, Sterile 20 protein (Ste20p) isolée de la levure *S. cerevisiae* est impliquée dans les voies de réponse aux phéromones, de réponse à un taux osmotique élevé ainsi qu'à une carence en azote (Wu *et al.*, 1995). Environ une trentaine de protéines semblables sont répertoriées chez les mammifères, en plus des homologues identifiés chez *Drosophila*, *Caenorhabditis elegans* et autres organismes. Les protéines incluses dans cette famille possèdent cette séquence signature dans le sous-domaine catalytique VIII : **xgtxaWMAPEv** (les acides aminés en minuscules étant moins bien conservés entre les protéines que les acides aminés en majuscules qui le sont hautement, les x peuvent correspondre à n'importe quel acide aminé). Cette constance entre les membres de cette famille pourrait indiquer une similarité pour la sélectivité de leur substrat. En effet, les protéines semblables à Ste20p des mammifères phosphoryleraient les MAP3K de la même façon que les protéines semblables à Ste20p de la levure phosphorylent les MAP3K, donnant un premier indice selon lequel les protéines semblables à Ste20p auraient la fonction de MAP4K (Dan *et al.*, 2001). *S. cerevisiae* possède trois protéines de ce type, Ste20p, Cla4 et Skm1, ayant chacun un rôle cellulaire différent. Ste20p est impliqué dans la réponse aux phéromones, lors de la croissance intrusive lors d'une carence en azote, et dans la voie de réponse à une concentration élevée en sel, par la formation de glycérol (HOG). Cla4 est impliqué dans la régulation de la croissance polarisée. Cla4 et Ste20p seraient liés pour une fonction cellulaire, car un double mutant est létal. Skm1 n'a pas encore de fonction connue et un mutant n'exprimant pas cette protéine n'a pas de phénotype. Fait intéressant : une simple

substitution de l'acide aminé thréonine 818 de Ste20p sur la protéine Cla4 donne un mutant Cla4D772T, ce qui lui confère la spécificité de substrat ainsi que la plupart des fonctions cellulaires de la protéine Ste20p. Les protéines aux sites catalytiques semblables pourraient avoir les mêmes types de fonctions, alors que la détermination de la spécificité au substrat s'effectue dans les domaines de régulation (Keniry et Sprague Jr, 2003).

B) Classement des MAP4K en deux sous-groupes

Les protéines semblables à Ste20p sont classées en deux sous-familles : les p21-activated kinases (PAK) dont la protéine Ste20p fait partie (on nomme cette sous-famille Ste20/PAK), et les germinal center kinase (GCK), dont la protéine SPS1 fait partie (on nomme cette sous-famille GCK/SPS1).

La sous-famille des Ste20/PAK se distingue premièrement par la position C-terminal de son domaine catalytique, en aval d'un domaine régulateur en position N-terminal, mais également par la présence d'un domaine CRIB de liaison aux protéines Cdc42/Rac1 et par une séquence de liaison à la sous-unité β de la protéine hétérotrimérique $G\alpha\beta\gamma$. Leeuw *et al.* (1998) et Leberer *et al.* (2000) ont découvert que les protéines de la sous-famille des Ste20/PAK possèdent un domaine de liaison à la sous-unité $G\beta$, nommé GBB ($G\beta$ binding site) dont la séquence consensus suivante : SSL ϕ PLI/VX $\phi\phi\beta$ (x correspond à n'importe quel acide aminé, β correspond à un résidu basique et ϕ peut être A, I, L, S ou T) est conservée entre les animaux et les levures. La liaison entre $G\beta$ et Ste20p est essentielle à la transduction de signaux lors de la fusion chez la levure (Leeuw *et al.*, 1998 et Leberer *et al.*, 2000).

Les membres de la sous-famille des GCK/SPS1 possèdent un domaine catalytique kinase en position N-terminale suivi d'un domaine de régulation en C-terminale avec des structures variant beaucoup d'un membre à l'autre. Ce domaine possède aussi plusieurs résidus riches en prolines permettant son interaction avec des domaines de liaisons protéiques SH3. Les domaines de liaisons à des sites SH3

peuvent se réduire à la séquence PXXP (Cohen *et al.*, 1995; Kami *et al.*, 2002 ;Yu *et al.*, 1994).

C) Rôles et actions des MAP4K

C.i Activation des voies de MAPK

Si les mécanismes d'interaction entre les trois éléments des cascades de MAPK sont bien connus, la façon dont les cascades sont activées n'est pas encore bien établie. Certaines MAP4K activent des cascades de MAPK, soit par phosphorylation soit par simple liaison à une MAP3K (Polverino *et al.*, 1995; Kyriakis, 1999; Bagrodia et Cerione, 1999; Dan *et al.*, 2001). Puisque la protéine Ste20p active la MAP3K Ste11p par phosphorylation directe et active par le fait même la cascade de MAPK (Drogen *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 1995), on pourrait alors l'intégrer dans la cascade de phosphorylation des MAPK. Il s'agirait d'un quatrième élément de la cascade, une MAP4K en amont d'une MAP3K. Les homologues de Ste20p pourraient avoir la même fonction de MAP4K (Dan *et al.*, 2001). En effet, la protéine de type « p21-activated protein kinase » PAK2 est activée par les petites GTPase Rac1 et Cdc42 et phosphoryle ensuite la MAP3K Raf-1 sur le résidu serine 338 dans des expériences *in vivo* et *in vitro*. De plus, la surexpression d'une forme inactive de PAK2 inhibe l'activation de Raf-1 par Ras (King *et al.*, 1998).

Par contre, certaines MAP4K activent des MAP3K par simple liaison, sans qu'il y ait phosphorylation, comme c'est le cas pour les protéines de la sous-famille des GCK/SPS-1, HPK1 et GCK qui sont impliquées dans la voie de SAPK (Kyriakis, 1999). La surexpression d'HPK1 ou de GCK active constitutivement la voie de SAPK, mais la surexpression d'une forme catalytiquement inactive de ces deux protéines réussit également à activer la voie; alors que la présence d'une forme inactive des MAP3K en aval, MEKK1 et MLK-3, ou de la MAP2K MKK4 inhibe la voie d'activation de SAPK (Kyriakis et Avruch, 1996; Kyriakis, 1999; Pombo *et al.*, 1995). Il semble que plusieurs MAP3K s'autophosphorylent lorsqu'elles sont stables, et que cette autophosphorylation soit suffisante à leur activation. La stabilisation des MAP3K et la formation de dimères sont parfois suffisantes pour

qu'il y ait phosphorylation -auto-phosphorylation- dans ces cas, suggérant un rôle de stabilisateur aux MAP4K lorsqu'elles se lient aux MAP3K (Dan *et al.*, 2001). Le domaine catalytique des MAP4K sert peut-être davantage à leur auto-phosphorylation qu'à la phosphorylation des MAP3K dans les voies de MAPK. Une fois auto-phosphorylées, leur structure tridimensionnelle changerait de conformation et laisserait leur structure non-catalytique accessible aux MAP3K qui viendraient s'y lier (Dan *et al.*, 2001; Yuasa, 1998).

La voie classique de signalisation intracellulaire de MAPK n'est pas la seule fonction des protéines de type MAP4K. On les trouve également impliquées dans les voies de l'apoptose (prévention et déclenchement), dans la morphogénèse et lors de réarrangements du cytosquelette, incluant la mobilité et le changement de forme cellulaire. Certaines MAP4K auraient un rôle de protéine d'échafaudage, afin de relier les éléments requis à l'endroit prévu, comme les protéines Spa2p et Mst1 (Drogen et Peter, 2002 ; Caretha *et al.*, 1996).

C.ii Autres rôles

Certaines protéines font partie des événements entourant l'apoptose par l'activation de cascades de MAPK impliquées dans ce phénomène biologique, alors que d'autres y participent autrement, en régulant les événements cellulaires induits durant l'apoptose. La Caspase 3 a pour cible plusieurs protéines du groupe des PAK/Ste20p : Mst1, HPK1, SLK, PAK2 et γ PAK (Gnesutta *et al.*, 2001; Rudel *et al.*, 1997). Aussi, certaines MAP4K du sous-groupe des PAK-I sont impliquées dans la régulation du cytosquelette d'actine (Manser *et al.*, 1997).

D) MAP4K végétale

Environ 10 protéines semblables à Ste20p et possédant la séquence consensus TFGVTPXWMAPEV sont répertoriées dans le génome d'*A. thaliana*. Par contre, il n'y a encore aucune preuve d'activation d'une cascade de MAPK végétale par une protéine de type MAP4K et l'on ne leur connaît encore aucune fonction biologique (Jonak *et al.*, 2002). Les protéines BnMAP4K α 1, BnMAP4K α 2 isolées de

l'organisme *Brassica napus* et MIK isolée de l'organisme *Zea mays* sont trois autres protéines de type MAP4K identifiées chez les plantes et font toutes trois partie de la sous-famille GCK/SPS1.

D.i BnMAP4K α 1 et BnMAP4K α 2

Les protéines BnMAP4K α 1 et BnMAP4K α 2 ont été identifiées par criblage d'une banque d'ADNc de microspore de *B. napus* à l'aide d'un clone d'EST d'*A. thaliana* semblable aux MAP4K de l'homme et de la levure. L'analyse de leur séquence en acides aminés montre un domaine catalytique kinase de la famille des sérine/thréonine kinases possédant les 11 sous-domaines conservés en position N-terminal et les classant dans la sous-famille des GCK/SPS1. Le domaine régulateur C-terminal possède des régions riches en prolines —PXXP— supposant une interaction protéique avec des domaines SH3. La petite section N-terminale non catalytique renferme la séquence GARFSHQV qui correspond à la séquence consensus GXXXS/TXXX pour la N-myristoylation, première condition à remplir pour l'association de la protéine à la membrane. Cette association à la membrane permet une proximité à un substrat ou à un récepteur membranaire, apportant le signal cellulaire vers une des chaînes d'événements possibles. Puisque dans la levure, la protéine Ste20p interagit avec la sous-unité G β de la protéine hétérotrimérique G $\alpha\beta\gamma$ associée à la membrane, on peut imaginer que les protéines de type MAP4K de *B. napus* sont aussi associées à une protéine membranaire, peut-être à un récepteur (Leprince *et al.*, 1999).

L'expression de ces protéines est constitutive dans tous les tissus observés, mais elle est plus forte dans les racines, les siliques et les bourgeons floraux, soit dans les tissus en développement. L'utilisation de cellules en suspensions d'*A. thaliana* montre que ces deux protéines seraient régulées par le cycle cellulaire, car elles sont principalement accumulées lors des phases S et G1 du cycle cellulaire. Ces indices permettent de supposer que ces protéines sont impliquées dans les mécanismes de prolifération cellulaire, bien que leur fonction biologique soit encore à déterminer (Leprince *et al.*, 1999).

D.ii MIK

La protéine MIK a été identifiée lors d'un criblage par double-hybride où une protéine récepteur kinase (PKR) atypique servait d'appât. Le récepteur est caractérisé atypique car son domaine kinase n'est pas fonctionnel. Une fois la protéine MIK liée au récepteur PKR, elle est activée et son activité kinase augmente, laissant planer l'idée d'un nouveau mécanisme de signallement par un récepteur kinase atypique. En se liant au récepteur kinase, le domaine régulateur auto-inhibiteur de MIK doit changer de conformation, permettant son activité kinase. C'est le premier exemple d'implication possible des MAP4K végétales dans les voies de signalisation. Ces deux protéines sont exprimées dans les tissus en développement, tout comme plusieurs membres des cascades de MAPK. La recherche de protéines impliquées dans les voies de MAPK permettrait d'inclure une MAP4K végétale dans l'une de ces voies (Llompart *et al.*, 2003).

1.4. Présentation du projet de recherche

Le projet de recherche réalisé lors de ma maîtrise avait pour but la caractérisation d'une protéine de type MAP4K impliquée dans la fécondation et la fructification chez la pomme de terre sauvage *S. chacoense* Bitt.

Une première partie consiste à l'analyse de la séquence de la protéine ScFRK3. Cela permet de connaître la nature de la protéine et les rôles qu'elle peut accomplir dans les cellules. La protéine ScFRK3 possède les caractéristiques d'une protéine de type sérine/thréonine kinase de la famille des MAP4K, et plus spécifiquement de la sous-famille des GCK/SPS1, quoique sa structure soit différente de celle de cette sous-famille. L'analyse du patron d'expression d'ARN indique que ScFRK3 est plus fortement exprimée dans les organes reproducteurs femelles que sont le style et les ovaires.

Le second volet comprend l'analyse de phénotypes de plantes modifiées génétiquement par technique d'interférence d'ARN. La construction insérée dans les

tissus végétaux entraîne l'induction d'une voie de défense contre certains virus qui reconnaît l'ARN double brin comme faisant partie d'un ennemi qu'il faut détruire, ainsi que les ARN simple brin correspondant. Les plantes transgéniques obtenues ne devraient donc plus exprimer (ou faiblement) la protéine ScFRK3, son messenger étant détruit avant traduction, ou encore ciblée pour la dégradation protéique. Les phénotypes observés touchent particulièrement la croissance des fruits et le nombre de graines que ceux-ci possèdent. Quatre plantes sur 45 ont un phénotype de petits fruits avec en moyenne 44% moins de graines que les fruits des plantes contrôles. Un retard dans la floraison ainsi qu'une sénescence plus rapide sont aussi observés chez deux de ces plantes. La protéine ScFRK3 serait impliquée dans la formation des ovules des graines, et/ou des fruits.

Finalement, des expériences de double-hybride dans le système Hybri-Zap ont été réalisées pour identifier les protéines interagissant avec la protéine ScFRK3. Nous avons utilisé les domaines régulateurs C-terminal et N-terminal comme appâts et deux banques d'ADN complémentaires ont été criblées. La première est formée d'ADNc d'ovaires non pollinisés et la seconde d'ADNc d'ovules déparicarpées, deux à six jours après pollinisation. Des protéines impliquées dans la fructification et l'abscision des fruits semblent interagir avec le domaine N-terminal de ScFRK3. Le criblage nous a aussi permis d'identifier l'actine, qui est présente dans le cytosquelette.

En résumé, les résultats accumulés sur la protéine ScFRK3 indiquent qu'il s'agit d'une protéine MAP4K importante dans le développement des ovaires et des fruits et qui interagit dans la levure avec des protéines nécessaires à la fécondation, la fructification et l'abscision des fruits.

2. Matériel et méthodes

2.1. Matériel végétal

Les expériences sur les plantes ont été réalisées sur l'organisme *Solanum chacoense* Bitt. qui est une espèce de pomme de terre sauvage diploïde ($2n=2X=24$) et auto-incompatible originaire du Chili. Les lignées proviennent originalement du Potato Introduction Center (Sturgeon Bay, Wis. USA). Des lignées transgéniques ont été produites en transformant des disques foliaires de plantes de type G4 possédant les allèles d'auto-incompatibilités S12 et S14. Dans tous les cas de pollinisation, nous avons utilisé du pollen provenant de plantes de type V22 possédant les allèles d'auto-incompatibilités S11 et S13, ce qui donne des croisements complètement compatibles avec les lignées de G4 transformées génétiquement ou non.

Les plantes de *S. chacoense* sont maintenues stérilement en culture *in vitro*; deux copies par plante transformée sont conservées. Lorsqu'elles ont atteint environ 10 cm, les plantes sont soit repiquées pour être conservées comme telles, soit mises en terre dans des pots de 8 cm de diamètre et introduites en serre dans un milieu d'acclimatation à 100 % d'humidité, avec 16 heures d'ensoleillement par jour et à une température d'environ 22 °C pour une durée de trois semaines. Après quoi elles sont placées en serre dans des pots de 22 cm de diamètre aux mêmes conditions qu'en milieu d'acclimatation, mais au taux d'humidité variable. La floraison a lieu environ trois mois plus tard.

2.2. Isolement d'ADN plasmidique par Miniprep

L'isolement du clone de ScFRK3 1 ainsi que son séquençage ont été effectués par Sébastien Caron. Martin O'Brien a réalisé un 5'RACE afin d'obtenir l'extrémité 5' du gène qui n'était pas comprise dans le clone de la banque d'ADNc. Pour isoler l'ADN plasmidique des clones d'intérêt contenus dans les bactéries de souche XL1 d'*Escherichia coli*, la méthode par lyse alcaline telle que décrite par Sambrook *et al* (1989) a été utilisée. Lorsqu'il fût nécessaire d'utiliser de l'ADN d'une grande pureté, par exemple lors du séquençage, le Kit QIAGEN fût préféré (Mississauga, ON) (QIAprep Spin Miniprep Kit). L'utilisation de ce kit se fait selon les indications du fabricant.

2.3. Transformation de bactéries électrocompétentes avec les vecteurs plasmidiques d'intérêt

Pour réaliser les transformations de bactéries avec nos constructions plasmidiques, nous utilisons la souche *E. coli* XL1. Chaque transformation est effectuée avec 23 μ L de bactéries et 2 μ L de la solution contenant le plasmide. Ce mélange est inséré entre les deux électrodes d'une cuvette à électroporation stérile qui est placée dans l'électroporateur. On administre ensuite un courant électrique de 2,2 kV/cm dans une cellule d'électroporation mesurant 1.5 mm. Le mélange est récupéré et mis dans une éprouvette contenant 1 mL de solution de LB. L'éprouvette est placée dans un incubateur-agitateur à une température de 37 °C pendant une heure. Ensuite, une fraction du liquide est étalée avec des billes de verre stériles (Fischer, Nepea, ON) sur un milieu LB-agar possédant les antibiotiques permettant de sélectionner les bactéries électrocompétentes qui ont acquis le plasmide. Le pétri est placé à 37 °C durant environ 15 heures.

2.4. Séquençage

Environ 200 ng d'ADN plasmidique sont nécessaires pour réaliser la réaction de synthèse d'ADN marquée au chromophore par PCR de séquençage effectué avec le « Big Dye Terminator kit » (Applied Biosystems, Mississauga, ON). Cette réaction est effectuée selon les instructions du manufacturier; toutefois, nous y avons

apporté certaines modifications. Nous utilisons 1/8 de la quantité suggérée de Big Dye, solution contenant un mélange d'enzymes et de nucléotides modifiés. Nous avons ajusté la quantité des autres composants de la réaction à ce volume. La réaction contient 1,8 pmol de l'amorce et 3,5 µL du tampon de séquençage 5X (400 mM Tris-HCL pH 9,0 : 10 mM MgCl₂). La réaction d'amplification s'effectue selon le programme suggéré par le fabricant, dans un thermocycleur de modèle PTV-200 de la compagnie Applied Biosystems. Selon les plasmides utilisés pour les constructions, différentes amorces ont été utilisées lors de ces réactions. Lorsque l'insert est inclus dans les plasmides TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA), pBK (Stratagene, LaJolla, CA) et pBS (Stratagene, LaJolla, CA), les amorces T3 (5'-ATTAACCCTCACTAAAGGGA-3') ou T7 (5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3') sont utilisées, selon l'orientation du séquençage désirée (en 5' ou en 3'). Lorsque l'insert est cloné dans les vecteurs pBD ou pAD (utilisés pour les expériences de double-hybride dans le système Hybri-Zap), les amorces utilisées sont pBD5'(5'-ATGGCATCATCATCG-3'), ou pAD5'(5'-GATACCCACCAAACCCAA-3') ou pAD3' (5'-CTGCAGTAATACGACTCAC-3') pour pAD, que nous avons fait synthétiser selon la séquence des vecteurs par la compagnie Sigma-Aldrich (Oakville, ON). Le séquençage est réalisé dans un appareil de type ABI PRISM 3100.

2.5. Analyses de séquences

Une fois le séquençage terminé, les séquences sont corrigées et analysées avec le logiciel MacVector version 7.3 (Accelrys). Les séquences en acides nucléiques sont traduites en acides aminés, selon le plus long cadre de lecture prédit, puis importées et comparées aux bases de données du NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Le logiciel Mac Vector a aussi été utilisé pour faire l'alignement de séquences de la figure 9.

2.6. Analyse phylogénique

Afin de réaliser deux arbres phylogéniques (figures 10 et 11), nous avons utilisé les séquences de domaine catalytique kinase de plusieurs protéines ainsi que

celle de ScFRK3. L'alignement a été effectué à l'aide du clustal W 1.8 inclus dans le logiciel MacVector. Les analyses phylogéniques ont été effectuées sur les domaines kinase des protéines selon la méthode d'alignement de Neighbour-J ou ClustalX.

2.7. Transfert d'ARN sur membrane et hybridation

2.7.1. Extraction d'ARN des tissus végétaux

Environ 100 mg de tissus sont récoltés et broyés avec un mortier de porcelaine, refroidi avec de l'azote liquide. La poudre récoltée est conservée à -80°C ou utilisée immédiatement. Nous utilisons le kit d'extraction d'ARN végétal « RNeasy Plant Minikit » de QIAGEN. Une fois l'ARN extrait, il est dosé par spectrométrie. Cinq cent nano grammes sont testés sur gel d'agarose 1 % afin d'en vérifier la qualité et de s'assurer de la concentration de l'ARN.

2.7.2. Transfert d'ARN sur membrane

Nous utilisons au total 10 μg d'ARN pour chaque échantillon. Le volume correspondant à cette concentration est placé dans un micro-tube de 1,5 mL, qui est ensuite placé dans un lyophilisateur rotatif, jusqu'à ce que tout le liquide se soit évaporé, ne laissant que l'ARN culotté et déshydraté au fond. Ce culot est ensuite suspendu à nouveau dans 2,8 μL de tampon A (MOPS/EDTA) et 7,2 μL de tampon FF (formaldéhyde 37% et formamide recristallisée) et dénaturés 10 minutes à 70°C . Puis y on ajoute 4 μL de tampon de chargement d'ARN (tampon A, xylène cyanol, bleu de bromophénol, sucrose, formaldéhyde 37% et formamide). Les échantillons sont chargés dans un gel d'agarose 1% contenant 6% de formamide comme agent dénaturant. Le gel migre jusqu'à ce que la première bande de colorant du tampon de chargement soit à 1 cm de la fin du gel. Une fois la migration du gel terminée, celui-ci est rincé trois fois dans de l'eau distillée. Le gel est ensuite traité dans deux bains successifs de 15 minutes d'une solution de 10 mM NaCl et de 50 mM NaOH pour la dénaturation des ARNm, puis dans deux autres bains de 15 minutes dans une

solution de neutralisation composé de 0.1 M Tris HCl pH 7.5, et enfin un dernier bain dans une solution de 20X SSC durant de 25 à 45 minutes. L'ARN est transféré par capillarité sur une membrane de nylon Hybond N+ (GE Healthcare). Le transfert s'opère pendant environ 18 heures, après quoi la membrane est rincée dans une solution de 6X SSC. Les ARN sont fixés à la membrane de nylon grâce à une incubation dans un four à U.V. réglé à une intensité de 120 000 J/cm² (Hoefer, UVC500).

2.7.3. Hybridation, marquage de la sonde et lavage des membranes

Les membranes sont préhybridées trois heures dans 15 mL d'une solution de préhybridation (50 % formamide, 200 µg d'ADN de sperme de saumon dénaturé/mL de solution d'hybridation, 1 % SDS, 0,9 % NaCl, 0,1 % Ficoll, 0,1 % polyvinylpyrrolidone, 0,1 % BSA, 6X SSC) dans un four rotatif à hybridation ajusté à une température de 45 °C. Pendant ce temps, nous synthétisons la sonde radioactive utilisée pour le marquage. La synthèse de toutes les sondes a été faite avec 100 ng d'un fragment de 1000 paires de bases du domaine N-terminal de FIK1. L'ADN est marqué radioactivement par l'isotope $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP (Perkin Elmer, Mississauga, ON), en utilisant soit le kit Ambion « StripEZ DNA kit » (Ambion inc, Austin, TX), soit le kit Roche « High Prime DNA labeling kit » (Roche, Laval, QC) selon les protocoles fournis par ces deux compagnies. Lorsque la synthèse de la sonde est terminée, nous utilisons une colonne Sephadex G-50 (Roche, Laval, QC), pour retirer de la solution les nucléotides radioactifs non incorporés. La colonne contenant la solution est centrifugée dans une centrifugeuse Beckman GS-15R 4 minutes à 1200 g. La sonde est alors dosée au compteur à scintillation. L'activité spécifique doit être supérieure ou égale à 50 coups par minute/µg. La solution de préhybridation est jetée, remplacée par 15 mL de la nouvelle solution d'hybridation 50 % formamide; la sonde marquée radioactivement est ajoutée et l'hybridation se poursuit pendant environ 20 heures. Les membranes subissent ensuite plusieurs lavages avec des solutions de SSC et de SDS. Un premier lavage de 30 minutes à 25 °C est réalisé avec une solution de 2X SSC et 0,1% SDS. Cette solution est utilisée

également lors du second lavage qui dure 30 minutes à 35 °C. Le troisième lavage s'effectue à 45 °C, durant 30 minutes, avec une solution de 1X SSC et 0,1% SDS. Le quatrième lavage nécessite la même solution que le troisième, mais est exécuté à 55 °C durant 30 minutes. Enfin, un dernier lavage optionnel peut être effectué avec une solution de 0,1X SSC et 0,1% SDS 10 minutes à 55 °C. Le marquage des membranes est ensuite évalué à l'aide d'un compteur Geiger (Dosimeter Corporation VWR, Ville Mont-Royal, QC). L'efficacité d'hybridation des membranes dicte le temps d'exposition de celles-ci avec un film Kodak Biomax MR (Kodak, Rochester, NY) dans une cassette d'exposition à un ou deux écrans d'intensification placée à -80 °C, ou sur un système d'imagerie au phosphore (Typhoon 9 200 phosphoimager).

2.8. Création de plantes transgéniques par interférence d'ARN

2.8.1. Construction du plasmide

La stratégie d'interférence d'ARN pour créer des plantes transgéniques n'exprimant plus ou faiblement la protéine ScFRK3, utilise le vecteur modifié (O'Brien *et al.*, 2002). Ce vecteur est une version modifiée du vecteur pBIN19S (Bevan, 1984) auquel nous avons ajouté le promoteur 35S du virus de la mosaïque du tabac, suivi d'un second « enhancer » et du terminateur de transcription Nos du gène de la nopaline synthase. Dans ce vecteur d'interférence, nous avons créé une construction complémentaire à la région N-terminale de ScFRK3 en sens 5'→3' et en antisens 3'→5', séparées par un lien flexible, un intron d'un gène d'histone désacétylase (Figure 5) (Legacé *et al.*, 2003). Le clonage a été réalisé en deux étapes, nous avons d'abord lié le domaine N-terminal par clonage directionnel en orientation sens, digérée puis liée par clonage directionnel en anti-sens. La construction a été vérifiée par digestion et mise sur gel.

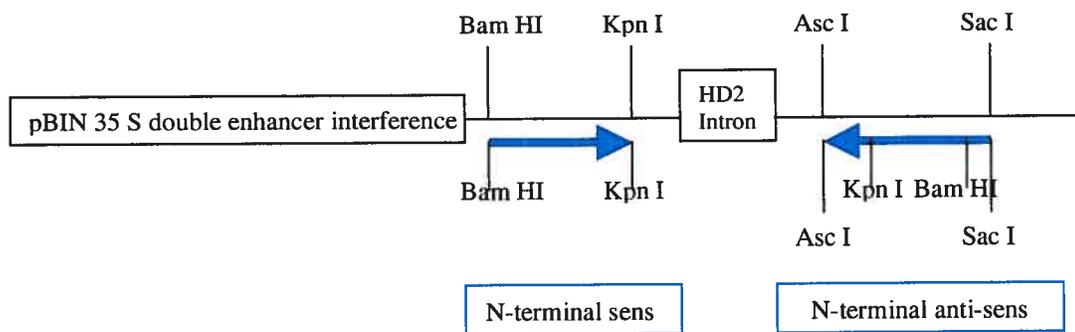


Figure 5 : Schéma de la construction clonée dans le vecteur pBIN 35 S modifié d'interférence, formée du domaine N-terminal de ScFRK3 sens et antisens relié par un lien flexible

Pour réaliser ce type de construction, une réaction de polymérase en chaîne (PCR) est faite afin d'amplifier la partie codante pour le domaine N-terminal de ScFRK3 qui utilise deux amorces spécifiques, FRK3-5 ARNi (5'GAGAGAGCTCGGATCCTGGAATTCGTCCGTCGTC-3'), et FRK3-6 ARNi (5'GAGAGGGCGCCGGTACCGCTCGTGGAGCAATTCATAC-3'), contenant deux sites de restriction chacune (l'amorce FIK1-5 ARNi possède les sites de restriction Sac I et Bam HI et FRK3-6 ARNi possède les sites de restriction Kpn I et Asc I) qui amplifient environ 1 000 paires de bases. La réaction de PCR se fait avec une unité d'enzyme de polymérisation Pwo (Roche, Laval, QC), 1X de tampon de réaction (contenant du MgSO₄ 2mM) fourni avec l'enzyme Pwo, 250 µM de dNTP, et 1µM de chacune de ces deux amorces spécifiques : FRK3-5 ARNi, FRK3-6 ARNi (Figure 8).

Ensuite, le produit de PCR ainsi que 100 ng de vecteur pBIN 35 S modifié sont digérés avec les enzymes de restrictions correspondant aux sites de restriction les plus internes ajoutés lors du PCR, soit Bam HI et Kpn I. Les deux digestions se font selon les recommandations du manufacturier (New England Biolab). Une fois complétées, celles-ci sont inactivées par un traitement au phénol-chloroforme-isoamyle, précipitées à l'éthanol 95% et resuspendues dans du tampon TE 1X. Suit une ligation (proportion vecteur : insert de 1 :4) en molarité avec une enzyme DNA ligase T4 (Gibco BRL, Burlington, ON), ainsi que son tampon de ligation fourni, à

14 °C durant 18 heures. La solution de ligation est ensuite précipitée à l'éthanol 95 % et digérée avec les enzymes de restriction correspondant aux sites de restriction externes, soit Asc I et Sac I. Puis, nous inactivons la réaction de digestion et effectuons une ligation de la même façon qu'expliquée ci-dessus. La fraction du gène de ScFrk3 insérée en anti-sens à ce moment comprend aussi les sites de restriction Bam HI et Kpn I (Figure 5).

2.8.2. Transformation et sélection de bactéries *E. coli* XLI

La solution de ligation est ensuite précipitée à l'éthanol 95 % et resuspendue dans 4 µL d'eau distillée. Deux microlitres de cette solution sont utilisés pour transformer des bactéries *E. coli* XLI électrocompétentes, tel que décrit à la section 2.3. Les bactéries transformées sont étalées sur milieux LB-agar possédant les antibiotiques tétracycline (résistance présente chez la bactérie) et kanamycine (résistance portée par le plasmide) pour sélectionner les bactéries ayant incorporé le plasmide.

2.8.3. Sélection des bactéries *E. coli* possédant la construction plasmidique

Les bactéries ayant poussé sur ce milieu de sélection sont ensemencées dans 4 mL de milieu LB ayant également ces deux mêmes antibiotiques. Le mélange est placé dans un incubateur avec agitation (200 rpm) à 37 °C pendant environ 18 heures. L'ADN plasmidique est ensuite isolé selon le protocole de Sambrook *et al* (1989). Les deux fractions du gène de ScFRK3 insérées à ce moment comprennent le site de restriction Bam HI, ce dernier se trouvant alors des deux côtés des insertions. On peut donc simplement digérer la construction avec l'enzyme de restriction Bam HI pour vérifier sur gel si l'on trouve un fragment de taille deux fois supérieure à celle obtenue lors du PCR et incluant la région de 250 pb correspondant à l'espaceur de l'intron du gène HD2 (Figure 5).

2.8.4. Transformation de bactéries *Agrobacterium tumefaciens* électrocompétentes

L'ADN plasmidique est ensuite utilisé pour transformer des bactéries *A. tumefaciens* électrocompétentes. La transformation se fait tel qu'expliqué à la section 2.3. Toutefois, la solution composée d'*A. tumefaciens* transformée avec le plasmide est laissée trois heures à 30 °C avant d'être mis sur milieu LB-agar contenant l'antibiotique streptomycine auquel la souche bactérienne est résistante et l'antibiotique kanamycine dont la résistance provient du plasmide pBIN 35S modifié. Le milieu est laissé au repos trois jours à 30 °C. Une colonie isolée d'*A. tumefaciens* est ensuite sélectionnée et mise en culture trois jours à 30 °C dans un erlenmeyer. Celui-ci contient 50 mL de milieu LB auquel ont été ajoutés les antibiotiques streptomycine (à une concentration finale de 25 µg/mL) et kanamycine (à une concentration finale de 50 µg/mL).

2.8.5. Préparation des tissus végétaux

Pour produire les plantes transgéniques, nous utilisons des tissus de feuilles de plantules de *S. chacoense* du génotype G4 cultivées stérilement *in vitro*. Les feuilles sont coupées en carrés d'environ un cm². Trois cents disques foliaires sont placés sur milieu d'induction A solide (3 % sucrose, 1 mg/L acide naphthaleneacétique, 9 mg/L 6-benzylaminopurine, vitamines MS, sels MS, 100 µM acétosyringone, agar) et laissés dans l'obscurité à température ambiante pendant 24 heures.

2.8.6. Infection des disques foliaires avec la solution d'*A. tumefaciens*

Lorsque la culture bactérienne est prête, elle est centrifugée et les bactéries culottées sont dissoutes dans du milieu A liquide (3% sucrose, 1 mg/L acide naphthaleneacétique, 9 mg/L 6-benzylaminopurine, vitamines MS, sels MS). Après avoir passé 24 heures sur milieux d'induction à l'obscurité, les disques foliaires sont mis en contact pour être infectés avec la solution bactérienne pendant une heure avec

agitation légère. Ils sont ensuite replacés sur le milieu d'induction solide A. Par ailleurs, une centaine de disques foliaires qui n'entrent pas en contact avec la solution bactérienne est conservée, afin d'être utilisée comme contrôles positifs et négatifs.

2.8.7. Génération de plantules transformées par la construction plasmidique

Les disques sont laissés deux jours sur le milieu d'induction A, et sont ensuite transférés sur un milieu d'induction solide B (3% sucrose, 1 mg/L acide naphthaleneacétique, 9 mg/L 6-benzylaminopurine, vitamines MS, sels MS, 500 mg/L céfotaxime, 50 mg/L kanamycine, agar). Cinquante disques foliaires non infectés servant de témoin positif sont placés sur un milieu d'induction solide B sans kanamycine. Cinquante disques foliaires non infectés servant de témoin négatif sont placés sur un milieu d'induction B avec kanamycine. Les disques foliaires sont transférés toutes les semaines sur un milieu d'induction solide B jusqu'à ce que des cals se forment. Puis ils sont transférés sur un milieu de régénération solide (3 % sucrose, 3 mg/L 6-benzylaminopurine, vitamines MS, sels MS, 200 mg/L céfotaxime, 50 mg/L kanamycine, 5 mg/L gibbérelline, agar) qui est renouvelé toutes les deux semaines jusqu'à l'apparition de plantules.

Les plantules sont transférées sur milieux 1/2 MS (sels MS, vitamines MS, sucrose, agar) contenant de la kanamycine, dans des tubes de croissance placés en culture *in vitro*. Elles y restent pendant un mois, après quoi elles sont repiquées sur milieux 1/2 MS charbon (sels MS, vitamines MS, sucrose, agar et charbon) ne contenant pas d'antibiotique. On les laisse croître un mois durant et ensuite, on les met en serre selon les conditions de croissances énoncées dans la section « matériel végétal ».

2.8.8. Recherche de phénotypes

Une fois en serre, la croissance et le développement des plantes transgéniques sont observés. Une plus grande attention est portée au développement floral et à la formation des fruits. La formation des fruits est étudiée en pollinisant plusieurs fleurs sur chaque plante transgénique ainsi que sur des plantes contrôle de type G4 sauvage. Les pollinisations, effectuées avec du pollen de plantes de génotype V22, sont alors complètement compatibles. La croissance des fruits est ensuite observée pendant 30 jours en mesurant leur diamètre à tous les deux ou trois jours à l'aide d'un vernier (Dial Max, Bel Art products, Pequannock, NJ). Lorsque 30 jours se sont écoulés, les fruits sont récoltés, photographiés et disséqués sous un binoculaire. Le nombre de graines total est compté, ainsi que la proportion de graines ayant formé un embryon mature par rapport à celles qui ne se sont pas développées ou qui n'ont pas formées d'embryon. Ces données sont compilées et analysées, afin de souligner les différences entre les plantes transgéniques et les plantes contrôles.

2.9. Criblage double-hybride dans le système Hybri-Zap

2.9.1. Construction des plasmides utilisés

Cinq constructions ont été réalisées pour les différents criblages de double hybride effectués dans le système Hybri-Zap (Stratagen Cloning Systems, LaJolla, CA). Trois d'entre elles ont été clonées dans le plasmide pBD, alors que les deux autres l'ont été dans le plasmide pAD. Les clonages ont été réalisés selon les mêmes principes que ceux utilisés lors de la création de plantes transgéniques. Les constructions réalisées dans le vecteur pBD sont produites avec le domaine N-terminal de ScFRK3 (249 acides aminés), le domaine C-terminal de ScFRK3 (353 acides aminés) ainsi qu'une portion de 580 acides nucléiques du domaine C-terminal. Des réactions de PCR ont amplifié chacune de ces sections de ScFRK3, grâce à l'utilisation d'amorces spécifiques :

1) Construction réalisée avec le domaine N-terminal de ScFRK3

Amorce en 5' FRK3-1pBD : 5'-GAGACCCGGGTGGAATTTTCGTCCGTCGTT-3'

Amorce en 3'FRK3-2pBD : 5'-GAGATCTAGAGCTCGTGGAGCAATTCATAC3'

2) Construction réalisée avec le domaine C-terminal de ScFRK3

Amorce en 5' FRK3-C5 : 5'-GAGACCCGGGCCTCCGAGATGCTAAAG-3'

Amorce en 3' FRK3-C1 : 5'-GAGAGTCGACAGATTCAACTATGAAGAATG-3'

3) Construction réalisée avec une partie du domaine C-terminal de ScFRK3

Amorce en 5' FRK3-C5 : 5'-GAGACCCGGGCCTCCGAGATGCTAAAG-3'

Amorce en 3' FRK3-C4 : 5'-GAGAGTCGACTGACAGTTTCACTTGGCA-3'

Une fois les réactions de PCR terminées, les solutions sont digérées (selon les recommandations du fabricant) avec les enzymes de restriction correspondant aux sites de restriction ajoutés par les amorces. Cent nanogrammes de vecteur pour chaque construction sont aussi digérés avec les mêmes enzymes que celles des réactions de PCR. Les réactions de digestion sont ensuite inactivées par un traitement au phénol-chlorophorme-isoamyle, puis précipitées à l'éthanol 95% et enfin dissoutes dans 10 µL d'eau distillée. S'ensuit une réaction de ligation composé d'un ratio molaire de quatre inserts pour un vecteur, de l'enzyme DNA ligase T4 (Gibco BRL, Burlington, ON) ainsi que de son tampon de ligation. La solution est placée à 14 °C durant 18 heures. On transforme ensuite des bactéries *E. coli* XLI électrocompétentes avec 2 µL de la solution de ligation. Les bactéries transformées ayant poussé sur milieu de sélection sont mises en culture liquide et l'on extrait l'ADN plasmidique avec le Kit QIAGEN (QIAprep Spin Miniprep Kit). La présence de l'insert dans le vecteur est vérifiée par analyse du patron de restriction. La construction est vérifiée par séquençage, en utilisant les amorces pBD 5' ou pBD 3'.

2.9.2. Transformation des levures

On transforme les levures PJ694a avec les inserts clonés dans les vecteurs pAD et pBD selon le protocole TRAF0 (Quick and easy TRAF0 Protocol : www.umanitoba.ca/faculties/medecine/biochem/gietz/Trafo.html). Les levures ainsi transformées sont mises sur milieu solide SC medium sans tryptophane (-Trp) pour les levures contenant le vecteur pBD, et milieu solide SC medium sans leucine (-Leu) pour les levures contenant le vecteur pAD. Elles sont ensuite placées à 30 °C durant trois jours.

2.9.3. Transformation des levures pour le criblage de banques

La transformation des levures pour le criblage de banques ainsi que la sélection des clones interactants positifs s'effectuent selon le protocole de criblage double-hybride Hybri-Zap. Les principes généraux sont détaillés ci-dessous.

Les colonies de levures contenant l'appât sont ensuite utilisées pour ensemer 25 mL de milieu SC liquide -Trp, puis placées dans un agitateur à 30°C pendant 15 heures. La densité de la culture est ensuite quantifiée et $2,5 \times 10^3$ cellules sont utilisées pour ensemer 50 mL de milieu YPAD (extrait de levure, peptone, glucose, adénine hémisulfate). La solution est incubée à 30 °C jusqu'à ce que la densité bactérienne atteigne 2×10^7 cellules/mL. Les cellules sont ensuite culottées, rincées à l'eau distillée stérile, reculottées, dissoutes dans 3 mL d'acétate de lithium (LiAc) 100 mM et placé à 30 °C 20 minutes. Elles sont reculottées, puis suspendues à nouveau dans 2,4 mL de 50 % PEG 3350, 360 μ L de 1.0 M LiAc, 500 μ L d'ADN de sperme de saumon dénaturé, 20 μ L de la banque d'ADNc clonée dans les vecteurs pAD, et de l'eau pour un volume final de 3,6 ml sont ajoutés. Cette solution est incubée à 30 °C 30 minutes, après quoi, les levures en solution subissent un choc thermique à 42 °C durant 30 minutes. Les levures sont ensuite culottées et resuspendues à nouveau dans 10 mL d'eau stérile, puis étalées sur milieux solides SC sans tryptophane, leucine ni histidine (-Trp-Leu-His). Pour calculer l'efficacité de la transformation deux μ L sont étalés sur un milieu SC sans tryptophane, ni leucine (-

Trp -Leu). L'efficacité de la transformation s'évalue en comptant le nombre de colonies présentes sur le milieu et en le multipliant par le volume total de la solution de levures. Les milieux sont laissés deux semaines à 30 °C. Les colonies ayant poussé sur ce milieu de sélection sont répliquées à l'aide de velours sur de nouveaux milieux de sélection SC solide sans tryptophane, ni leucine, ni adénine (-Trp-Leu-Ade) et sont laissés deux semaines à 30°C. Les colonies ayant passé cette sélection sont ensuite soumises au test X-gal; les colonies devenues bleues sont conservées pour passer un dernier test. Le test de ségrégation permet de déterminer si l'interaction entre les clones inclus dans pBD et pAD interagissent vraiment, ou si la proie seule permet la croissance sur milieu sans histidine, phénomène nommé auto-activation. Les colonies candidates sont cultivées 24 heures à 30°C dans du milieu YPAD liquide. Ce milieu non sélectif permet la perte de plasmides par les levures. S'ensuit la sélection des levures ayant perdu le plasmide pBD, mais qui ont conservé le plasmide pAD. Pour ce faire, elles sont étalées sur un milieu agar SC sans leucine (-Leu) qui est laissé trois jours à 30 °C. Les colonies sont ensuite répliquées avec un velours sur quatre milieux solides de sélection : -Leu, -Trp, -Trp et Leu, et -His. Ces milieux sont laissés sept jours à 30°C. La sélection des clones positifs se fait en analysant le patron de croissances des colonies de levures. Un vrai clone positif croît sur milieu -Leu uniquement. La croissance sur milieux -Trp et -Trp/-Leu indique que les levures n'ont pas perdu le plasmide pBD, et la croissance sur milieu -His indique qu'il y a auto-activation par la proie.

Il faut procéder ensuite à l'isolement de l'ADN plasmidique des levures contenant les clones positifs selon le protocole d'isolement d'ADN de levures fourni dans le protocole de double-hybride. Les clones isolés des levures servent à transformer des bactéries *E. coli* selon la technique expliquée dans la section 2.3. L'ADN plasmidique est ensuite isolé avec le Kit QIAGEN (QIAprep Spin Miniprep Kit), puis séquencé avec le « Big Dye Terminator kit » (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Mississauga, ON). Les séquences des clones positifs sont ensuite analysées selon la technique expliquée à la section **2.6 Analyses de séquences**.

2.10. Transfert de protéines sur membrane et immunodétection

2.10.1. Extraction de protéines

Des tissus végétaux sont récoltés et broyés à froid dans des mortiers. Un tampon d'extraction de protéines (100mM Tris-HCL pH 8, 0,1% LDS, 1% DTT et 1X de cocktail inhibitor complete mini de Roche) est ajouté aux tissus réduits en poudre, mélangé et centrifugé. Le surnageant est récupéré; il s'agit des protéines isolées en suspension. La concentration des protéines est déterminée par spectrophotométrie à l'aide de la méthode de coloration de Bradford selon les directives du fabricant Bio-Rad.

2.10.2. Migration des protéines et transfert sur membrane

Nous utilisons un gel de protéines dénaturant au LDS contenant 10% d'acrylamide pour effectuer la migration de 5 µg de protéines dans une cuve ayant un tampon de migration contenant la même proportion de LDS. La migration s'effectue dans une cuvette à électrophorèse « Mini-protein II 2-D Cell » de BIO RAD, pendant une heure à 150. Les protéines sont ensuite transférées sur membrane de cellulose 1 heure à 100V. L'utilisation du LSD à la place du SDS a été rendue nécessaire pour réduire la formation d'aggrégats et d'artéfact de migration causé par la protéine ScFRK3.

2.10.3. Immunodétection

Premièrement, n'ayant pas le clone complet de *scfrk3*, nous avons fait synthétiser un peptide de synthèse correspondant à une région hydrophobe et exposée de la protéine ScFRK3 pour obtenir un anticorps spécifique à cette protéine. La séquence ARYMSYWDRDEKSPVR située à la position 121 à 136 de la séquence en acides aminés a été utilisée. Un anticorps a ensuite été généré contre ce peptide synthèse par injection de lapin par la compagnie Cocalico.

Ensuite, la membrane contenant les protéines est placée une heure dans une solution de blocage de TBS 1X (Tris, Glycine, LDS) contenant de la BSA et du lait. La membrane est ensuite placée dans une nouvelle solution de blocage durant une heure, à laquelle l'anticorps de lapin primaire, ciblant une région hydrophobe de la protéine ScFRK3, est ajouté dans un ratio de 1 μ L d'anticorps dans 500 μ L de solution. S'ensuivent trois lavages de 15 minutes avec une solution TBS 1X, puis une incubation d'une heure dans une solution de TBS 1X contenant de la BSA et du lait en plus de l'anticorps secondaire monoclonal anti-rabbit IgG γ chain specific (Sigma) dirigé contre l'anticorps primaire. Puis, le tout est soumis à trois lavages de 15 minutes avec une solution TBS 1X. Une fois les étapes de marquage terminées, les étapes de détection sont effectuées. Le kit « ECL plus Western Boltting Detection System » de Amersham Biosciences est utilisé selon les indications du fabricant. Un film est placé sur la membrane et ensuite développé.

3. Résultats

3.1 Analyse de la séquence de ScFRK3

3.1.1 Séquence générale

La Figure 6 présente la séquence de ScFRK3 prédite en acides aminés. Le gène codant pour cette protéine a été isolé par une soustraction virtuelle ayant pour but d'identifier des gènes faiblement exprimés chez *S. chacoense* Bitt. Cette méthode s'est avérée fort efficace pour l'isolement de gènes régulateurs (Lagacé *et al.*, 2004). Les protéines en question pourraient être impliquées dans la signalisation cellulaire, sujet de recherche du laboratoire du docteur Matton. Ainsi, les clones isolés par soustraction virtuelle ont été séquencés et les séquences prédites en acides aminés ont été comparées aux séquences des banques de données de protéines du site Internet de Genbank afin de déterminer leur identité. L'une de ces protéines a attiré notre attention, car son site catalytique est fortement similaire à celui des protéines de type MAP4K. Par ailleurs, aucune MAP4K n'a encore été caractérisée fonctionnellement chez les végétaux. La séquence complète de cette protéine a été obtenue en juxtaposant la séquence en C-terminal du clone incomplet isolé lors de la soustraction virtuelle réalisée par Corine Zotti et Marie Lagacé avec la séquence obtenue par un —5' RACE— (5' « Rapid Amplification of cDNA ends ») réalisé par Martin O'Brien. Il semble que la séquence de la protéine soit complète, car la méthionine identifiée comme étant celle de départ est précédée d'un codon stop, et la fin de la séquence de la protéine est aussi déterminée par la présence d'un codon stop (une étoile sur la Figure 6). De plus, la taille obtenue lors des analyses de Northern correspond à la taille cumulée des ADNc isolés (3,5 kb). Cette protéine de 813 acides aminés nommée ScFRK3, pour « Fertilization Related Kinase 1 », est formée d'un domaine catalytique de 257 acides aminés, typique des kinases de type MAP4K (Figure 6, surligné en bleu), flanqué de deux domaines présumés de régulation : le domaine N-terminal (Figure 6, surligné en orange) contenant 246 acides aminés et le domaine C-terminal (Figure 6, surligné en rose) contenant 310 acides aminés.

3.1.2 Analyse des particularités de la séquence

Le domaine kinase possède la séquence consensus G-T/S-X-X-Y/F-X-A-P-E dans le sous-domaine VIII, soit la séquence GTPHWMape (Figure 6, les acides aminés correspondants étant de couleur bleu) qui indique une spécificité au résidu sérine/thréonine, à l'exception de l'acide aminé Y, qui est remplacé par un W (Hanks *et al.*, 1988). Une autre séquence signature est présente dans le sous-domaine VIB. La séquence conservée indiquant la spécificité du substrat de ScFRK3 dans le sous-domaine VIB n'est pas identique à celle identifiée pour les sérine/thréonine kinases par Hanks *et al.* en 1988, bien qu'elle en contient l'acide aspartique, l'asparagine et la lysine. Par contre, elle est identique à la séquence-consensus des protéines sérine/thréonine kinases du sous-groupe STE identifié par Hanks en 2003 : HrDi/vKg/aXN (les acides aminés en minuscules étant moins bien conservés, les X pouvant être n'importe quel acide aminé). Ces deux indices permettent de classer ScFRK3 dans la famille des sérine/thréonine kinases du sous-groupe des STE (Hanks *et al.*, 1988; Hanks, 2003).

Séquences dans le sous-domaine VIB

Sérine/Thréonine : **DLKPEN**

STE : HrDi/vKg/aXN

ScFRK3 : HRDIKGGNILL

Séquences dans le sous-domaine VIII

Sérine/Thréonine: GT/SXXY/FXAPE

ScFRK3 :GTPHWMape

De plus, les protéines incluses dans la famille des MAP4K possèdent une séquence-signature dans le sous-domaine catalytique VIII : **xgtxaWMAPEv** (les acides aminés en minuscules étant moins bien conservés entre les protéines que les acides aminés en majuscules, qui sont hautement conservés; les x pouvant correspondre à n'importe quel acide aminé). Cette séquence, que nous identifions chez ScFRK3, est soulignée en vert sur les Figures 10 et 11, les acides aminés étant également colorés en vert.

Selon le site internet ScanProsite, le domaine N-terminal possède plusieurs sites de myristoylation suivant la méthionine de départ, ce qui peut laisser croire à la possibilité d'un ancrage de la protéine ScFRK3 à la membrane cellulaire (Leprince *et al.*, 1999). Toujours selon le même site de prédiction, nous avons identifié dans ce domaine plusieurs acides aminés acides, notamment l'acide aspartique. Une région riche en cet acide aminé est soulignée d'un trait jaune à la Figure 6, créant une région acide qui pourrait être utilisée comme site d'ancrage à un substrat, un activateur, ou une protéine phosphatase (Tanoue *et al.*, 2000). Cette région pourrait être importante pour les interactions protéine-protéine. C'est d'ailleurs avec cette section de ScFRK3 que nous avons obtenu des interactants protéiques intéressants lors d'expériences de double-hybride relatées plus loin. Le site ScanProsite nous a également permis d'identifier le domaine de liaison à l'ATP, qui est surligné en vert sur la Figure 6, nous donnant un autre indice de l'activité kinase de ScFRK3.

Le domaine N-terminal contient deux domaines PXXP (Figure 6, en rouge) qui pourraient être des sites de liaison à des domaines SH3 de protéines interagissant avec ScFRK3 (Manser *et al.*, 1998). Le domaine C-terminal possède aussi deux domaines PXXP. Les protéines de type MAP4K de la sous-famille GCK/SPS1 sont entre autres caractérisées par la présence de sites de liaison à des domaines SH3 en position C-terminal (Cohen *et al.*, 1995; Yu *et al.*, 1994 et Kami *et al.*, 2002). Les domaines SH3 lient généralement les peptides ayant une région riche en prolines formant une hélice polyproline de type II, dont la séquence minimum consensus est PXXP. Les hélices formées ont la capacité de se lier à la poche hydrophobique du domaine SH3. Deux classes de séquences riches en prolines ont été caractérisées, la première possédant le motif consensus RXLPPRPXX, où X est n'importe quel acide aminé outre la cystéine. La seconde classe possède la séquence PXXPXR, et lie les domaines SH3 dans l'orientation inverse de ceux de la classe I (Yu *et al.*, 1994).

Le domaine C-terminal semble également contenir une séquence-consensus de liaison à la sous-unité G β de la protéine hétérotrimérique G $\alpha\beta\gamma$: le domaine GBD (G β binding domain) des MAP4K de type Ste20p/PAK. La séquence

STSLEPVGEGD située dans le domaine C-terminal (Figure 6, soulignée en gris) de ScFRK3 est similaire à environ 50% avec la séquence-consensus conservée chez les mammifères et les levures SSL ϕ PLI/VX $\phi\phi\beta$ (X peut être n'importe quel acide aminé, β un résidu basique et ϕ : A, I, L, S ou T) (Leeuw *et al.*, 1998 et Leberer *et al.*, 2000).

ScFRK3 : STSLEPVGEGD

Consensus : SSL ϕ PLI/VX $\phi\phi\beta$

Toutefois, un test d'interaction protéine contre protéine par double-hybride entre le domaine C-terminal de ScFRK3 ainsi qu'avec une section du domaine C-terminal de ScFRK3 et la protéine G β n'a pas permis de démontrer une interaction directe (résultat non présenté).

À la Figure 7, nous pouvons observer un schéma de la structure de la protéine ScFRK3 ainsi que les structures typiques des deux sous-familles de type MAP4K. La configuration de la protéine ScFRK3 diffère des deux types d'arrangements protéiques spécifiques des deux sous-familles de MAP4K. La sous-famille Ste20/PAK possède un domaine régulateur N-terminal et un domaine catalytique, le domaine C-terminal étant extrêmement réduit. Au contraire, la sous-famille GCK/SPS1 possède un domaine régulateur C-terminal en aval du domaine catalytique et un domaine N-terminal réduit. La Figure 7 montre également la séquence-consensus GBD et le domaine de liaison CRIB (ISXPXXXXHXXHVG) qui permettent aux protéines de type Ste20p/PAK de se lier à de petites GTPases (Leeuw *et al.*, 1998 et Leberer *et al.*, 2000). On peut aussi y observer les domaines de liaison (PXXP) au site SH3 des protéines de type GCK/SPS1 (Cohen *et al.*, 1995; Yu *et al.*, 1994 et Kami *et al.*, 2002).

1
 MEFRPSSWR.SRKPPPPAKQSDIYSTFVIHDNDRKTDEKDNSDLVATMVCCKDDDDDDV
 VDDLNDDESLLPPLKRLPKDFGGGGGAIDSVSDDMASISGTMIVKTRSSKFTTPK
 QPQQQTARYMSYWRDEKSPVRRRYEEDDEDEDEDEEGRFSTFVVKDNEFDSGTMVTR
 TVRSGSNEGVGSTMSRAVASMQAAGEIGIGRQRNRSSRAPSDDEEGGGGTLRPOGSKV
 246
 SSSSIPDSVTREDPCTKYELLHELKGSYGAVYKARDLRTSEMVAIKVISLSEGEEG
 YEEIRGEIEMLQOC SHPNVRYLGSYQGE EYLWIVMEYCGGGSVADLMNVTD EALEE
 YQIAFICREALKGLSYLHSIFKVRDIKGGNILLTDQGEV KLGDFGVA AOLTRTMSK
 RNTFIGTPHWMAPEVIQESRYDGKVDVWALGVSAIEMA EGLPPRATVHPMRVLFMIS
 503
 IEPAPMLEDK EKWSLVFHD FVAKCLTKDTRLRPTASEMLKHKFIEKFKAGASVMMPK
 IEKAKQIRASMALEAQNIVSETPEVIGGPKVNDEF GDTVP SKLKNDDAPSTSLPEVG
 EGD FGTMIVRDGPDI DKTANAEASSTLRRTGIPSIPTVAGKSN DPWLLNDIDVSSPV
 GMSQRQSMOVSSPGTLPSPDLALKGSTTSQATVSSGGGGYNTGTL PSETVSRRALDK
 LWSIYSAGNTVPI PFLRATDISPIALLSEDV LGDWQRD NSGKTAVEAMOELFSGDSQ
 SKKGRSRQNEVPLPPSVYQRLNSSPTLMNLAQALAYHKMKCYEEMPLQEMOASQECOT
 814
 IQNLCDTLR TILRL*

Figure 6 : Séquence prédite en acides aminés de ScFRK3. Le domaine N-terminal est surligné en orange, le domaine kinase en bleu et le domaine C-terminal en rose. Le site de liaison à l'ATP est souligné en vert. Une région riche en acides aspartiques est soulignée en jaune. La séquence présumée de liaison à Gβ est soulignée en gris. Les acides aminés de couleur bleue donnent la spécificité au substrat des protéines de la famille des sérine/thréonine kinases. Les acides aminés de couleur rouge sont les sites PXXP, possiblement des sites de liaison à des domaines SH3.

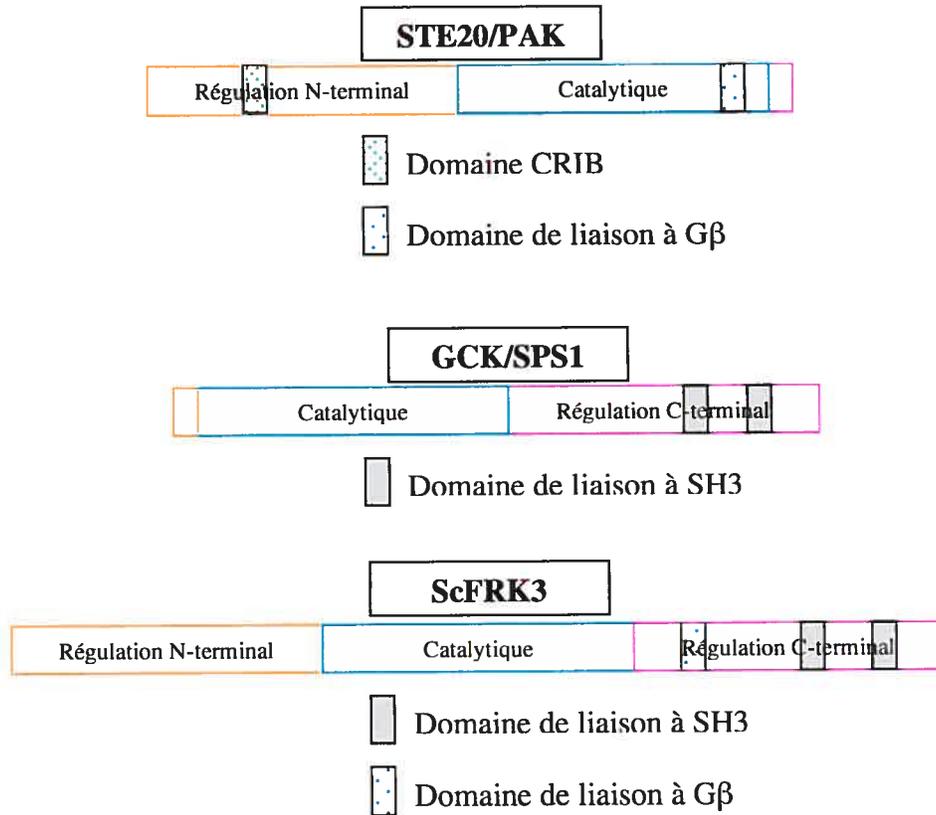
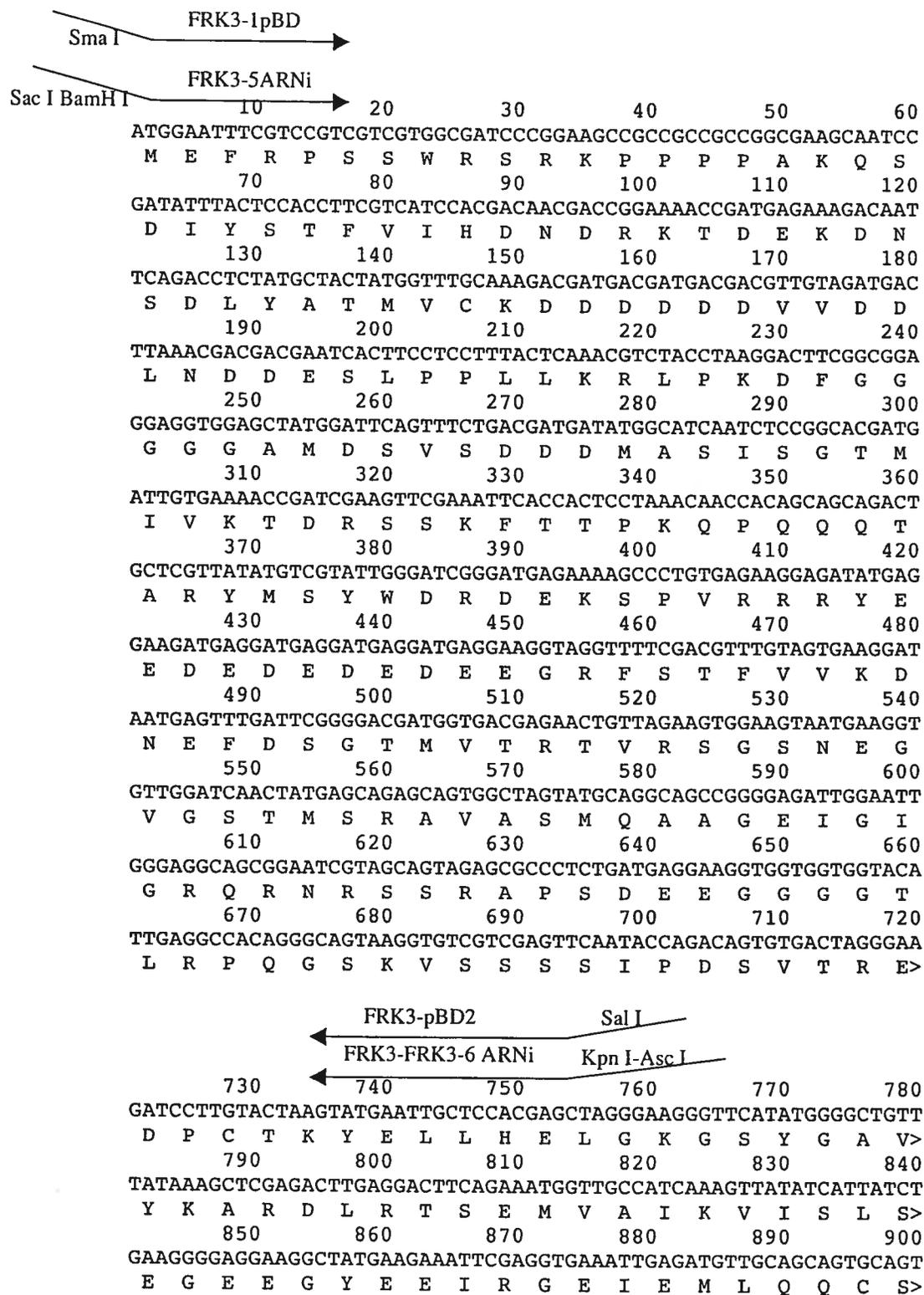


Figure 7 : Représentations schématiques de la protéine ScFRK3 ainsi que des protéines des deux familles de MAP4K : Ste20/PAK et GCK/SPS1

Légende :
 Rectangle orange : domaine N-terminal
 Rectangle bleu : domaine catalytique kinase
 Rectangle rose : domaine C-terminal

Séquence en acides nucléiques et en acides aminés correspondants de la protéine ScFRK3



910 920 930 940 950 960
 CATCCAAATGTTGTTTCGCTATCTTGGGAGCTACCAAGGAGAAGAGTACCTTTGGATAGTA
 H P N V V R Y L G S Y Q G E E Y L W I V>
 970 980 990 1000 1010 1020
 ATGGAGTATTGTGGGGGTGGAAGTGTGCTGACTTAATGAATGTCACAGATGAGGCTTTA
 M E Y C G G G S V A D L M N V T D E A L>
 1030 1040 1050 1060 1070 1080
 GAGGAGTATCAAATAGCATTATTTGTCGAGAGGCATTGAAGGGCCTCTCTATCTGCAC
 E E Y Q I A F I C R E A L K G L S Y L H>
 1090 1100 1110 1120 1130 1140
 TCTATTTTTAAAGTACACAGAGATATTAAGGTGGCAATATCTTACTGACTGATCAAGGA
 S I F K V H R D I K G G N I L L T D Q G>
 1150 1160 1170 1180 1190 1200
 GAGGTTAAGTTAGGTGATTTTGGTGTGCTGCGCAGCTGACTAGAACCATGTCCAAACGT
 E V K L G D F G V A A Q L T R T M S K R>
 1210 1220 1230 1240 1250 1260
 AACACGTTTATCGGCACTCCCCATTGGATGGCACCAGAAGTTATTCAAGAAAGTCGTTAT
 N T F I G T P H W M A P E V I Q E S R Y>
 1270 1280 1290 1300 1310 1320
 GATGGGAAGGTAGATGTATGGGCTCTCGGAGTGTCTGCTATTGAAATGGCGGAGGGTCTT
 D G K V D V W A L G V S A I E M A E G L>
 1330 1340 1350 1360 1370 1380
 CCTCTAGGGCAACAGTGCATCCAATGAGGGTGTCTATTTATGATATCCATTGAACCAGCT
 P P R A T V H P M R V L F M I S I E P A>
 1390 1400 1410 1420 1430 1440
 CCAATGCTTGAGGATAAAGAGAAATGGTCTCTTGTATTCCATGATTTTTGTTGCCAAGTGC
 P M L E D K E K W S L V F H D F V A K C>

Sma I

FRK3-C5

1450 1460 1470 1480 1490 1500
 CTTACAAAAGACACCCGACTTCGTCCAACCTCCGAGATGCTAAAGCACAAATTCATC
 L T K D T R L R P T A S E M L K H K F I>
 1510 1520 1530 1540 1550 1560
 GAAAAATCAAAGCAGGAGCTTCTGTAATGATGCCGAAGATTGAGAAGGCCAAACAAATT
 E K F K A G A S V M M P K I E K A K Q I>
 1570 1580 1590 1600 1610 1620
 AGGGCATCAATGGCCTTGGGAAGCGCAAAATATTGTTTCCGAGACTCCCGAGGTAATTGGA
 R A S M A L E A Q N I V S E T P E V I G>
 1630 1640 1650 1660 1670 1680
 GGTCCAAAAGTGAATGATGAATTTGGCGATACTGTTCCCTCTAAGCTGAAAAATGATGAT
 G P K V N D E F G D T V P S K L K N D D>
 1690 1700 1710 1720 1730 1740
 GCCCCTTCTACAAGCTTGGAGCCTGTGGGAGAAGGTGATTTTGGGACTATGATAGTCCGA
 A P S T S L E P V G E G D F G T M I V R>
 1750 1760 1770 1780 1790 1800
 GATGGACCTGATATTGATAAAACAGCAAATGCGGAAGCGTCATCTACTCTCCGGCGTACT
 D G P D I D K T A N A E A S S T L R R T>
 1810 1820 1830 1840 1850 1860
 GGAATTCCTTCCATCCCCACCGTTGCTGGCAAATCAAATGATCCCTGTTGCTTAATGAT
 G I P S I P T V A G K S N D P W L L N D>
 1870 1880 1890 1900 1910 1920
 ATTGATGTCAGTTCACCCGTTGGTATGTCCCAGAGACAGAGCATGCAAGTATCTTCTCTCT
 I D V S S P V G M S Q R Q S M Q V S S P>
 1930 1940 1950 1960 1970 1980
 GGAACCTTACCTTCTCTGATCTGGCCCTTAAGGGGAGTACTACATCTCAAGCAACTGTT
 G T L P S P D L A L K G S T T S Q A T V>

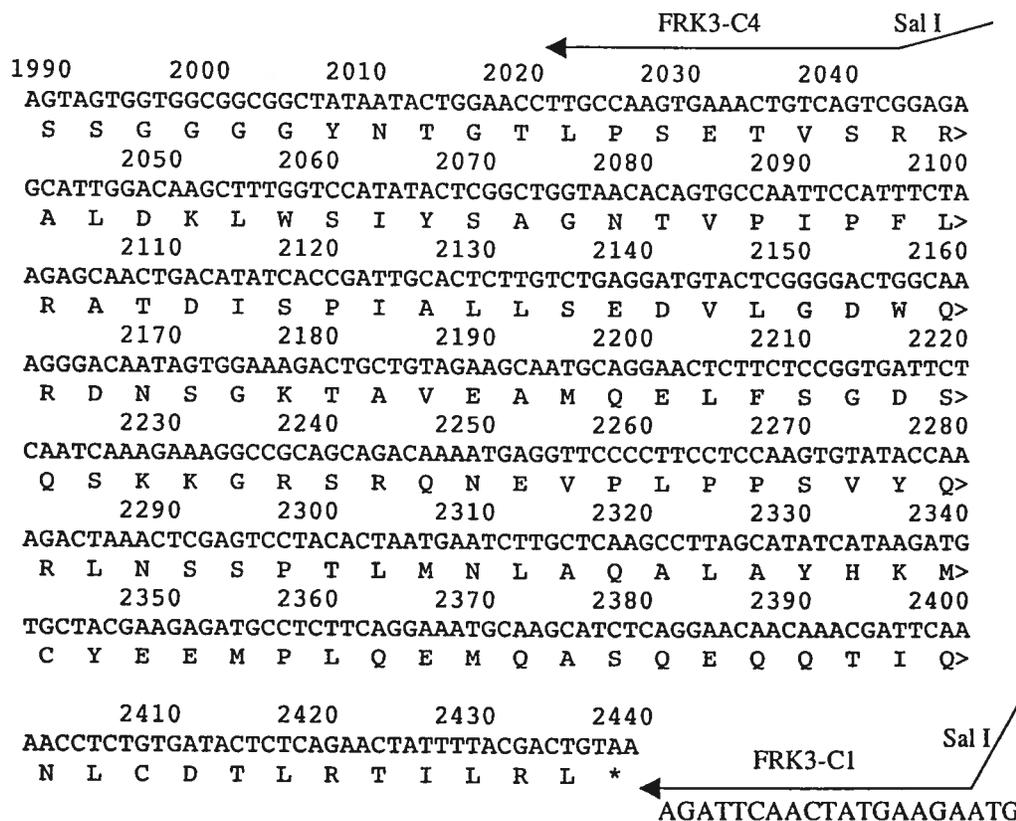


Figure 8 : Séquence codante de la protéine ScFRK3 en acides nucléiques ainsi qu'en acides aminés correspondant. Les flèches correspondent aux amorces utilisées lors des différents clonages (Section 2.0 matériels et méthode).

3.2 Analyse phylogénique

3.2.1 Classement de ScFRK3 comme une sérine/thréonine kinase de type MAP4K

La protéine ScFRK3 possède un domaine catalytique typique des kinases observable à la Figure 9. Celle-ci montre un alignement de séquences réalisé avec les domaines catalytiques de deux protéines ayant une forte similarité avec ScFRK3 selon le blast du site NCBI : SIK1 —Salicylic Induced Kinase 1— (numéro d'accèsion : U99613, communication personnelle de Per Winge) d'*Arabidopsis thaliana* et une protéine de la famille des sérine/thréonine kinases du blé (*Triticum monococcum*). L'alignement contient aussi d'autres protéines de type MAP4K connues : BnMAP4K α 1 de *Brassica napus* et MIK 1 du *Zea mays*, toutes deux des protéines végétales, et les protéines Ste20p de la levure *Saccharomyces cerevisiae* et gck-1 de *Caenorhabditis elegans*. BnMAP4K α 1, MIK et gck-1 sont incluses dans la sous-famille GCK/SPS1, tandis que Ste20p appartient à la sous-famille Ste20/PAK.

Cet alignement montre le haut taux de conservation de ce domaine chez les eucaryotes. Les 11 sous-domaines caractéristiques des kinases sont surlignés et identifiés par des chiffres romains et les 11 acides aminés essentiels à l'activité kinase apparaissent colorés en rouge. Plus spécifiquement, les MAP4K possèdent une séquence conservée dans le sous-domaine VIII, séquence identifiée en vert. La protéine ScFRK3 possède toutes ces caractéristiques. Les domaines N-terminal et C-terminal sont beaucoup moins conservés entre ces protéines, déterminant leur appartenance à leur sous-famille (Tableau 1).

Les pourcentages de similarité entre les domaines de type kinase et les protéines entières avec la séquence en acides aminés de ScFRK3 sont présentés dans le Tableau 1. Ce dernier met en évidence la faible conservation des domaines régulateurs N-terminal ou C-terminal entre les différentes protéines et ScFRK3, alors que les domaines catalytiques sont fortement conservés, avec 62 % et plus de similarité. La taille des différents domaines varie aussi chez les protéines, permettant

leur classement dans l'une des deux sous-familles de MAP4K. Par contre, ScFRK3 et SIK1 possèdent une organisation structurale différente ne permettant pas leur classement par l'observation de la taille de leur domaine régulateur. La protéine ayant le plus haut taux de similarité avec ScFRK3 est la protéine SIK1 d'*A. thaliana*, qui possède 72 % de similarité de séquence pour la protéine complète et 97 % de similarité avec le domaine catalytique. La protéine sérine/thréonine kinase isolée du blé (*T. monococcum*) est aussi très similaire à ScFRK3 dans la section catalytique (97 % de similarité), mais le pourcentage diminue lorsque nous comparons les deux protéines entières (67 % de similarité).

Tableau 1. Pourcentage de similarité des protéines homologues choisies par rapport à FRK3. Les comparaisons sont faites en prenant les protéines complètes, ainsi que les domaines catalytiques (entre parenthèses). La taille de chaque domaine des protéines est aussi comparée.

Nom des protéines	ScFRK3	SIK1	S/T kinase <i>T. monococcum</i>	BnMAP4K α 1	MIK	Ste20p	gck-1
% de similarité		72 (97)	67 (97)	36 (69)	36 (67)	28 (62)	38 (70)
Taille en a.a. de la région N-terminal	246	249	250	15	15	620	34
Taille en a.a. de la région C-terminal	313	334	322	418	422	69	369
Taille en a.a. du domaine catalytique	256	256	256	254	245	266	253
Taille en a.a. de la protéine totale	813	837	825	685	689	940	654

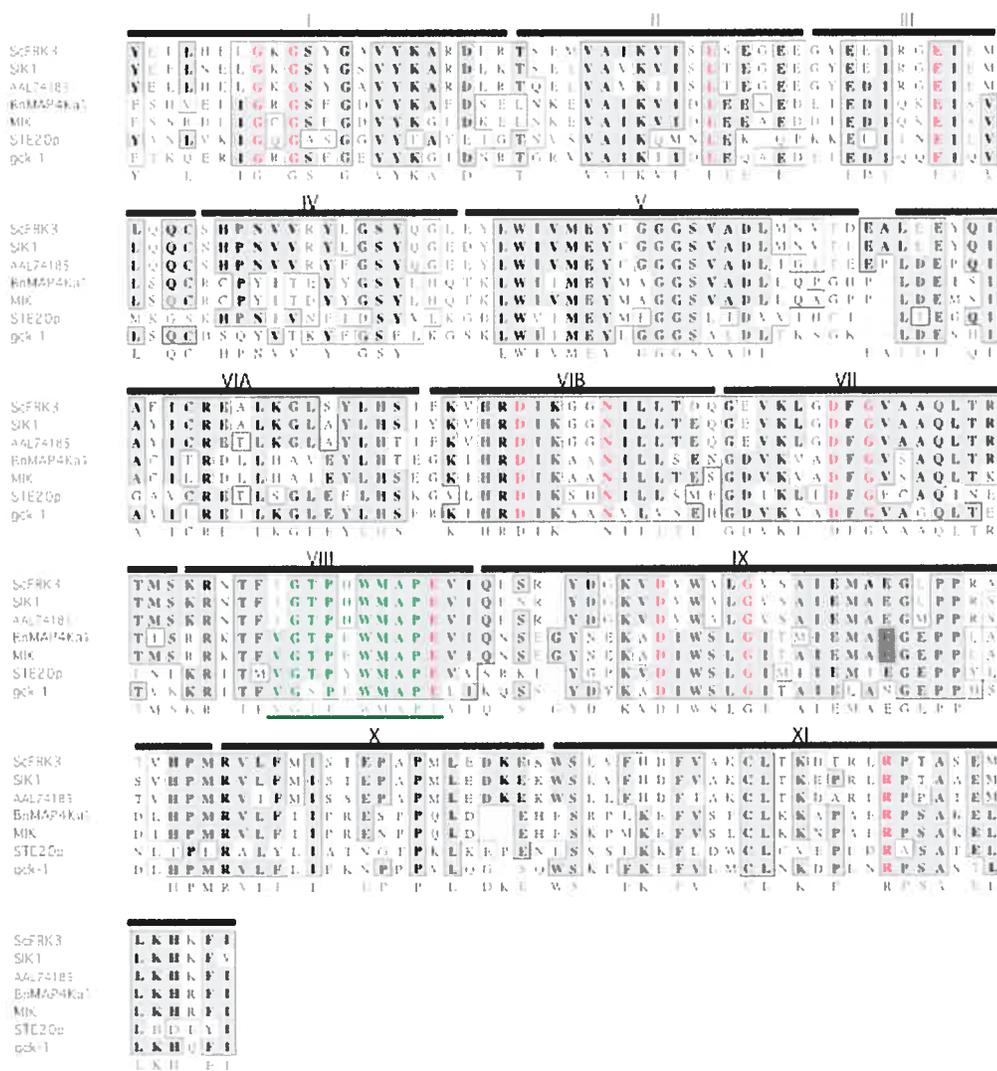


Figure 9: Alignement de domaines kinases de protéines de type MAP4K. Les acides aminés identiques sont en gris foncé, alors que les acides aminés similaires sont en gris pâle. Les 11 sous-domaines conservés chez les kinases sont surlignés d'un trait noir et identifiés en chiffres romains. Les 11 résidus conservés et essentiels à l'activité kinase sont identifiables à leur couleur rouge. La séquence-consensus conservée chez les MAP4K est soulignée d'un trait vert et les acides aminés sont colorés en vert. Numéros d'accèsion : SIK 1 : U99613, S/T kinase *T. monococcum* : AAL74185, BnMAP4K α 1 : AJ009608, MIK : AA083391, STE20p : Q03497, gck-1 : NP_505309

3.2.3 : Classement phylogénique de ScFRK3 chez les protéines des familles de MAPK

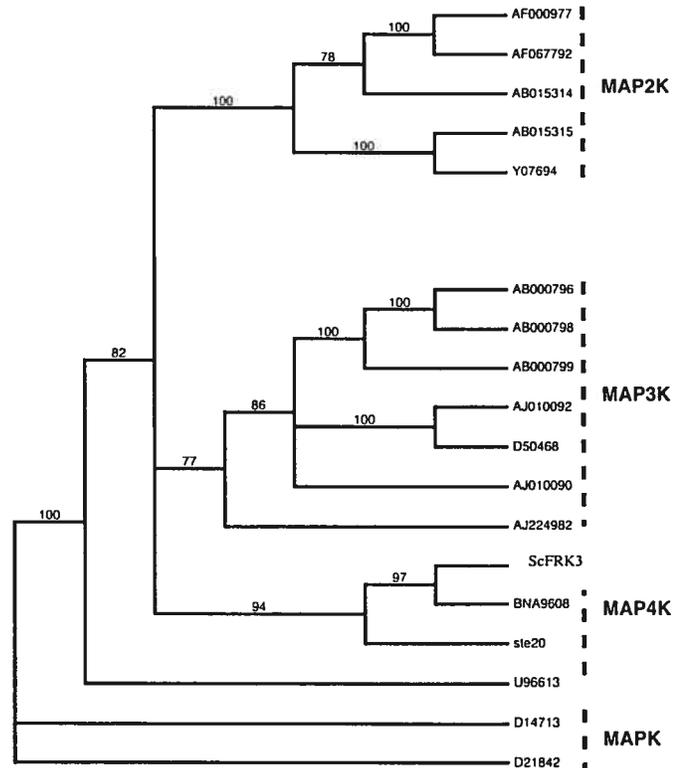


Figure 10 : Arbre phylogénique de protéines isolées chez *A. thaliana* représentant les différentes familles de MAPK, soit les MAPK, les MAP2K, les MAP3K, ainsi que les MAP4K selon Hirt *et al.*, 2000. La séquence de la MAP4K Ste20p de *S. cerevisiae* est également incluse. Arbre réalisé avec le logiciel Clustal X. Les chiffres sont en pourcentage et donnent une évaluation de la confiance du regroupement. Le nombre 100 signifie que dans tous les arbres possibles produits par ces alignements, 100 % ont regroupé ces protéines ensemble.

Lorsque l'on inclut le domaine catalytique de ScFRK3 dans un arbre phylogénique composé de protéines des différentes familles de MAPK isolées chez *A. thaliana* (Figure 10), ScFRK3 se positionne dans le sous-groupe des MAP4K avec la protéine Ste20p de la levure *S. cerevisiae*.

Plus particulièrement, la Figure 11 montre un arbre formé de domaines catalytiques de MAP4K connues chez l'homme, la souris, la levure *S. cerevisiae*, *A.*

thaliana, *B. napus*, *Z. mays* et *C. elegans*. La séquence du site catalytique de type MAP3K de la protéine Ste11p de *S. cerevisiae* est ajoutée comme extra-groupe. Cet arbre se divise bien selon les sous-groupes des deux sous-familles de MAP4K caractérisées, les GCK/SPS-I, II, III, IV, V et VI, ainsi que les deux sous-groupes PAK-I et PAK-II de la sous-famille des Ste20/PAK. La protéine ScFRK3 se positionne dans la sous-famille des GCK/SPS et semble près du sous-groupe GCK-IV, mais à l'intérieur d'un sous-clade formé d'autres protéines végétales à organisation protéique différente des MAP4Ks, puisqu'elles ont toutes deux domaines régulateurs enclavant le domaine catalytique kinase. La plupart des protéines isolée d'*A. thaliana* se classent dans le sous-groupe des GCK-VI.

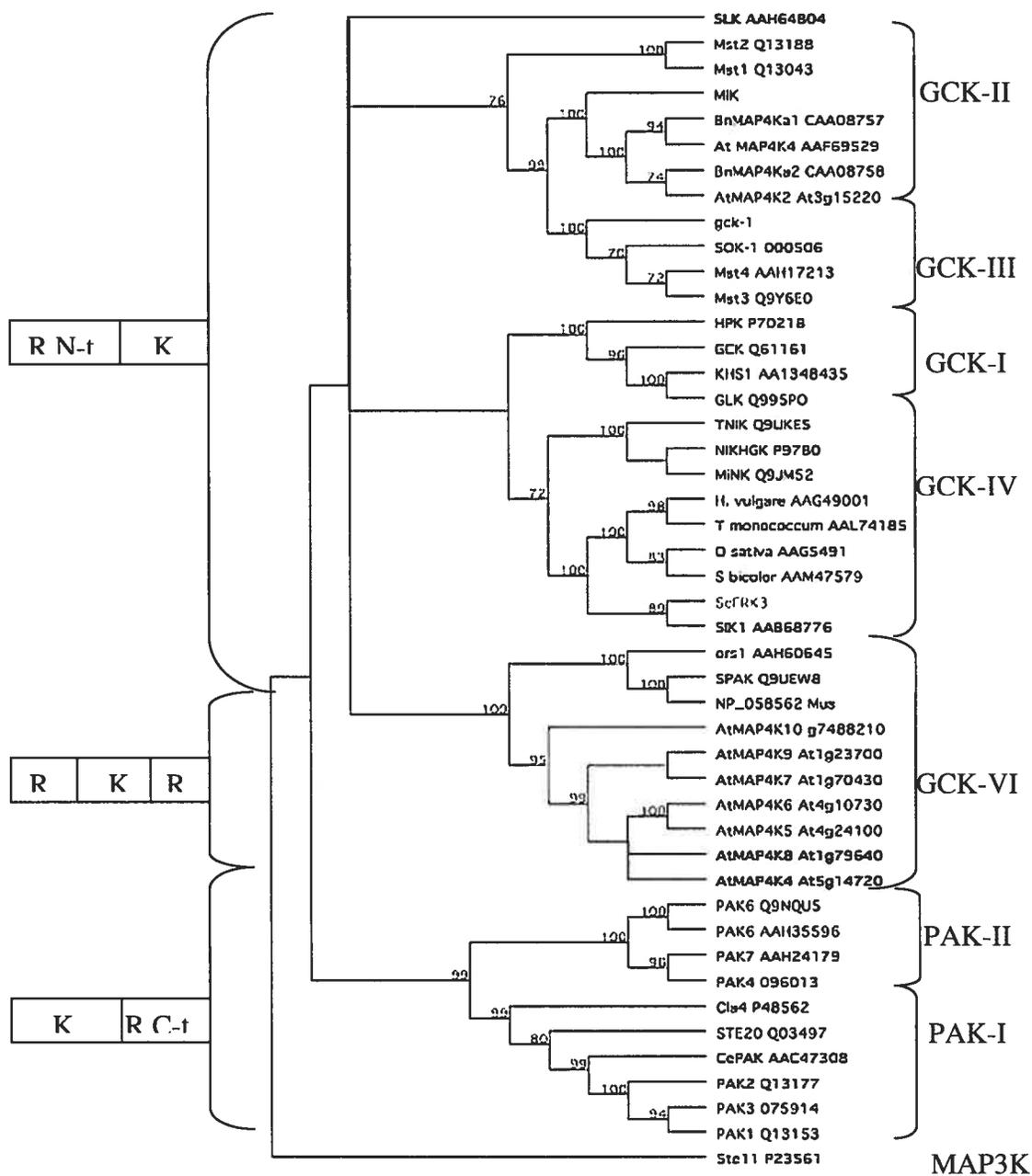


Figure 11 : Arbre phylogénique de type Neighbour-J des domaines catalytiques de protéines de type MAP4K isolées de divers organismes. Le domaine catalytique de la protéine de type MAP3K Ste11p de *S. cerevisiae* est ajouté en tant qu'extra-groupe. Les chiffres sont en pourcentage et donnent une évaluation de la confiance du regroupement. Le nombre 100 signifie que dans tous les arbres possibles produits par ces alignements, 100 % ont regroupé ces protéines

3.3. Expression de FRK3

3.3.1. Déduction du nombre de copies du gène

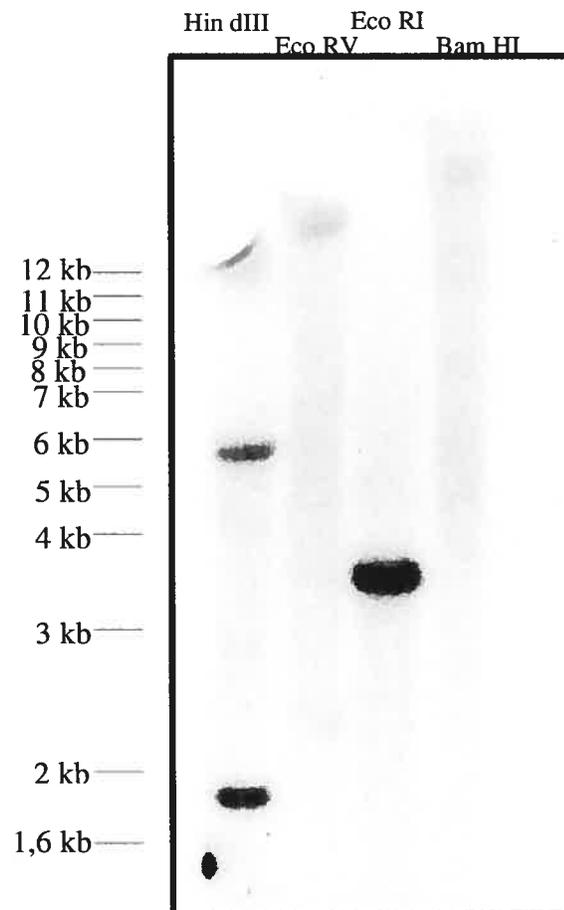


Figure 12 : Southern-blot composé d'ADN génomique de feuilles de *S. chacoense* digérée avec les enzymes de restriction *Hin* dIII, *Eco* RV, *Eco* RI, et *Bam* HI hybridé avec une sonde correspondant au domaine N-terminal de ScFRK3 marquée au [α - 32 P]dATP

La Figure 12 a été réalisée par Martin O'Brien. Le Southern hybridé avec la portion codante pour le domaine N-terminal de ScFRK3 d'environ 800 paires de bases montre que ce gène est à copie unique. Le domaine N-terminal est utilisé pour augmenter la spécificité de l'hybridation, le domaine kinase étant fortement conservé entre les différentes protéines kinases. Nous observons deux bandes de 1,9 kb et 5,5

kb dans le puits contenant l'ADNg digéré par l'enzyme Hind III, une bande de poids supérieur à 20 kb dans le puits EcoR V, une bande à 3,6 kb dans le puits Eco RI et, enfin, une bande de poids supérieur à 20 kb dans le puit BamH I. La séquence codante de ScFRK3 utilisée pour l'hybridation ne contient aucun des sites de restriction. La présence de deux bandes dans le puits Hind III peut s'expliquer par la présence d'un site de restriction dans un intron. La présence d'introns est fortement possible; en effet, la protéine ayant le plus de similarité avec ScFRK3 chez *A. thaliana* possède 11 introns. Le northern montre une expression de ScFRK3 dans tous les tissus à l'exception du tube pollinique.

3.3.2. Patron d'expression de ScFRK3

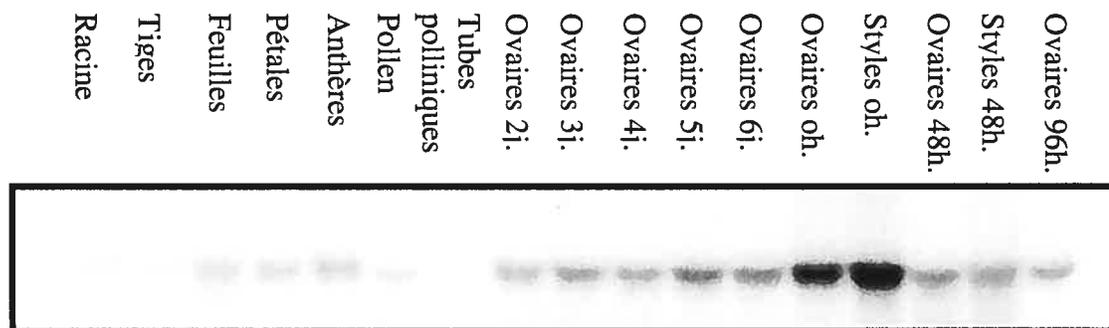


Figure 13 : Northern-blot composé d'ARN de différents tissus de *S. chacoense* hybridé avec une sonde correspondant au domaine N-terminal de ScFRK3 marquée au $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$. Chaque puits contient 10 μg d'ARN de tissus. Les ovaires ont été récoltés sur des fleurs de 2 à 6 jours, et d'autres ovaires et styles ont été recueillis sur des fleurs de 0 à 3 jours. Ces dernières ont été récoltées avant pollinisation, et 48 et 96 heures après pollinisation. Les pollinisations ont été exécutées avec du pollen de fleurs V22. L'ARN messager a une taille de 3,2 kb.

Le northern réalisé avec plusieurs tissus de *S. chacoense* hybridé avec le domaine N-terminal de ScFRK3 montre que l'ARN de ScFRK3 est exprimé dans

tous les tissus, à l'exception du tube pollinique (Figure 13). L'expression est à son plus haut niveau dans les styles et ovaires non pollinisés.

3.4. Lignées transgéniques par interférence d'ARN

3.4.1. Analyse de phénotypes

3.4.1.1. Petits fruits

Une partie de ce projet de maîtrise traite de la caractérisation des rôles de la protéine ScFRK3 *in vivo* chez *S. chacoense*, ce qui nous a fait produire des plantes transgéniques en utilisant la machinerie d'interférence d'ARN présente chez les végétaux (la technique utilisée est expliquée à la section Matériels et méthodes).

L'une des constructions réussies a été utilisée pour créer des plantes transgéniques. En effet, nous avons criblé 45 plantes résistantes à la kanamycine, qui ont donc été transformées avec le plasmide pBIN 35S et qui contiennent le transgène de ScFRK3.

Aussi, nous avons observé l'allure générale des plantes. Deux d'entre elles présentent des signes de vieillissement accéléré (plantes 40 et 50). La plante 40 est plus petite que les plantes témoins G4. Le phénotype le plus marqué s'observe dans les fruits, qui ont parfois une croissance réduite. Les plantes 26, 30, 40 et 50 forment de petits fruits (Figure 14) avec un nombre de graines viables plus faible que celui des fruits des plantes contrôles (Tableau 2). La taille moyenne des fruits ainsi que le nombre de graines viables par rapport au nombre total de graines des plantes présentant des différences phénotypiques sont présentés dans le Tableau 2. Plusieurs pollinisations réalisées avec du pollen de plantes compatibles V22 ont été réalisées afin d'observer le développement des fruits des plantes transgéniques et leur taux de croissance. Le diamètre des fruits a été mesuré aux deux à trois jours pendant un mois. La figure 14 montre les fruits des plantes ayant un phénotype de petits fruits par rapport aux fruits de plantes témoins G4. La courbe de croissance de ces fruits est

présentée sur le graphique 1, où nous observons une croissance réduite pour les fruits des plantes 26, 30, 40 et 50, cette dernière présentant un phénotype plus fort que les autres qui sont semblables entre eux. Vingt-neuf jours après pollinisation, les fruits des plantes témoins ont un diamètre de 23 mm en moyenne, alors que les plantes montrant le phénotype de petits fruits, ont des fruits au diamètre moyen allant de 13 mm à 17 mm.

3.4.1.2. Nombre de graines

Nous nous sommes intéressés au nombre de graines présentes dans ces fruits ainsi qu'au ratio entre les graines matures et les graines avortées. Le Graphique 2 montre le diamètre moyen des fruits 30 jours après pollinisation de plantes ayant un phénotype de petits fruits (plantes 26, 30, 40 et 50), de plantes G4 contrôles, ainsi que de deux plantes transformées ne présentant pas ce phénotype (plantes 2 et 20). Ce dernier graphique sert d'élément comparatif au Graphique 3 qui présente le nombre moyen de graines matures (bandes bleues) et le nombre de graines avortées (bandes vertes) pour les mêmes plantes que le Graphique 2. Les plantes ayant le phénotype de petits fruits montrent un nombre de graines réduit : de 16 à 127 graines maximum en moyenne, alors que les fruits des plantes contrôles ont entre 180 et 220 graines. Le pourcentage de graines matures est semblable à celui des fruits des plantes contrôles, environ 48 % (Tableau 2). Les trois plantes étudiées transformées sans phénotypes (plantes 2, 6 et 20) sont semblables à la plante témoin, c'est-à-dire qu'elles ont des fruits portant de 180 à 220 graines au total, dont 58 % de graines matures, les autres étant sans embryon viable. Le Tableau 2 permet la visualisation du plus faible nombre total de graines des fruits ayant un diamètre réduit.

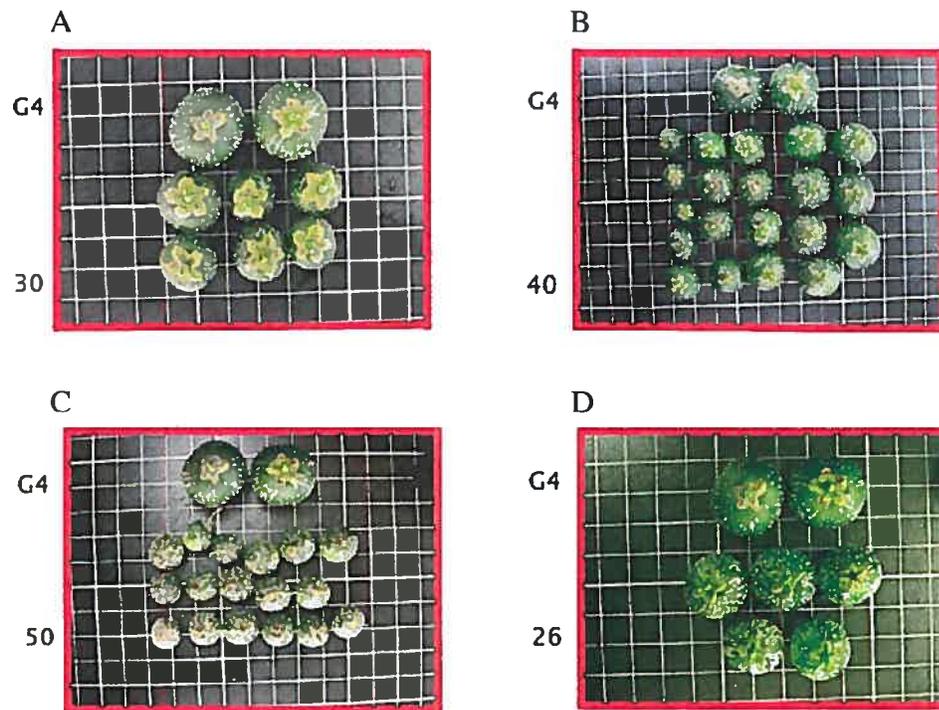
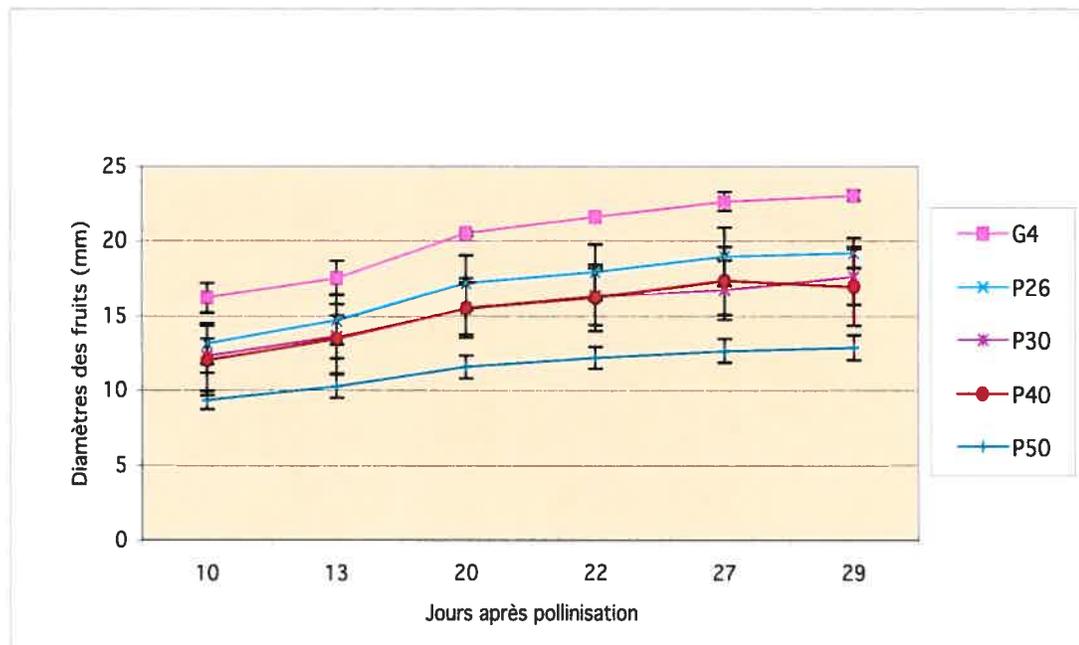
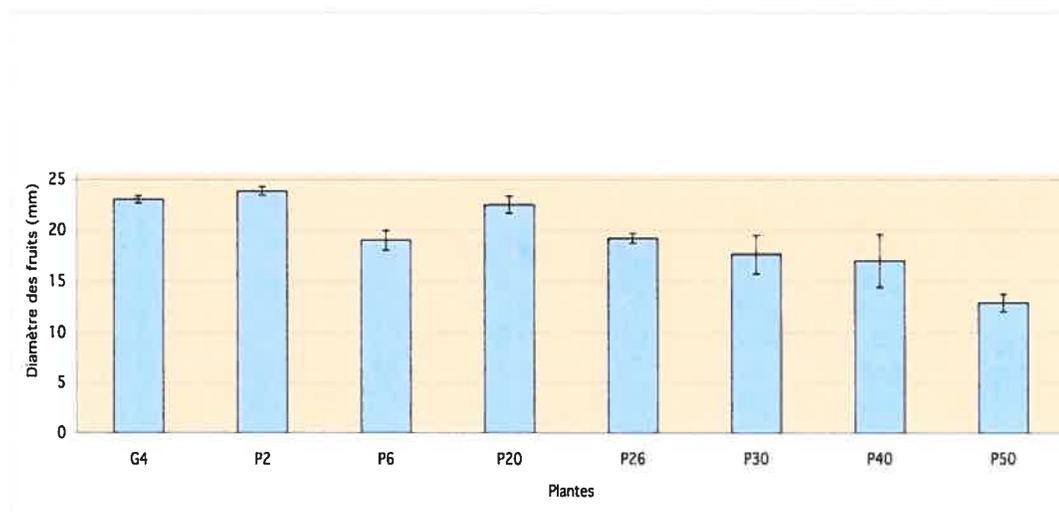


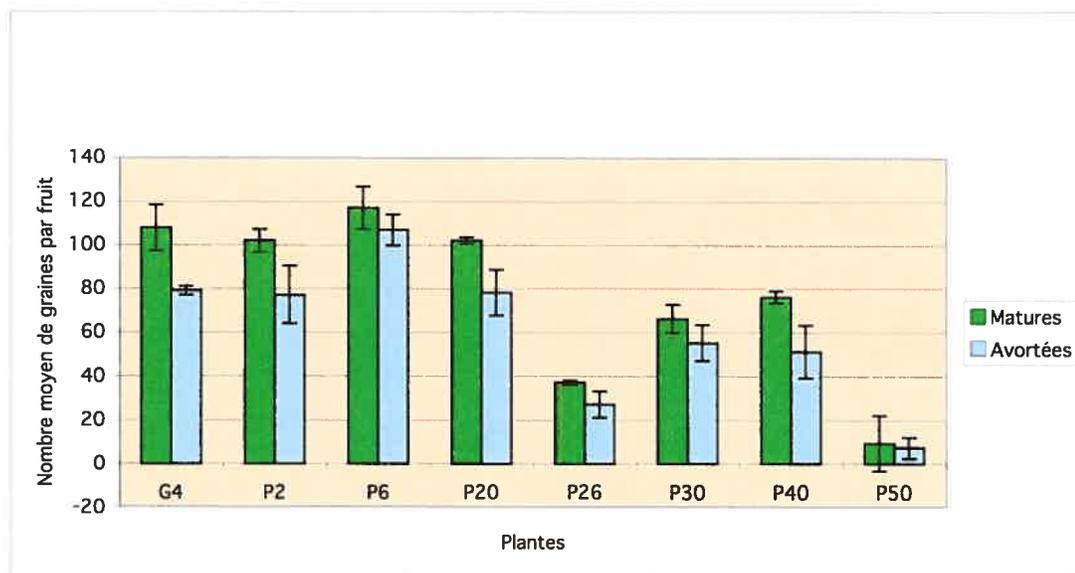
Figure 14 : Photos comparatives de la taille des fruits de plantes transgéniques modifiées par interférence d'ARN présentant un phénotype de petits fruits (A : Deux fruits de la plante G4 en position supérieure et six fruits de la plante 30 en position inférieure, B : Deux fruits de la plante G4 en position supérieure et 20 fruits de la plante 40 en position inférieure, C : Deux fruits de la plante G4 en position supérieure et 17 fruits de la plante 50 en position inférieure, D : Deux fruits de la plante G4 en position supérieure et six fruits de la plante 26 en position inférieure. Les fruits ont été cueillis 30 jours après pollinisation avec du pollen de plantes V22 entièrement compatible. Chaque carré mesure un cm.



Graphique 1 : Présentation des courbes de croissances des diamètres des fruits. Les courbes correspondant aux différentes lignées mutantes ainsi qu'au contrôle G4 sont identifiées à droite du graphique.



Graphique 2 : Diamètre moyen des fruits. Les plantes sont identifiées par un numéro sur l'axe de l'abscisse, alors que l'ordonnée est séparée en millimètres. Les bandes montrent le diamètre moyen en mm des fruits des plantes correspondantes.



Graphique 3 : Les plantes sont identifiées par un numéro sur l'axe de l'abscisse. La plante G4 est le témoin.

Tableau 2 : Nombre et pourcentage de graines matures et avortées des fruits (30 jours après pollinisation avec du pollen de plantes V22 compatibles) des plantes témoins G4, des plantes transformées sans phénotypes, et des plantes transformées présentant le phénotype de petits fruits.

Plantes	Nb total moyen	Pourcentage de graines matures
G4	187	58 %
P2	179	57 %
P6	224	52 %
P20	180	57 %
P26	64	58 %
P30	121	55 %
P40	127	63 %
P50	16	56 %

3.4.1.3. Types de graines

En plus des graines matures et des graines avortées, certains fruits des plantes transgéniques avaient une ou deux graines de couleur brune de la taille des graines matures et de texture dure (Figure 15). Les graines matures (Figure 15 A) sont blanches et bombées, ont un embryon mature et de l'albumen. Les graines avortées sont plates et plus foncées (Figure 15 B). On y remarque aussi de petites ovules qui n'ont pas été fécondées et qui ne se sont pas développées. Le phénotype le plus intéressant s'observe par la présence de graines de taille normale, mais brunes et dures, sans embryon détectable (Figure 15, D). La plupart des fruits des plantes 26, 30 et 50 portent d'une à trois graines de ce type. Nous n'avons pas identifié de telles graines chez les plantes 2, 6 20 et 40.

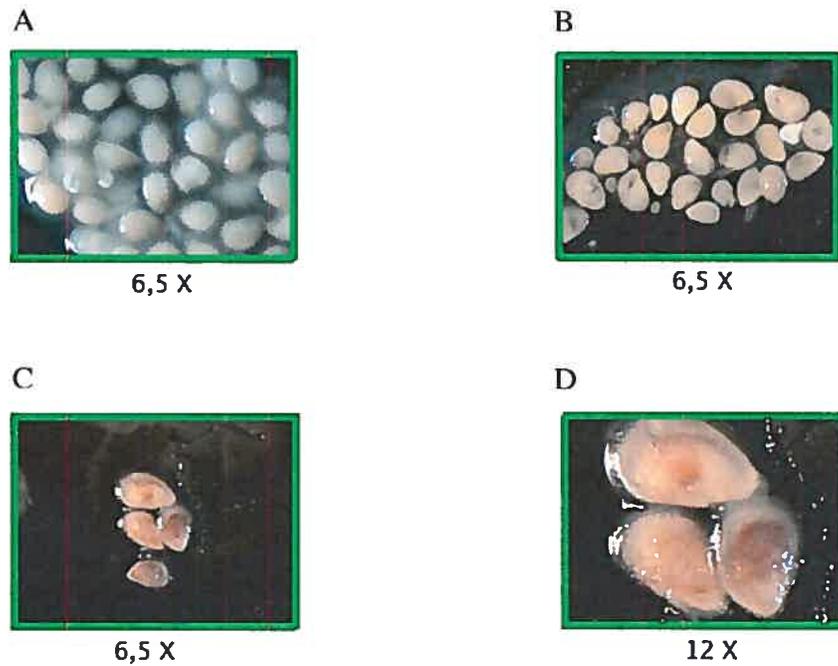


Figure 15 : Phénotype de graines des fruits des plantes transgéniques, 30 jours après avoir fait des pollinisations totalement compatibles. La Figure 15 A présente des graines matures semblables à celles obtenues avec les fruits de plantes témoins. La Figure 15 B présente des graines avortées ainsi que des graines qui ne se sont pas développées. Enfin, les Figures 15 C et 15 D présentent des graines brunes uniquement trouvées dans les fruits des plantes transgéniques 26, 30 et 50.

3.4.3. Vérification du niveau d'expression de ScFRK3 chez les lignées transgéniques

Afin de vérifier la présence du transgène chez les plantes montrant un phénotype, nous avons réalisé une amplification de transgène inséré dans le vecteur d'interférence d'ARN contenant un domaine kanamycine en aval du fragment inséré. La présence d'une bande de la taille du fragment inséré après avoir exécuté un PCR sur l'ADN génomique des plantes transformées avec des amorces complémentaires au domaine de résistance à la kanamycine, et l'absence de bande chez les plantes contrôles indique que les plantes ont bien intégré le transgène. Les résultats des PCR sont présentés dans le Tableau 3. Il y a eu amplification de l'ADN génomique chez toutes les plantes transformées étudiées ayant un phénotype ou non, à l'exception de la plante 50. Cette absence d'amplification peut s'expliquer par un remaniement du génome lors de l'insertion du transgène par la plante.

Tableau 3 : Amplification ou non du fragment codant pour le gène de résistance à la kanamycine

Plantes	Amplification du fragment kanamycine
G4	NON
6	OUI
12	OUI
20	OUI
26	OUI
30	OUI
40	OUI
50	NON

Pour s'assurer de la présence du transgène chez la plante 50, ainsi que pour vérifier l'indépendance des lignées transgéniques réalisées, nous avons analysé le patron obtenu une fois l'ADN génomique des différentes plantes transformées coupé avec l'enzyme de restriction Eco RI et hybridé avec une sonde radioactive correspondant au domaine N-terminal de ScFRK3 (Figure 16). La présence d'une bande de 3,6 kb chez toutes les plantes concorde avec les données obtenues à la Figure 12. En effet, le Southern effectué sur l'ADNg de la plante contrôle G4 montre une bande de 3,6 kb lorsqu'il y a digestion avec l'enzyme Eco RI, il est donc normal d'observer une telle bande chez toutes les plantes, transformées ou non. Aussi, la présence de patrons différents de bandes chez les plantes transformées, alors que la plante contrôle ne présente qu'une bande claire, prouve la présence du transgène ainsi que l'indépendance de leur lignée.

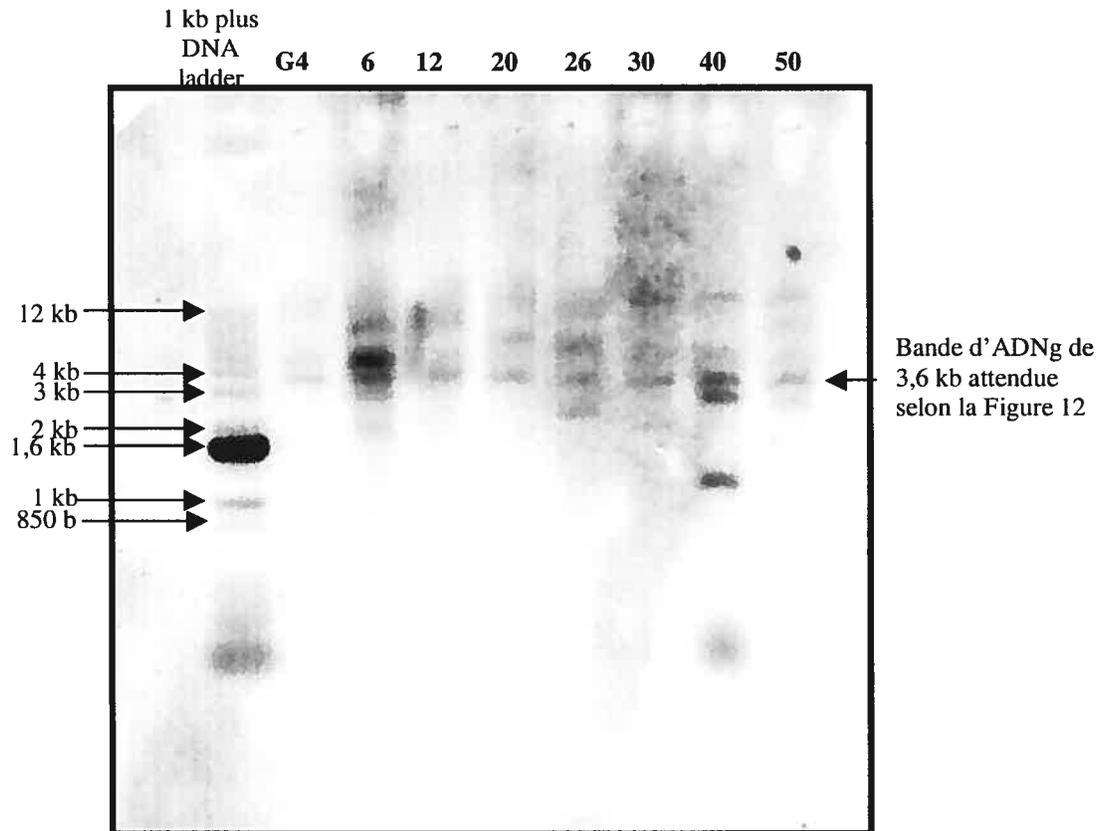


Figure 16 : Patron d'hybridation de 10 µg ADNg coupé avec l'enzyme Eco RI de la plante contrôle G4 et des plantes transformées 6, 12, 20, 26, 30, 40, et 50 transféré sur membrane et hybridée avec une sonde marquée au $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dATP correspondant au domaine N-terminal de la protéine ScFRK3, d'environ 1 000 paires de bases

Une fois la présence du transgène démontrée, nous désirions nous assurer que ces phénotypes sont reliés au phénomène d'interférence. Nous avons donc réalisé des analyses de taux d'expression d'ARNm d'ovaires non pollinisés de ces plantes (Figure 17). Nous espérons un taux d'expression d'ARNm plus faible chez les plantes transformées par interférence d'ARNm qui présentent le phénotype de petits fruits et de graines brunes. Par contre, lorsque nous observons le patrons d'expression d'ARN, nous ne pouvons pas conclure à un tel résultat. Le taux d'expression est sensiblement le même que celui des témoins, voire même plus fort

dans le cas de la plante 50, alors que c'est cette dernière qui présente le plus fort phénotype de petits fruits. Par contre nous observons des bandes de taille inférieure chez les plantes 26, 30, 40 et 50. De telles bandes ne sont pas observées chez les ARN de la plante contrôle G4 ou de la plante 6 qui ne présente pas le phénotype du nombre de graines réduit.

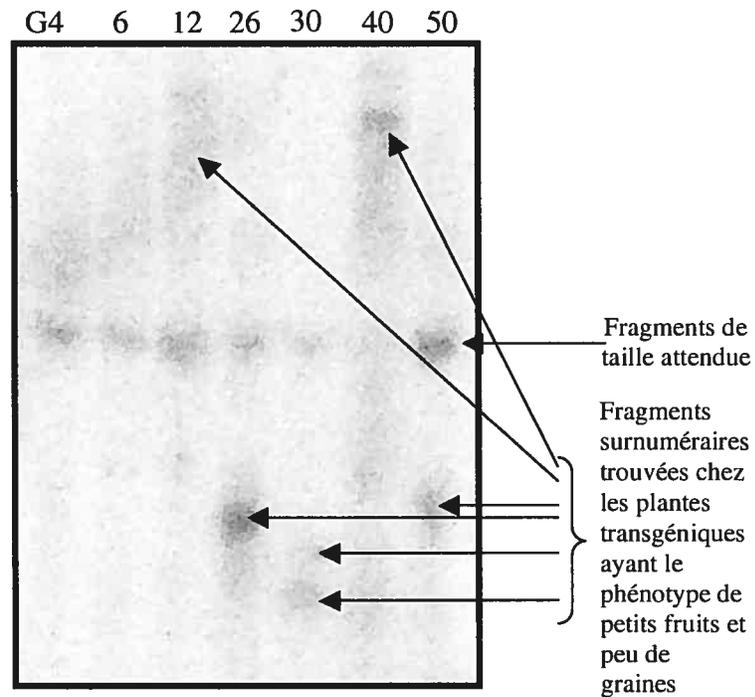


Figure 17 : Test du taux d'expression d'ARNm de ScFRK3 réalisé avec 10 μg d'ARN d'ovaires et de styles de plantes G4 contrôles et des plantes transformées par interférence qui présentent le phénotype de petits fruits (plantes 6, 12, 26, 30, 40 et 50). Les ARN ont été hybridés avec une sonde marquée au $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dATP correspondant au domaine N-terminal de la protéine ScFRK3, d'environ 1 000 paires de bases.

avons utilisé le système de double-hybride Hybri-Zap. Le Tableau 4 présente les constructions utilisées, les banques criblées, le nombre de clones testés, les interactants obtenus ainsi que leurs fonctions respectives. Le domaine N-terminal de la protéine ScFRK3 semble interagir avec plusieurs protéines reliées à la fructification, dont l'ACC oxidase, la sous-unité β de la polygalacturonase isoenzyme 1 et la « tomato ripening associated membrane protein ». L'actine, qui sert de matériel de charpente aux structures cellulaires, a également été identifiée lors d'un des trois criblages. De plus, les MAP4K sont impliquées dans l'arrangement du cytosquelette, dont l'actine —protéine phosphorylée— est un élément important. Nous avons également obtenu une histone comme interactant, l'histone H2A. Toutes ces protéines proviennent de la banque d'ADNc d'ovaires non pollinisés. Le seul interactant connu trouvé avec cette construction provenant de la banque d'ovaires récoltés deux à six jours après pollinisation est une ascorbate peroxidase cytosolique, les autres étant ou bien des protéines non caractérisées, ou bien une protéine ribosomale 60S qui est un faux positif trouvé dans de nombreux criblages. La protéine transmembranaire qui interagit avec ScFRK3 n'a pas de fonction connue, mais sa nature transmembranaire pourrait s'avérer une donnée importante. En effet, l'identification de plusieurs sites de myristoylation nous laisse croire que ScFRK3 pourrait être associée à la membrane, d'où elle se lierait à cette protéine, ou bien que son ancrage dépend de son interaction avec cette protéine. Le domaine C-terminal n'a pas interagi avec des protéines pertinentes, aussi nous considérons ces protéines comme des faux positifs pour la raison mentionnée plus haut. D'autres protéines ont également été identifiées comme pouvant interagir avec ScFRK3 (Tableau 6), mais leur cadre de lecture comporte un codon stop en aval de la région codante pour la protéine. Nous ne nous sommes donc pas penchés davantage sur ces protéines, bien que certaines d'entre elles soient reliées à la transduction de signaux, comme la protéine 14-3-3 qui sert parfois de protéine d'échafaudage. L'histone H2B a également attiré notre attention puisqu'il semble que certaines protéines de type MAP4K de la sous-famille des Ste 20-like puissent phosphoryler l'histone H2B (Ahn *et al.*, 2005). Par contre, il est prouvé que dans certains cas, lorsque l'on clone des protéines identifiées par double-hybride dont la séquence étaient précédées d'un

codon stop dans un autre cadre de lecture sans codon stop et que l'on teste l'interaction entre la protéine appât et la protéine interactante en phase cette fois, on observe toujours une interaction entre les protéines. Il serait donc intéressant de cloner ces protéines en phase et de tester à nouveau leur interaction avec le domaine N-terminal de ScFRK3.

3.5.1. Protéine hybride riche en proline

Les protéines riches en proline se trouvent en grande quantité dans la paroi cellulaire; elles seraient liées aux propriétés changeantes de la paroi lors du développement ou de la réponse aux stress. En 2003, Akiyama et Pillai ont identifié une protéine du riz riche en proline ayant quatre sites possibles de phosphorylation, et dont l'expression est inhibée par un traitement à l'acide abscissique. En 1992 Josè-Estanyol *et al.* ont également isolé une protéine hybride riche en proline, chez le maïs cette fois-ci. Cette dernière est formée de deux sections distinctes, l'une riche en proline et l'autre hydrophobe. Ils ont aussi découvert que cette protéine est exprimée dans les ovaires et les embryons immatures. L'expression n'est plus détectable au moment correspondant à l'augmentation du taux d'acide abscissique. Cette protéine de la paroi cellulaire serait donc importante pour la protection de la cellule lors du développement de l'embryon. Bref, il semble que ce type de protéine soit négativement relié à la voie de l'acide abscissique, qu'il soit possiblement phosphorylé et qu'il joue un rôle important lors du développement de l'embryon.

3.5.2. Sous-unité β de la protéine polygalacturonase isoenzyme 1

La sous-unité β de la protéine polygalacturonase isoenzyme 1 est aussi une protéine de la paroi cellulaire qui catalyse la dégradation et la solubilisation de la pectine lors de la maturation et de l'abscission des fruits. Cette sous-unité de la polygalacturonase n'est pas catalytique et s'associe à la protéine catalytique polygalacturonase isoenzyme 2 (PG2). La sous-unité β aurait un rôle de protéine d'ancrage pour lier PG2 à la paroi cellulaire et contrôler son activité, mais ces hypothèses restent à être prouvées. La sous-unité β s'accumule dans les fruits en

développement avant l'apparition de la protéine catalytique PG2 et disparaît au moment de l'abscission (Zheng *et al.*, 1992).

3.5.3. « Tomato ripening associated membrane protein »

Un autre interactant découvert par double-hybride, la « tomato ripening associated membrane protein » est située dans la paroi cellulaire et a été caractérisé comme étant plus fortement exprimée lors de la maturation des fruits, mais aucune autre information n'est disponible. Elle semble par contre être reliée aux deux autres protéines dans la formation des fruits et de leur l'abscission (Fray *et al.*, 1994).

3.5.4. Ascorbate peroxidase

L'ascorbate peroxidase est une protéine impliquée dans la détoxification des cellules en agissant sur les molécules de peroxyde d'oxygène (H_2O_2). Les molécules de H_2O_2 sont fortement toxiques pour les cellules, mais elles sont utilisées lors des réactions de défense et spécifiquement lors des réponses d'hypersensibilité entraînant la mort cellulaire (Smirnoff, 2000). L'ascorbate peroxidase protège les cellules lorsque les réactions de défense ne sont pas induites (Gadea *et al.*, 1999). En 1995, Schantz *et al.* ont découvert que l'activité de l'ascorbate peroxidase est modifiée lors de l'abscission des fruits. En effet, il semble que l'activité d'un isoforme de cette protéine augmente de trois à quatre fois au moment de l'abscission

3.5.5. 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase

La protéine 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase est importante lors de la biosynthèse de plusieurs composants de signalisation comme les gibbérellines, l'acide abscissique, l'éthylène ainsi que d'autres composés secondaires, principalement des alcaloïdes et des flavonoïdes. En 1999, Lantin *et al.* ont émis l'hypothèse selon laquelle la présence de la protéine 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase dans les ovaires de *S. chacoense* pourrait jouer plusieurs rôles puisqu'elle forme plusieurs composés différents. En effet, les alcaloïdes possèdent

des propriétés anti-microbiennes, alors que les flavonoïdes sont impliqués dans les réactions de défense des plantes, comme phytoalexines et protecteurs contre les rayons ultra violets. Ces derniers sont aussi impliqués dans la reproduction. Leur présence dans les ovaires protégerait les organes reproducteurs femelles. Les métabolites secondaires pourraient aussi être utilisés comme molécules de signalisation lors de la fécondation. De plus, ce groupe de chercheurs ont mis en évidence la forte localisation de cette protéine dans la région du micropyle. Il se peut donc que la production de métabolites secondaires à cet endroit serve de guide ou d'attractif de tube pollinique. Cette protéine pourrait donc jouer un rôle, ou même plusieurs, lors de la fécondation ou de la préparation à celle-ci.

Il se pourrait alors que le nombre réduit de graines dans les fruits des plantes transgéniques soit dû à l'incapacité des tubes polliniques à trouver le micropyle pour percer le tube pollinique. La protéine ScFRK3 jouerait ici davantage un rôle de protéine d'ancrage ou d'échafaudage dans la cellule que de protéine kinase. Elle pourrait également réguler la désoxygénase par phosphorylation.

3.5.6. Signal Sequence Receptor α

L'interactant Signal Sequence Receptor α (SSR- α) trouvé deux fois lors des criblages par double-hybride est une protéine membranaire phosphorylée du réticulum endoplasmique (RE). Sa phosphorylation se fait grâce à une protéine kinase de type Caseine, mais le rôle de l'ajout de phosphate n'est pas encore connu (Wada et *al.*, 1991 et Ou et *al.*, 1992).

3.5.7. ACC oxidase

L'ACC oxidase est la dernière enzyme dans la voie de biosynthèse de l'éthylène. Il est connu que cette hormone végétale est reliée à l'abscission des fruits et des feuilles, à la sénescence de la plante et à la réponse aux blessures mécaniques. En 1999, De Martinis et Mariani ont prouvé l'implication de l'éthylène dans la

reproduction sexuelle. Ils ont créé des mutants ayant une co-suppression de l'ACC oxidase chez le tabac. Les fleurs de ces mutants sont plus petites que les fleurs des plantes sauvages. De plus, les fruits des plantes transformées n'ont pas de graines. L'ACC oxidase serait alors importante dans le développement des ovules. En effet, les ovules des plantes transgéniques ne complètent pas la mégasporogénèse et ne forment pas de sac embryonnaire, mais l'ajout d'éthylène permet de rétablir le phénotype sauvage. Ils terminent leur article en soumettant l'hypothèse que l'éthylène joue un rôle majeur dans le développement floral probablement par des cascades de phosphorylation et de déphosphorylation menant à la régulation de l'expression des gènes de développement. Aussi, Xiong *et al* (2005) ont transformé des plants de tomate en utilisant deux constructions devant causer un phénomène d'interférence d'ARN contre l'ACC oxidase. Ils ont ainsi obtenu des plants de tomate formant des fruits ayant une durée de vie supérieure de 120 jours dans les cas les plus dramatiques. La diminution de la présence de l'ACC oxidase causerait une diminution de la formation de l'éthylène et donc une maturation tardive. La protéine ScFRK3 pourrait jouer alors un rôle dans l'activation des protéines impliquées dans la formation de l'éthylène. Le phénotype de petits fruits observé chez les plantes transgéniques résulterait alors être causé par un problème lors de la formation de l'éthylène.

3.5.8. Histone H2A

Selon Koning *et al.*, (1991), l'ARNm codant pour l'histone H2A végétale est principalement dans les apex et les jeunes fruits en développement. ScFRK3 pourrait phosphoryler les histones H2A lors du développement des fruits et lors de la formation des jeunes organes végétatifs ou reproductifs. Devitt et Stafstrom (1995) ont observé que l'accumulation d'ARNm codant pour certaines MAPK et pour l'histone H2A coïncidait lorsque les cellules étaient en division. D'ailleurs, il a été démontré récemment qu'une histone H2B impliquée dans l'apoptose est phosphorylée par la protéine Mst1 faisant partie de la sous-famille des Ste20-like

MAP4K (Ahn *et al.*, 2005). La protéine ScFRK3 pourrait donc phosphoryler certaines histones. Comme mentionné plus tôt, nous avons également identifié les histones I et H2B comme étant des protéines qui interagissent avec ScFRK3. Par contre les séquences de ces deux protéines présentaient un codon stop en aval de la séquence codante. Nous avons d'abord considéré ces interactants comme de faux positifs, mais il est démontré que parfois clonant des interactants hors phase en phase, on peut prouver à nouveau l'interaction avec la protéine appât. Cette expérience serait donc à tenter dans l'avenir.

Tous les interactants ont été testés une deuxième fois par système de double-hybride selon le protocole « Quick yeast transformation » de Trafo qui permet de tester directement la construction de ScFRK3 dans pBD avec la construction de la protéine interagant dans pAD. Les tests réalisés dans ce système d'interaction protéine contre protéine se sont tous montrés positifs. Les levures transformées avec les deux constructions contenant les protéines peuvent croître sur un milieu de sélection ne contenant pas de leucine, de tryptophane, ni d'histidine, alors que les levures ne contenant qu'une des deux constructions en sont incapables (Figure 19). Les résultats ont été les mêmes lorsque nous avons utilisé un autre milieu de sélection sans leucine, tryptophane et adénine (résultat non présenté).

Tableau 4 : Fiche technique des interactants de double-hybride. Tableau des constructions de ScFRK3 utilisées, des banques criblées, du nombre de clones testés, des interactants trouvés ainsi que de leurs fonctions respectives.

Construction utilisée	Banque d'ADNc criblée	Nombre de clones criblés	Interactants	Fonctions
Domaine N-terminal de ScFRK3 cloné dans le vecteur pBD	Banque d'ADNc d'ovaires contrôles clonée dans le vecteur pAD	1 454 000	hybrid proline-rich protein/Aquaporine	Protéine de la paroi cellulaire
			ACC oxidase	Formation de l'éthylène
			Actine	Cytosquelette
			2-oxoglutarate-dependent dioxygenase	Production de métabolites secondaires
			60S ribosomal protein	Protéine ribosomale
			Tomato ripening associated membrane protein	Abscission des fruits
			Polygalacturonase isoenzyme 1 bêta subunit	Maturation des fruits
Domaine N-terminal de ScFRK3 cloné dans le vecteur pBD	Banque d'ADNc d'ovaires 2 à 6 jours post-pollinisation clonée dans le vecteur pAD	1 820 000	Putative signal sequence receptor alpha subunit (2 fois)	Inconnue
			Cytosolic ascorbate peroxidase	Détoxifie le H ₂ O ₂
			Putative transmembrane protein	Inconnue
			Putative protein	Inconnue
			Histone H2A	Réplication
Domaine C-terminal de ScFRK3 cloné dans le vecteur pBD	Banque d'ADNc d'ovaires 2 à 6 jours post-pollinisation clonée dans le vecteur pAD	1 512 000	40S ribosomal protein S5	Protéine ribosomale
Demi du domaine C-terminal de ScFRK3 cloné dans le vecteur pBD	Banque d'ADNc d'ovaires 2 à 6 jours post-pollinisation clonée dans le vecteur pAD	1 312 500	Peroxisomal targueting signal receptor (trois fois)	Protéine du peroxisome

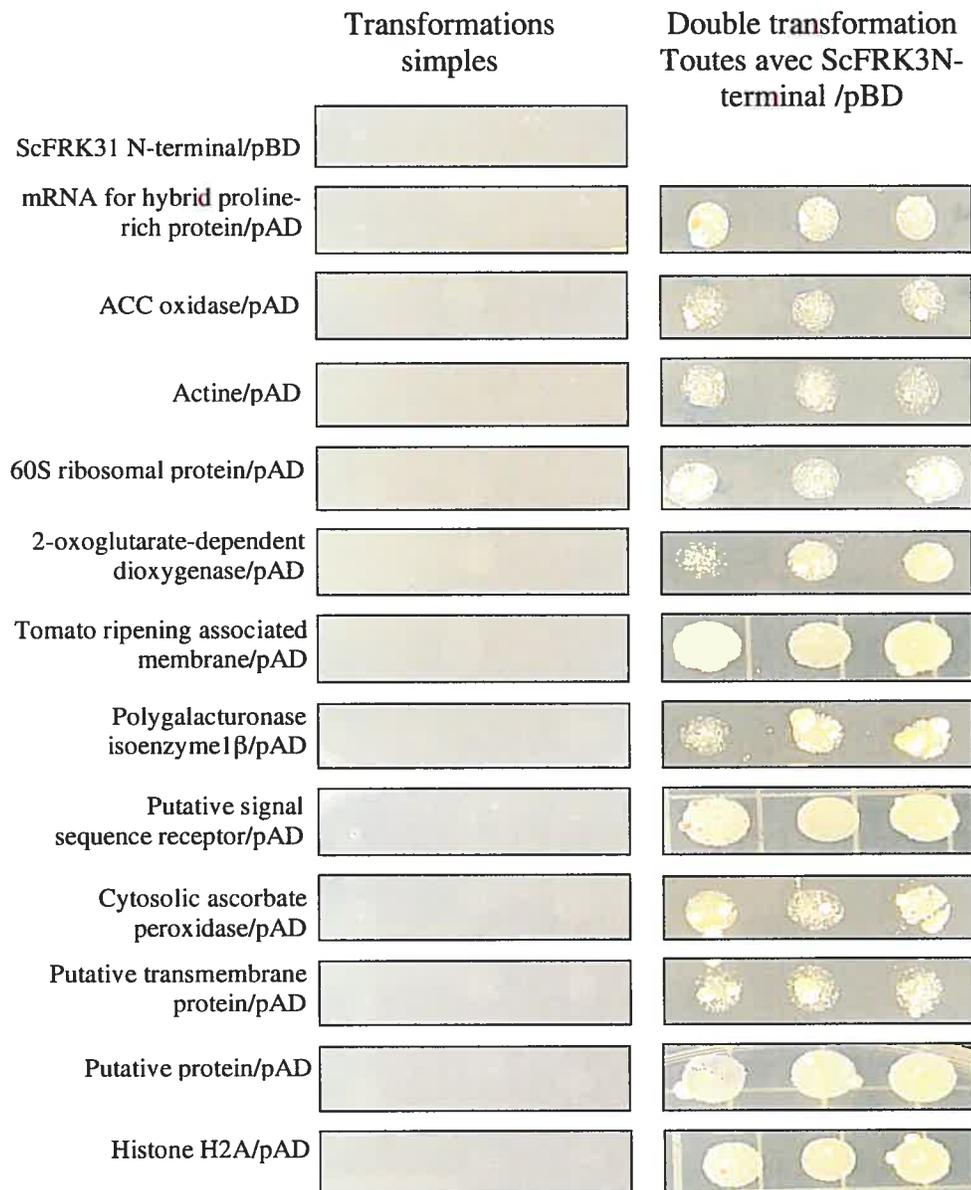


Figure 19 : Tests de vérification des interactants de double-hybride inclus dans le vecteur pAD interagissant avec le domaine C-terminal de ScFRK3 inséré dans le vecteur pBD. La première colonne correspond à la transformation des levures avec une seule construction, soit avec ScFRK3 C-terminal/pBD à la première ligne, soit avec les différents candidats dans pAD aux lignes suivantes, démontrant qu'aucune par elle-même n'auto-active la croissance sur le milieu sélectif. Trois répliquats de chaque transformation sont posés sur le milieu de sélection -Tryp-Leu-His : on remarque qu'il n'y a aucune croissance. La deuxième colonne correspond aux trois répliquats de chaque double transformation des levures. Chaque transformation comprend la construction de ScFRK3 C-terminal dans pBD ainsi qu'un des interactants dans pAD. Dans chaque cas, il y a croissance des levures sur milieu de sélection -Tryp-Leu-His.

Tableau 5 : Fiche technique des interactants de double-hybride hors phase. Tableau des constructions de ScFRK3 utilisées, des banques criblées, du nombre de clones testés, ainsi que des interactants trouvés

Construction utilisée	Banque d'ADNc criblée	Nombre de clones criblé	Interactants
Domaine N-terminal de ScFRK3 dans le vecteur pBD	Banque d'ADNc d'ovaires témoins clonée dans le vecteur pAD	1 454 000	Sous-unité du protéasome
			Protéine 14-3-3
			Alcool déshydrogénase
			Protéine DnaJ
			Protéine TSI-1
	Banque d'ADNc d'ovaires 2 à 6 jours post-pollinisation clonée dans le vecteur pAD	1 820 000	Calmoduline
			Histone H2B
			Histone H1
			Histidine-containing phosphotransfer protein
			Protéine ribosomal L32
			Protéine ribosomale L19
			Cofacteur de chaperonine
			Protéine avec un motif F-box
			Sous-unité bêta de la protéine pyruvate déshydrogénase
Protéine 14-3-3			

4. Discussion

4.1. ScFRK3, une MAP4K inhabituelle

4.1.1. Séquence

Bien que la protéine ScFRK3 possède les caractéristiques des protéines de la famille des sérine/thréonine kinases de type MAP4K, et bien que l'arbre phylogénique de la Figure 10 la positionne avec les protéines appartenant à ce groupe, la présence de deux domaines régulateurs encadrant le domaine catalytique kinase la distingue des deux sous-familles connues, à savoir GCK/SPS1 et Ste20/PAK (Dan *et al.*, 2001). Les protéines de type MAP4K caractérisées ne possèdent qu'un seul domaine régulateur et la position de ce domaine par rapport au domaine catalytique est une caractéristique des familles (Figure 7). Si certaines MAP4K végétales possèdent une structure typique des GCK/SPS1, comme MIK (Llompart *et al.*, 2003), BnMAP4K α 1 et BnMAP4K α 2 (Leprince *et al.*, 1999), ScFRK3 et d'autres protéines végétales possèdent en revanche deux domaines régulateurs qui enclavent le domaine catalytique (Figure 7). Une troisième sous-famille ou sous-groupe d'une de ces sous-familles de MAP4K pourrait être apparue après la séparation des règnes végétal et animal.

Certaines caractéristiques de la séquence de ScFRK3 permettent de positionner cette protéine dans la sous-famille des GCK/SPS1. En effet, la présence de deux domaines PXXP en position C-terminal de ScFRK3 ainsi que l'impossibilité de prouver l'interaction entre le domaine C-terminal et la sous-unité G β de la protéine G hétérotrimérique nous suggèrent que ScFRK3 ferait partie de la sous-famille des GCK/SPS1 (Cohen *et al.*, 1995; Kami *et al.*, 2002 et Yu *et al.*, 1994). Aussi, lorsque nous incluons la séquence du domaine catalytique de ScFRK3 et des autres protéines végétales ayant la même organisation protéique (Figure 11), ceux-ci se positionnent près des protéines de la sous-famille des GCK\SPS1, plus spécifiquement avec les protéines du sous-groupe des GCK-IV. En effet, la sous-

famille des GCK/SPS1 se divise en huit sous-groupes, pouvant être classés en deux grands groupes. Par contre, les protéines appartenant à ce groupe ont habituellement un domaine régulateur en C-terminal du domaine kinase, alors que les protéines végétales qui se classent avec ScFRK3 possèdent, en plus, un domaine régulateur en N-terminal atypique (Figure 7). Aussi, elles se positionnent dans un clade à part des autres membres de ce sous-groupe. Ceci permet d'amener l'hypothèse selon laquelle ScFRK3 et les autres protéines lui ressemblant pourraient former un autre sous-groupe des GCK/SPS1, celui-ci spécifique aux végétaux.

4.1.2. Le domaine N-terminal de ScFRK3, un domaine qui crée des liens

Une fois la nature de la protéine établie, nous désirions déterminer les fonctions possibles de cette protéine.

Premièrement, les différents domaines de N-myristoylation identifiés dans la séquence de ScFRK3 laissent supposer qu'il s'agit d'une protéine cytoplasmique liée à la membrane (Figure 6). Par contre, la protéine ScFRK3 ne possède pas la séquence-consensus $M^1G^2N^3X^4X^5X^6X^7R^8R^9$ (M^1 : méthionine, G^2 : glycine, N^3 : asparagine, glycine ou sérine, X^4 et X^5 : n'importe quel acide aminé, X^6 : sérine ou thréonine, X^7 : n'importe quel acide aminé et R^8 et R^9 : une résidu basique) en position N-terminal qui serait nécessaire à l'ancrage à la membrane (Thompson et Okuyama, 2000). Cette position est stratégique pour l'activation des voies de signalisation, puisqu'elle permet une proximité aux récepteurs kinases transmembranaires, nombreux chez les végétaux. La protéine Ste20p de la levure *S. cerevisiae* est située près de la membrane où elle peut interagir avec la protéine G hétérotrimérique. Quoique ne possédant pas une séquence consensus de myristoylation en N-terminal, une localisation membranaire de ScFRK3 reste possible par exemple par interaction avec un RLK, tel que démontré pour le couple de protéine MIK-MARK (Llompart *et al.*, 2003). Cet ancrage à la membrane situe également la protéine près de la paroi cellulaire.

Le domaine N-terminal de ScFRK3 comprend aussi une région acide qui pourrait servir de site d'ancrage à un substrat (« docking domain ») (Tanoue *et al.*, 2000) (Figure 6). Ces domaines permettent la reconnaissance spécifique des substrats, ainsi qu'un bon positionnement des protéines lorsqu'elles interagissent (Elsen et Davis, 2001; Sharrocks *et al.*, 2000). C'est d'ailleurs avec ce domaine que nous avons obtenu des interactants protéiques intéressants lors des criblages par double-hybride (Tableau 4), dont les résultats seront discutés plus loin. Cette région située à l'extérieur du site catalytique serait utile d'abord pour la spécificité de l'interaction, puis pour sa capacité à guider le substrat dans une position idéale permettant son interaction avec ScFRK3. Le substrat peut alors être phosphorylé par ScFRK3, ou simplement stabilisé grâce à cette liaison, et alors s'autophosphoryler ou être phosphorylé par une autre protéine kinase. Alors, ScFRK3 jouerait plutôt le rôle d'une protéine d'échafaudage (scaffold). Ces deux scénarios d'action ont été vérifiés chez les MAP4K (Dan *et al.*, 2001). Il est possible que le site catalytique kinase de ScFRK3 serve aussi à son autophosphorylation. Une fois phosphorylée, la configuration spatiale de cette protéine changerait et permettrait des interactions protéiques inhibées lorsque ScFRK3 est sous sa forme inactive. Certaines MAP4K s'autoinhibent, lorsque leur domaine régulateur interagit avec leur domaine catalytique (Dan *et al.*, 2001; Yuasa *et al.*, 1998). Sébastien Caron a d'ailleurs tenté, lors de sa maîtrise, de trouver des interactions possibles entre le domaine kinase de ScFRK3 et d'autres protéines, mais aucune protéine n'a été identifiée lors de ce criblage par double-hybride.

4.1.3. Un domaine C-terminal aussi attachant?

En premier lieu, nous savons que les régions riches en prolines PXXP sont utilisées pour interagir avec les protéines possédant des domaines SH3 (Bokoch, 2003; Cohen *et al.*, 1995; Yu *et al.*, 1994 et Kami *et al.*, 2002). Les domaines SH3 forment des poches hydrophobes dans lesquelles des domaines riches en proline peuvent s'ancrer.

Sur la protéine ScFRK3, deux de ces régions sont situées en position N-terminal et deux autres en position C-terminal (Figure 6). Ces domaines pourraient servir de site d'interaction entre protéines, mais aucun interactant trouvé dans les criblages de double-hybride ne possède de domaine SH3. Nous ne pouvons pas affirmer que ces sites hypothétiques sont fonctionnels. D'ailleurs, la séquence PXXP est la signature minimale des sites de liaisons aux domaines SH3, et d'autres acides aminés importants ne sont pas présents dans les séquences trouvées chez ScFRK3 (Cohen *et al.*, 1995; Kami *et al.*, 2002, Yu *et al.*, 1994 et Lewitzky *et al.*, 2004).

Ensuite, une autre séquence intéressante en C-terminal nous a permis de poser l'hypothèse selon laquelle ScFRK3 pourrait interagir avec la sous-unité G β de la protéine hétérotrimérique G $\alpha\beta\gamma$ (Figures 6 et 7). En effet, une séquence-consensus conservée chez les animaux et les levures et située dans le domaine N-terminal des protéines MAP4K de la sous-famille des Ste20/PAK permet cette liaison spécifique (Leeuw *et al.*, 1998; Leberer *et al.*, 2000). Pour sa part, ScFRK3 possède une séquence semblable à 50% dans son domaine C-terminal. Puisque ScFRK3 est une protéine végétale, nous avons supposé que la séquence-consensus pouvait avoir varié entre les trois règnes. Nous avons donc tenté une expérience d'interaction directe par double-hybride dans la levure entre le domaine C-terminal de ScFRK3 ainsi qu'une section de ce domaine comprenant la séquence hypothétique GBD et l'homologue de la protéine G β de *S. chacoense*. Aucune interaction n'a pu être démontrée (résultats non présentés). Il se peut que la protéine entière de ScFRK3, ou sa phosphorylation, soient nécessaires à son interaction avec G β . Un test de complémentarité de levures de *S. cerevisiae* mutante pour la protéine MAP4K Ste20p pourrait aussi nous indiquer de manière indirecte si ScFRK3 peut interagir avec G β . Des résultats positifs aux tests de réponse aux phéromones ou de croissance intrusive sur milieu à forte osmolarité permettraient d'affirmer que ScFRK3 est une protéine homologue à Ste20p, qu'elle interagit avec G β et qu'elle fait partie de la sous-famille des Ste20/PAK. Toutefois, nous devons d'abord obtenir le clone complet de ScFRK3, la séquence complète étant une juxtaposition de la séquence du clone isolé par soustraction virtuelle avec la séquence obtenue en effectuant un 5' RACE. En fait, ce

résultat couplé au positionnement de ScFRK3 dans la sous-famille des GCK/SPS1 dans l'arbre phylogénique de la Figure 11 ainsi qu'à la présence de séquence PXXP en C-terminal appuie notre hypothèse selon laquelle ScFRK3 serait une protéine de type MAP4K de la sous-famille des GCK/SDPS1.

4.2. Déduction des rôles et fonctions de ScFRK3

4.2.1. Selon le patron d'expression d'ARNm

Aucune fonction n'a encore été attribuée aux protéines MAP4K végétales. Seuls quelques indices, comme le taux d'ARNm et ses sites d'expression permettent de poser des hypothèses quant à leurs fonctions cellulaires. De plus, peu de protéines interagissant avec les MAP4K végétales sont connues jusqu'à présent. Actuellement, la seule interaction prouvée, tant par double-hybride que par immunoprécipitation, s'exerce entre la protéine MIK du maïs et un récepteur kinase non fonctionnel (Llompart *et al.*, 2003).

Selon le patron d'expression, l'ARNm de ScFRK3 est partout, à l'exception du tube pollinique, et il est faiblement exprimé dans les racines et les tiges (Figure 13). Son expression est à son plus haut niveau dans les organes reproducteurs femelles, soit dans les styles et les ovaires. Les ovules et les styles des fleurs non pollinisées ont un taux d'expression supérieur. Par contre, bien que le niveau d'expression diminue après pollinisation, ce dernier reste très élevé même après 96 heures. Ceci laisse penser que ScFRK3 joue un rôle important lors de la formation du gynécée et lors du développement de l'embryon, de la graine ou du fruit. La protéine ScFRK3 est donc présente avant, pendant et après fécondation, puisque chez *S. chacoense* la fécondation a lieu environ 36 heures après pollinisation (Lantin *et al.*, 1999). L'expression de l'ARNm de ScFRK3 est forte dans les ovaires des fleurs tout au long de leur floraison. Une expérience d'hybridation *in situ* donnerait plus d'indices sur les tissus spécifiques dans lesquels s'exprime l'ARN messager de la protéine ScFRK3.

4.2.2. Selon les phénotypes des transgéniques

Nous avons vu que le patron d'expression de l'ARNm de ScFRK3 semble indiquer que ScFRK3 joue un rôle dans la reproduction et la fructification, ce qui s'avère fondé lorsqu'on fait l'analyse des organes reproducteurs femelles et celle du développement des fruits et des graines de plantes modifiées génétiquement afin d'éliminer ou de réduire la présence de la protéine ScFRK3. Plusieurs plantes transgéniques ont été produites de façon à pouvoir observer des événements d'intégration indépendants du transgène. En effet, l'expression du transgène dépend de son contexte d'insertion et des réarrangements possibles d'ADN. Ces derniers peuvent être des délétions et des duplications de segments d'ADN. L'analyse phénotypique nous indique que quatre plantes présentent un phénotype similaire de petits fruits avec peu de graines, suggérant fortement que le phénotype observé soit causé par la présence du transgène. Certaines plantes ne présentant pas de phénotype, alors que d'autres en présentent, nous pouvons affirmer que les phénotypes observés sont causés par une diminution de la protéine ScFRK3 et non par un effet non spécifique résultant des manipulations lors des étapes de transformation. Pour vérifier la présence du transgène dans les plantes transformées, nous avons effectué une amplification de la portion du transgène inséré codant pour le gène de résistance à la kanamycine, en utilisant de l'ADN génomique des plantes transgéniques présentant les phénotypes de petits fruits ayant peu de graines et de certaines sans phénotypes. La plante contrôle G4 ne présente aucune amplification alors que les plantes transformées à l'exception de la plante 50 présentent une amplification (Tableau 3). L'absence d'amplification chez la plante 50 peut s'expliquer par un remaniement du génome lors de l'insertion du transgène. Puisque cette plante possède des bandes surnuméraires sur le Northern (Figure 17), une diminution du taux d'expression protéique (Figure 16) et un phénotype assez fort (Figure 14 et Graphiques 1-4), nous considérons tout de même cette plante comme un mutant sous-exprimant la protéine ScFRK3 par interférence d'ARN. Nous avons ensuite analysé le patron d'ADN génomique des plantes transformées digéré avec l'enzyme de restriction EcoRI (Figure 16). Une fois hybridé avec une séquence correspondant au domaine N-terminal de ScFRK3, nous observons plusieurs fragments chez les

plantes transformées et un seul chez la plante contrôle. Ce patron nous permet d'affirmer que les lignées étudiées sont bien indépendantes ainsi que la présence du transgène dans toutes les plantes étudiées, dont la plante 50.

La présence du transgène étant prouvée, nous pouvons nous attarder aux phénotypes. En effet, quatre des 45 plantes transgéniques créées montrent des anomalies lors de la croissance des fruits et du développement des ovules et des graines (Figures 14 et 15). Les plantes 26, 30, 40 et 50 forment de petits fruits avec un nombre de graines viables plus faible que celui des fruits de plantes contrôles. Le diamètre des fruits de ces plantes est réduit par rapport aux fruits des plantes témoins (Graphique 1 et Graphique 2, Figure 14). Le diamètre réduit de ces fruits est probablement causé par le plus petit nombre de graines qu'ils contiennent, en plus de la grande quantité de graines avortées ou qui ne se sont pas développées.

Le fait d'avoir quatre plantes présentant un phénotype semblable combiné au fait qu'aucune autre expérience de transformation réalisée dans notre laboratoire ne montre ce phénotype, nous conduisent à conclure que les petits fruits avec peu de graines, dont plusieurs avortées, sont des phénotypes causés par la diminution de la quantité de la protéine ScFRK3. Le fait qu'aucune plante ne présente une absence totale de la protéine pourrait suggérer que cette absence soit létale. Les plantes n'exprimant pas la protéine ScFRK3 serait donc possiblement non-viables.

La protéine ScFRK3 semble donc impliquée dans le développement des ovules ou des graines, puisqu'on remarque un problème lors de la fécondation. Par contre, le problème peut aussi se produire à plusieurs étapes du développement. En effet, il peut d'abord y avoir une anomalie lors de la formation du sac embryonnaire, lors du guidage du tube pollinique jusqu'au micropyle, ou lors du développement des embryons et de l'albumen.

Premièrement, une dysfonction pourrait survenir lors de la formation des ovules : si peu d'ovules fonctionnels sont formés, peu de graines résultent de la fécondation. Un autre événement à vérifier : la guidance du tube pollinique jusqu'aux

ovules, ainsi que sa capacité à percer le sac embryonnaire pour qu'il y ait fécondation. Un tel problème pourrait former des fruits ayant peu de graines matures et de nombreux ovules non fécondés qui restent très petits puisqu'ils ne forment pas d'embryon. Une expérience de coloration des tubes polliniques et l'observation au microscope pourrait régler cette question. Enfin, le problème peut se situer lors du développement de l'embryon et de la formation de la graine. Des coupes de tissus d'ovaires en formation et des observations au microscope nous permettraient de vérifier si le peu de graines matures trouvées dans les fruits des plantes ayant un phénotype résulte plutôt d'un problème lors de la formation des ovules que d'une défaillance lors du développement des embryons. Le pourcentage d'environ 58% de graines matures est pourtant conservé entre les fruits des plantes transgéniques avec phénotype, sans phénotype et chez la plante contrôle. Il se peut alors que le problème ne survienne pas lors du développement des embryons, mais lors de la formation des ovules, puisqu'un certain ratio entre le nombre de graines viables et celui de graines avortées est conservé. La protéine ScFRK3 serait alors probablement impliquée dans la formation des ovules. De plus, le patron d'expression d'ARN de ScFRK3 laisse supposer que cette protéine est également présente après fécondation et qu'elle pourrait aussi être impliquée dans les premières étapes du développement de l'embryon ou de la graine. Il reste à vérifier si le tube pollinique pénètre bien le sac embryonnaire, car les ovules non fécondés ne se développent pas et restent très petits. Il se peut donc que nous n'ayons pas comptabilisé ce type de d'ovule lors de l'analyse des fruits.

La présence de graines brunes chez trois des plantes transgéniques au phénotype de petits fruits est un fait assez intéressant (Figure 15). Certains mutants caractérisés dans la littérature montrent un phénotype semblable. Déjà en 1998, Kuvtun *et al.* ont créé des plantes mutantes pour une MAP3K impliquée dans la transduction du signal de l'auxine. Il en résulta des plantes sans problème de développement végétatif, mais aux fruits portant des graines avec peu d'albumen et pas d'embryon. Un autre mutant, *medea*, porte des graines brunes sans embryon

développement végétatif, mais aux fruits portant des graines avec peu d'albumen et pas d'embryon. Un autre mutant, *medea*, porte des graines brunes sans embryon (Collinge *et al.*, 2004). La protéine ScFRK3 pourrait donc agir dans les mêmes voies que ces deux protéines, en particulier en amont de la protéine MAP3K.

Nous espérons prouver, par analyse du taux d'expression d'ARNm des ovaires des plantes transformées présentant des aberrations lors de la fructification, que ces anomalies sont le résultat de l'absence de la protéine ScFRK3. Par contre, le northern présenté à la Figure 17 ne montre pas de différence notable des taux d'expression d'ARNm entre les plantes transformées et la plante contrôle G4, à l'exception de la plante 40 qui a un fort phénotype et un faible taux d'ARNm. Toutefois, nous observons des bandes surnuméraires chez quatre des plantes, qui sont d'ailleurs celles ayant les phénotypes les plus marqués. Même si l'ARNm endogène semble correcte, al présence d'ARNm de taille plus petites pourraient contribuer au silencing par la production de SiRNA ou interférer avec la traduction. L'insertion du transgène serait à l'origine d'un « silencing » de la protéine par la production d'ARNm aberrant. Alternativement, elle pourrait donner naissance à des protéines tronquées qui, par interaction avec les protéines indigènes, empoisonneraient le complexe. Ces protéines tronquées pourraient être non fonctionnelles, et bousilleraient les voies nécessitant la protéine ScFRK3 complète. Par contre, cette seconde hypothèse n'est pas appuyée, puisque l'image obtenue par immunodétection effectuée sur les protéines de feuilles des plantes transgéniques ne présente pas de bandes surnuméraires de tailles inférieures à celle attendue (Figure 18).

Puisque nous n'avons pas pu prouver la relation entre les phénotypes des plantes transgéniques et le taux d'ARN correspondant à ScFRK3 dans les ovaires, nous avons réalisé une analyse d'immunodétection effectuée sur les protéines d'ovaires de ces plantes transgéniques. En utilisant un anticorps généré à partir d'un peptide de synthèse correspondant à une région spécifique de ScFRK3 hydrophile et exposée (correspondant à cette séquence : ARYMSYWDRDEKSPVR) nous avons démontré une plus faible expression de cette protéine chez les plantes transformées

présentant des phénotypes, alors que les plantes n'ayant pas de phénotypes présentent un taux d'expression de la protéine égale ou supérieure à celui de la plante témoin G4 (Figure 18). Ceci pourrait expliquer le niveau d'expression d'ARN qui n'est pas réduit chez les plantes transgéniques. En effet, parfois les lignées de transgéniques qui devraient présenter le phénomène d'interférence ne possèdent pas un taux d'ARN réduit. L'ARNi interagit sur la dégradation du messenger, ainsi que sur la traduction de ce dernier. Il se peut que ce ne soit pas au niveau de l'expression de l'ARN que la protéine ScFRK3 soit contrôlée, mais plutôt sous sa forme protéique.

4.2.3. Selon ScFRK3 et ses partenaires de double-hybride

Enfin, l'analyse des rôles des interactants protéiques trouvés par double-hybride permet de rapprocher leurs fonctions à celles de la protéine ScFRK3. Il semble que la protéine ScFRK3 interagisse chez la levure avec des protéines de la paroi cellulaire (la protéine hybride riche en proline, la sous-unité β de la protéine polygalacturonase isoenzyme 1 et la « tomato ripening associated membrane protein ») qui sont reliées respectivement à la réponse aux stress et au développement de l'embryon (Josè-Estanyol *et al.*, 1992) à la maturation des fruits et à leur abscission (Zheng *et al.*, 1994). Elle interagit également chez la levure avec d'autres protéines impliquées dans la réponse aux stress et à la maturation des fruits, comme l'ascorbate peroxidase (Smirnoff, 2000, Gadea *et al.*, 1999, Schantz *et al.* 1995), la protéine 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase (Lantin *et al.*, 1999) et l'ACC oxidase (Martinis et Mariani, 1999 ; Xiong *et al.*, 2005). Si nous relions les diverses fonctions de ces protéines, il en ressort deux principales. Premièrement, ScFRK3 pourrait être importante lors de plusieurs étapes de la reproduction, puisqu'elle interagit chez la levure avec des protéines agissant sur la protection des organes reproducteurs femelles et lors de la croissance du tube pollinique (protéine 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase), mais aussi avec des protéines impliquées dans la formation des fruits (ACC oxidase) ainsi que lors de leur abscission (« tomato ripening associated membrane protein » et la sous-unité β de la protéine

phénotypes des plantes transgéniques. La protéine ScFRK3 pourrait également avoir un rôle dans la réponse aux stress, puisqu'elle interagit avec les protéines 2-oxoglutarate-dépendant dioxygénase, ascorbate peroxydase et avec une protéine hybride riche en proline. Toutes ces protéines sont impliquées dans les réponses aux stress. Ceci explique la présence de ScFRK3 dans tous les tissus de la plante et non seulement dans les ovaires. Aussi, il semble que la protéine homologue à ScFRK3 chez *A. thaliana*, SIK, soit induite par les stress (communication personnelle de Per Winge). Il est donc fort probable que ScFRK3 réponde aussi à ces stimuli. Des expériences de réponses aux stress seraient souhaitables pour vérifier cette hypothèse.

Bref, ce mémoire présente la caractérisation d'une protéine de type MAP4K, alors que ces protéines sont encore très peu connues chez les plantes. Les expériences de double-hybrides ainsi que la caractérisation de mutant de *S. chacoense* nous indique que ScFRK3 a probablement un rôle lors de la reproduction et de la fructification. D'autres expériences complémentaires telles que la vérification de la guidance du tube pollinique jusqu'aux ovules, la vérification des interactions entre protéines par co-immunoprécipitation ainsi que l'observation de coupes fines au microscope du sac embryonnaire permettraient d'ajouter des indices quant aux fonctions de la protéines ScFRk3.

5. Bibliographie

Ahn S.-H., W. L. Cheung, J.-Y. Hsu, R. L. Diaz, M. M. Smith et C. D. Allis (2005) Sterile 20 kinase phosphorylate Histone H2B at serine 10 during hydrogen peroxide-induced apoptosis in *S. cerevisiae*. *Cell* 120, 25-36

Akiyama T, et M. A. Pillai (2003) Isolation and characterization of a gene for a repetitive proline rich protein (OsPRP) down-regulated during submergence in rice (*Oryza sativa*). *Physiologia Plantarum* 118, 507-513

Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M.R., Chiu, W. L., Gommez-Gomez, L., Boller, T., Ausubel, F. M. et Sheen, J. (2002) MAP kinase signalling cascade in Arabidopsis innate immunity. *Nature* 415, 977-983

Bagrodia, S., et R. A. Cerione (1999) PAK to the Future. *Trends in Cell Biology* 9, 350-355

Bauman A. Let et J. D. Scott (2002) Kinase- and phosphatase-anchoring proteins: harnessing the dynamic duo. *Nature Cell Biology* 4, E203-E206

Bent AF. (2001) Plant mitogen-activated protein kinase cascades: Negative regulatory roles turn out positive. *Tutorial Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98, 784-786

Bergman D. C. W. Lukowitz et C. R. Somerville (2004) Stomatal development and pattern controlled by a MAPKK Kinase. *Science* 304, 1494-1497

Bertram J. Canagarajah, Andrei Khokhlatchev, Melanie H. Cobb, et Elizabeth J. Goldsmith (1997) Activation Mechanism of the MAP Kinase ERK2 by Dual Phosphorylation. *Cell* 90, 859-869

Bevan M. (1984) Binary Agrobacterium vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Reserch* 26, 8711-8721

Bleecker A. B. (1999) Ethylene percption and signaling: an evolutionary perspective. *Trends in Plant Science* 4, 269-274.

Bleeker, A. B. et H. Kende (2000) Ethylene : A gaseous molecule in plants. *Ann. Rev. Cell. Dev.* 16, 1-18

Bögre, L., Calderine, O., Binavora, P., Mattauch, M., Till, S., Kiegerl, S., Jonak, C., Pollaschek, C., Barker, P., Huskisson, N. S., Hirt, H. et Heberle-Bors, E. (1999) A MAP kinase is activated late in plant mitosis and becomes lacialized to the plane of cell division. *Plant Cell* 11, 101-113

Bokoch G. M. (2003) Biology of the p21-activated kinases. *Annual Revue in Biochemistry* 72, 743-781

Calderini O., N. Glab, C. Bergounioux, E. Heberle-Bors, et C. Wilson (2001) A novel tobacco mitogen-activated Protein (MAP) kinase kinase, NtMEK1, activates the cell cycle-regulates p43^{Ntf6} MAP kinase. *The Journal of Biological chemistry* 276, 18139-18145

Canagarajah B J., A Khokhlatchev , M. H. Cobb et E. J. Goldsmith (1997) Activation mechanism of the MAP kinase ERK2 by dual phosphorylation. *Cell* 90 859-869

Cardinale F., I. Meskiene, F. Ouakes et H. Hirt (2002) Convergence and divergence of stress-induced mitogen-activated protein kinas signaling pathways at the level of two distinct mitogen activated protein kinase kinase. *The Plant Cell* 14, 703-711

Caretha L. Creasy, Diane M. Ambrose, et J. Chernoff (1996) The Ste20-like protein kinase, Mst1, dimerizes and contains an inhibitory domain. *The Journal of Biological Chemistry* 271, 21049-21053

Chang C., et J. A. Shockey (1999) The ethylene-response pathway: signal perception to gene regulation. *Current Opinion in Plant Biology* 2, 352-358

Chang L, et M. Karin (2001) Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410, 37-40

Cohen G. B., R. Ren, et D. Baltimore (1995) Modular Binding Domains in Signal Transduction Proteins. *Cell* 80, 237-248

Collinge M., C., Spillane, C., Köhler, J., Gheyselinck et U., Grossniklaus (2004) Genetic interaction of an origin recognition complex subunit and the *Polycomb* group gene *MEDEA* during seed development. *The Plant Cell* 16, 1035-1046

Creasy, C. L., D. M. Ambrose, et J. Chernoff (1996) The Ste20-like protein kinase, Mst1, dimerizes and contains an inhibitory domain. *The Journal of Biological Chemistry* 271, 21049-21053

Daisuke Matsuoka, Takashi Nanmori, Ken-ichi Sato, Yasuo Fukami, Ushio Kikkawa, et Takeshi Yasuda (2002) Activation of AtMEK1, an *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase kinase, *in vitro* and *in vivo*: analysis of active mutants expressed in *E. coli* and generation of the active form in stress response in seedlings. *The Plant Journal* 29, 637-647

Dan, I., N. M. Watanabe, et A. Kusumi (2001) The Ste20 group kinases as regulators of MAP kinase cascades. *Trends in Cell Biology* 11, 220-230

Devitt M.L et Stafstrom J.P. (1995) Cell cycle regulation during growth-dormancy cycle in pea axillary buds. *Plant Molecular Biology* 2, 255-265

Drews G.N. et Yadegari R., (2002) Development and function of the angiosperm female gametophyte. *Annual Review of Genetics* 36 99–124

Drogen, F. V. et M Peter (2002) Spa2p Functions as a scaffold-like protein to recruit the Mpk1p MAP Kinase module to sites of polarized growth. *Current Biology* 12, 1698-1703

Drogen, F. van, S. M. O'Rourke, V. M. Strucke, M. Jaquenoud, A. M. Neiman, et M. Peter (2000) Phosphorylation of the MEKK Ste11p by the PAK-like kinase Ste20p is required for the MAP kinase signaling *in vitro*. *Current Biology* 10, 630-639

Enslin, H., et R. Davis (2002) Regulation of MAP kinases by docking domains. *Biology of the Cell* 93, 5-41

Evans, P. T. et R. L. Malmberg (1989) Alternative pathways of tobacco placental development: time of commitment and analysis of a mutant. *Developmental Biology* 136, 273-283

Ferrández, C., S. Pelaz, M. F. Yanofsky. (1999) Control of carpel and fruit development in *Arabidopsis*. *Annual Reviews in Biochemistry* 68, 321–35

Fray R.G., A. Wallace, D. Grierson, et G. W. Lycett (1994) Nucleotide sequence and expression of a ripening and water stress-related cDNA from tomato with homology to the MIP class of membrane channel proteins. *Journal of Plant Molecular Biology* 24, 539-543

Gadea, J., V. Conejero, P. Vera (1999) Developmental regulation of cytosolic ascorbate peroxidase gene from tomato plants. *Mol Gen Genet.* 262, 212-219

- Garrington, T.P., et Johnson, G. L. (1999) Organization and régulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Current Opinion Cell Biology* 11, 211-218
- Gartner A., K. Nasmyth, et G. Ammerer (1992) Signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae* requires tyrosine and threonine phosphorylation of FUS3 and KSS1. *Genes Development* 6, 1280-1292
- Grossniklaus U., et K. Schneitz (1998) The molecular and genetic basis of ovule and megagametophyte development. *Cell and Developmental Biology* 9, 227-238
- Hanks, S. K. (2003) Genomic analysis of eukaryotic protein kinase superfamily: a perspective. *Genome Biology* 4, 111.1-111.7
- Hanks, S. K., A. M. Quinn, et T. Hunter (1988) The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* 241, 42-52
- Harada, J. J. (1999) Signaling in plant embryogenesis. *Current Opinion in Plant Biology* 2, 23-27
- Higashiyama, T., S. Yabe, N. Sasaki, Y. Nishimura, S.-Y. Miyagishima, H. Kuroiwa, et T. Kuroiwa (2001) Pollen tube attraction by the synergid cell. *Science* 24, 1480-1483
- Hirt H. (1997) Multiple roles of MAP kinases in plant signal transduction. *Trends in Plant Science* 2, 11-15
- Hirt H., et D., Scheel (2000) Receptor-mediated activation in plant defence. Heribert Hirt Editor, *MAPK Kinases in Plant Signal Transduction*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York. Berlin, 2000. 197p.

Hirt, H. (2000) MAP kinases in plant signal transduction. *Results Probleme in Cell Differerenciatio* 27, 1-9

Huang B-Q., et S. D. Russel (1992) Female germ unit; organization isolation, and fonction. *International Revue in Cytology* 140 :233-292

Hunter, T. (1997) Oncoprotein networks. *Cell* 88:333-346

Ichimura, K., T. Mizoguchi, R. Ushida, T. Yuasa et K. Shinozaki (2000) Various abiotic stresses rapidly activate *Arabidopsis* ATMPK4 and ATMPK6. *The Plant Journal* 24, 655-665

Innes, R. W. (2001) Mapping out the roles of MAP kinases in plant defense. *Trends in Plant Science* 6, 392-394

Johnson P. R. et Lapadat (2002) Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein, *Sciences STKE* 2002. 1911

Johnson, P. R. et J. R. Ecker (1998) The ethylene gas signaling transduction pathway: a molecular perspective. *Annual Revue in Genetic* 32, 227-254

Jonak, C., L. Ökrész, L. Bögre, et H. Hirt (2002) Complexity, cross talk and integration of plant MAP kinase signalling. *Current Opinion in Plant Biology* 5, 415-424

Jonak, C., H., Nakagami, et H., Hirt (2004) Heavy metal stress. Activation of distinct mitogen-activated protein kinase pathways by copper and candium. *Plant Physiology* 136, 3276-3283

Jones, A., M. (2002) G-coupled signaling in *Arabidopsis*. *Current Opinion in Plant Biology* 5, 402-407

Josè-Estanyol, M., L. Ruiz-Avila et P. Puigdomènech (1992) A maize embryo-specific gene encodes a proline-rich and hydrophobic protein. *The Plant Cell* 4, 413-423

Jouannic, S., A. Champion, J.-M. Segui-Simarro, E. Salimova, A. Picaud, J. W. Tregear, P. Testillano, M.-C. Risueno, V. Simanis, M. Kreis, et Y. Henry (2001) The protein kinases AtMAP3Kepsilon1 and BnMAP3Kepsilon1 are functional homologues of *S. pombe* cdc7p and may be involved in cell division. *The Plant Journal* 26, 637-649

Jouannic, S., A. Hamal, A.-S. Lepronce, J. W. Tregear, M. Kreis, Y. Henry (1999) Characterization of novel plant genes encoding MEKK/STE11 and RAF-related protein kinases. *Gene* 229, 171-181

Kami K., R., Takeya , H., Sumimoto et D., Kohda D. (2002) Diverse recognition of non-PXXP peptide ligands by the SH3 domains from p67phox, Grb2 and Pex13p. *The EMBO Journal* 21 4268-4276

Keniry M.E., et G.F. Sprague Jr (2003) Identification of p21-activated kinase specificity determinants in budding yeast: a single amino acid substitution imparts Ste20 specificity to Cla4. *Molecular Cellular Biology* 23(5), 1569-80

King, A. J., H. Sunet, B. Diaz, D. Bernard, W. Miao, S. Bagrodia, et M. S. Marshall (1998) The protein kinase Pak3 positively regulates Raf-1 activity through phosphorylation of serin 338. *Nature* 396, 180-183

Koltunow, A., et Grossniklaus, U. (2003). Apomixis: A developmental perspective. *Annual Revue in Plant Biology* 54, 547–574

- Koning A.J., E. Y. Tanimoto, K. Kiehne, T. Rost et L. Comai (1991) Cell-specific expression of plant histone H2A genes. *The Plant Cell* 3, 657-665
- Kültz D. (1998) Phylogenic and fonctionnal classification of mitogen- and stress-activated protein kinases. *Journal of Molecular Evolution* 46, 571-588
- Kuvtun Y., Chiu, W. L., Zeng, W., et Sheen, J. (1998) Suppression of auxin signal transduction by MAPK cascade in higher plants. *Nature* 395, 716-720
- Kyriakis J. M. (1999) Signaling by the germinal center kinase family of protein kinases. *The Journal of Biological chemistry* 274, 5259-5262
- Kyriakis, J. M. et J. Avruch (1996) Protein kinase cascades activates by stress and inflammatory cytokines. *BioEssays* 18, 567-577
- Lagace M., et D. P. Matton (2004) Characterization of a WRKY transcription factor expressed in late torpedo-stage embryos of *Solanum chacoense*. *Planta* 219, 185-189
- Lantin S., M. O'Brien, et D. P. Matton (1999) Pollinisation, wounding and jasmonate treatments induce the expresssion of a developmentally regulated pistil dioxygenase at a distance, in the ovary, in the wild potato *Solanum chacoense* Bitt. *Plant Molecular Biology* 41, 371-386
- Leberer, E., D. Dignard, D. Y. Thomas, et T. Leeuw (2000) A conserved Gbêta binding (GBB) sequence motif in Ste20p/PAK family protein kinases. *Biological Chemistry*. 381, 427-431

Leeuw, T., C. Wu, J. D. Schrag, M. Witheway, D. Y. Thomas, et E. Leberer (1998) Interaction of a G-protein β -subunit with a conserved sequence in Ste20/PAK family protein kinases. *Nature* 391, 191-195

Leprince, A.-S., S. Jouanic, A. Hamal, M. Kreis, et Y. Henry (1999) Molecular characterization of plant cDNAs *BnMAP4Kalpha1* and *BnMAP4Kalpha2* belonging to the GCK/SPS1 subfamily of MAP kinase kinase kinase kinase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1444, 1-13

Lewitzky M, Harkiolaki M, Domart MC, Jones EY, Feller SM. (2004) Mona/Gads SH3C binding to hematopoietic progenitor kinase 1 (HPK1) combines an atypical SH3 binding motif, R/KXXXK, with a classical PXXP motif embedded in a polyproline type II (PPII) helix. *The Journal of Biological Chemistry* 279, 28724-28732

Liu G., E. B. Holub, J. M. Alonso, J. R. Ecker, et P. R. Fobert (2005) An *Arabidopsis* NPR1-like gene, NPR4, is required for disease resistance. *The Plant journal* 41, 304-318

Llompart, B., E. Castells, A. Rio, R. Roca, A. Ferrando, V. Stiefel, P. Puigdomènech et J. M. Casacu (2003) The direct activation of MIK, a germinal center kinase (GCK)-like kinase, by MARK, a maize atypical receptor kinase, suggests a new mechanism for signaling through kinase-dead receptors. *The Journal of Biological Chemistry* 278, 48105-48111

Luan S. (2003) Protein phosphatase in plants. *Annual Review in Plant Biology* 54, 63-92

Lukowitz W., A. Roeder, D., Parmenter et C., Somerville (2004) A MAPKK Kinase gene regulates extra-embryonic cell fate in *Arabidopsis*. *Cell* 116, 109-119

Manser, E., H.-Y. Huang, T.-H. Loo, X.-Q. Chen, J.-M. Dong, T. Leung, et L. Lim (1997) Expression of constitutively active alpha-PAK reveals effects of the kinase on actin and focal complexes. *Molecular and Cellular Biology* 17, 1129-1143

Manser, E., T.H. Loo, C.G. Koh, Z.S. Zhao, X.Q. Chen, L. Tan, I. Tan, T. Leung, et L. Lim (1998) PAK kinases are directly coupled to the PIX family of nucleotide exchange factors. *Molecular Cell*,1, 183-192

Martinis, D. et C. Mariani (1999) Silencing gene expression of the ethylene-forming enzyme results in a reversible inhibition of ovule development in transgenic tobacco plants. *The Plant Cell* 11, 1061-1071

Mazzucato, A., Taddei, A.R., et Soressi, G.P. (1998). The *parthenocarpic fruit (pat)* mutant of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) sets seedless fruits and has aberrant anther and ovule development. *Development* 125, 107–114

Meyerowitz, E.M. (2002) Plants compared to animals: the broadest comparative study of development. *Science* 295, 1482-1485

Millward T. A., S. Zolnierowicz, et B. A. Hemmings (1999) Regulation of protein kinase cascades by protein phosphatase 2A. *Trends in Biochemical Science* 24, 18691-33342

Mizoguchi, T., K. Irie, T. Hirayama, N. Hayashida, K. Yamaguchi-Shinozaki, K. Matsumoto, et K. Shinozaki (1996) A gene encoding a mitogen-activated protein kinase kinase kinase is induced simultaneously with genes for a mitogen-activated protein kinase and an S6 ribosomal protein kinase by touch, cold, and water stress in *Arabidopsis thaliana*. *PNAS* 93, 765-769

Nadeau J. A. et F. D. Sack (2003) Stomatal development: cross talk puts mouths in place. *Trends in Plant Science* 8, 294-299

Nishihama R. et Y. Machida (2001) Expansion of the phragmoplast during plant cytokinesis: a MAPK pathway may MAP it out. *Current Opinion in Plant Biology* 4, 507-512

O'Brien, M., C. Bertrand, S. Caron, et D. P. Matton, (2004) The *Solanum* ScFRK2 protein kinase defines a new MAPK family and affects ovule identity. Accepted pending revisions. *Plant Physiology*

O'Brien M., C. Kapfer, G. Major, M. Laurin, C. Bertrand, K. Kondo, Y. Kowayama, et D. M. Matton (2002) Molecular analysis of the stylar-expressed *Solanum chacoense* small asparagine-rich protein family related to the HT modifier of gametophytic self-incompatibility in *Nicotiana*.
The Plant Journal 32, 985-96

O'Neil, S. D. (1997) Pollination regulation of flower development. *Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48, 547-573

Ou W. O., D. Y., Thomas, A. W., Bell et J. J. M. Bergeron (1992) Casein kinase II phosphorylation of signal sequence receptor α and the associated membrane chaperone calnexin. *The Journal of Biological Chemistry* 267, 23789-237896

Ouaked, F., W. Rozhon, D. Lecourieux, et H. Hirt (2003) A MAPK pathway mediates ethylene signaling in plants. *EMBO Journal* 22, 1282-1288

Pandey S. et S. M. Assman (2004) The *Arabidopsis* putative G protein-coupled receptor GCR1 interacts with the G protein α subunit GPA1 and regulates abscisic acid signaling. *The Plant Cell* 16, 1616-1632

Polverino, A., J. Frost, P. Yang, M. Hutchison, A. M. Neiman, M. H. Cobb, et S. Marcus (1995) Activation of mitogen-activated protein kinase cascades by p21-activated protein kinases in cell-free extracts of *Xenopus* oocytes. *The Journal of Biological chemistry* 270, 26067-26070

Pombo, C. M. J. H. Kehrl, I. Sánchez, P. Katz, J. Avruch, L. I. Zon, J. R. Woodgett, T. Force et J. M. Kyriakis (1995) Activation of the SAPK pathway by the human STE20 homologue germinal centre kinase. *Nature* 377, 750-754

Ptashne Mark et A. Gann (2003) Imposing apecificity on kinases. *Science* 299, 1025-1027

Raman, M., et M. H. Cobb (2003) MAP Kinase modules: many roads home. *Current Biology* 13, R886-R888

Ray A., J. D. Lang, T. Golden, et S. Ray (1996) *SHORT INTEGUMENT (SINI)*, a gene required for development in *Arabidopsis*, also controls flowering time. *Development* 122 2631-2638

Robinson, M., J. et M. H. Cobb (1997) Mitogen-activated protein kinase pathways. *Current Opinion in Cell Biology* 9, 180-186

Rudel, T. et G. M. Bokoch (1997) Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2. *Science* 6, 1571-1574

Salvadi-Goldstein S. et R. Fluhr (2000) The ethylene-inducible PK12 kinase mediates SR splicing factors phosphorylation. *Plant Journal* 21, 91-96

Sambrook J., E. F. Fritsch, et T. Maniatis (1989) *Molecular cloning : a laboratory manuel*, 2nd edn. Clod Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor

Schantz M. L., H. Schreiber , P. Guillemaut, et R. Schantz R. (1995) Changes in ascorbate peroxidase activities during fruit ripening in *Capsicum annum*. *FEBS Letter* 23, 358, 149-152

Schweighofer A., H. Hirt et R. Meskiene (2004) Plant PP2C phosphatase : emerging functions in stress signaling. *Trends in Plant Science* 9, 236-334

Sharrock A. D., S. H. Yang (2000) Docking domains and substrate-specificity determination for MAP kinases. *TIBS* 25, 448-453

Smirnoff N. (2000) Ascorbic acid : matabolism and fonctions of multi-facetted molecule. *Current Opinion in Plant Biology* 3, 229-235

Tanoue, T., M. Adachi, T. Moriguchi et E. Nishida (2000) A conserved docking motif in MAP Kinases common to substrates, activators and regulators. *Nature Cell Biology* 2, 110-116

Teige, M., E. Scheikl, T. Eulgem, R. Dóczy, K. Ichimura, K. Shinozaki, J. L. Dangl, et H. Hirt (2004) The MKK2 pathway mediates cold and salt stress signaling in *Arabidopsis*. *Molecular Cell* 15, 141-152

Tena, G., T. Asai, W.-L. Chiu et J. Sheen (2001) Plant mitogen-activated protein kinase signaling cascades. *Current Opinion in Plant Biology* 4, 392-400

The Arabidopsis genome initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408, 796-815

Thompson G.A. et Okuyama H. (2000) Lipid-linked proteins of plants. *Progress in Lipid Research* 39, 19-39

Ullah, H., J.-G. Chen, J. C. Young, K.-H. Im, M. R. Sussman, et A. M. Jones (2001) Modulation of cell proliferation by heterotrimeric G protein in *Arabidopsis*. *Science* 292, 2066-2069

Vrebalov J, D. Ruezinsky, V. Padmanabhan, R. White, D. Medrano, R. Drake, W. Schuch, et J. Giovannoni (2002) A MADS-box gene necessary for ripening at the tomato *ripening-inhibitor (rin)* locus. *Science* 296, 343-346

Wada I., D. Rindness, P. H., Cameron, W.-J. Ou, J. J. Doherty II, D. Louvard, A. W. Bell, D. Dignard, D. Y. Thomas et J. J. M. Bergeron (1991) SSR α and associated calnexin are major calcium binding proteins of the endoplasmic reticulum membrane. *The Journal of Biological Chemistry* 266, 19599-19610

Wang, K. L.-C. H. Li, et J. R. Ecker (2002) Ethylene biosynthesis and signaling networks. *The Plant Cell Supplement* S131-S151

Widmann, C., S. Gibson, M. B. Jarpe, et G. L. Johnson (1999) Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiological Reviews* 79, 143-180

Wrzaczek, M., et , H. Hirt (2001) Plant MAP kinase pathways : how many and what for? *Biology of the Cell* 93, 81-87

Wu, C., M. Whiteway, D. T. Thomas et E. Leberer (1995) Molecular characterization of Ste20p, a potential mitogen-activated protein or extracellular signal-regulated kinase kinase (MEK) kinase kinase from *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry* 270, 15984-15992

Xiong A.-S., Q.-H. Yao, R.-H. Peng, X. Li, P.-L. Han, et H.-Q. Fan (2005) Different effects on ACC oxidase gene silencing triggered by RNA interference in transgenic tomato. *Plant Cell Reproduction* 23, 639-646

Yang, K. Y., Liu, Y. et Zhang (2001) Activation of a mitogen-activated protein kinase pathway is involved in disease resistance in tobacco. PNAS 98, 741-746

Yu H., J. K. Chen, S. Feng, D. C. Dalgarno, A. W. Brauer, et S. L. Schreiber (1994) Structural Basis for the binding of proline-rich peptides to SH3 domains. Cell 76, 933-945

Yuasa T., S. Ohno, J. H. Kehrl, et J. M. Kyriakis (1998) Tumor necrosis factor signaling to stress-activated protein kinase (SAPK)/Jun NH₂-terminal kinase (JNK) and p38. The Journal of Biological Chemistry 273, 22681 - 22692

Zhang, S. et D. F. Klessig (2001) MAPK cascades in plant defense signaling. Trends in Plant Science 6, 520-527

Zheng L., R. C. Heupel, et D. DellaPenna (1992) The β subunit of tomato fruit polygalacturonase isoenzyme 1: isolation, characterization, and identification of unique structural features. The Plant Cell 4, 1147-1156

6. Remerciements

D'abord merci à mon directeur de maîtrise, Docteur Daniel P. Matton, qui a su me guider dans mes recherches, et lors de la rédaction de ce mémoire et qui m'a amené à réaliser un travail dont je suis fière. Ensuite merci à tous les membres du laboratoire qui ont tous été d'une aide sans égale. Merci à Sier-Ching Chanta pour son enseignement du deux-hybrides, merci à Sébastien Caron qui m'a aiguillé au départ sur la protéine ScFRK3, merci à Martin O'Brien pour tous ses trucs, astuces et connaissances qu'il prend plaisir à partager, merci à Hugo Germain pour ses nombreux conseils, merci à Madoka Grey pour ses connaissances, merci à Éric-Sandro Chevalier ainsi qu'à Catherina Vietrogon pour leur bonne humeur, et enfin merci à Mélanie Laurin qui fut stagiaire avec moi au début et avec qui j'ai débuté mon aventure dans le laboratoire. D'autres remerciements vont à mes parents et à mon frère qui ont toujours été avec moi et mes plus grands supporteurs. Et enfin merci à Roberto Guzman qui a eu la gentillesse d'effectuer le travail de révision sur un sujet aussi éloigné de ses propres intérêts.

