Université de Bordeaux 1

Année 2011

Thèse n°4466

THÈSE DE DOCTORAT

Ecole doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité : Biologie Végétale

Soutenue publiquement

Le 19 Décembre 2011

Par Julie LEBLOND-CASTAING

Caractérisation de l'interaction des protéines IMA/MIF2 et CSN5 au niveau moléculaire et physiologique.

Devant le jury constitué de :

M. Ioan NEGRUTIU.....Examinateur
M. Sébastien MONGRAND .....Examinateur
M. Michel CASTROVIEJO .....Président
M. Mondher BOUZAYEN.....Rapporteur
Mme Catherine PERROT-RECHENMANN .....Rapporteur

Sous la direction de :

M. Michel Hernould, Professeur à l'Université de Bordeaux 2, INRA Bordeaux.



ATTENTION, LIEU de POLITESSE et de COMPLIMENTS en tout genre, risque pour les non-habitués d'effets secondaires non désirés…

Mes premiers remerciements vont à mon directeur de thèse, *Michel Hernould*, qui bien avant de tenir ce rôle, a été mon professeur durant 3 ans et m'a permis de réaliser mon premier stage, ce qui a, sans conteste, été le point de départ de toute la démarche qui a suivie. Je le remercie de m'avoir aiguillée lors de mes réflexions sur mon projet professionnel et d'avoir, durant ces années de fac, toujours gardé un œil sur moi (on sait jamais, d'ici que je fasse une bêtise, il n'y a qu'un pas !!). Je le remercie d'avoir cru en moi et d'avoir investi autant de temps dans mes préparations de communications orales. Comment oublier le concours de l'Ecole Doctorale et ses répétitions à n'en plus finir ? Mais le résultat valait le coup même si j'ai mis longtemps à y croire. Vos connaissances inépuisables (on parlera pas de celles liées à vos blagues d'un genre tout à fait inédit…) m'ont été très utiles, bien que je pense qu'elles seraient encore plus utiles si elles étaient consignées dans un joli cahier de manip, style couverture à paillettes avec des codes couleurs selon les activités par exemple (d'ailleurs, à ce sujet, je ne saurai vous recommander un peu plus de rose peut-être). Votre capacité d'écoute et votre patience sont tout à votre honneur et je pense qu'aucun membre de ce laboratoire ne dira le contraire. Enfin, je vous remercie de m'avoir laissée cette autonomie, dans mes choix plus ou moins stratégiques et dans mes «plans d'attaque». Aussi difficile a-t'elle pu être au départ et même si, pour employer vos mots, j'ai pu me sentir «orpheline» à certains moments, j'ai appris à l'apprivoiser et à en faire mon alliée. Et c'est grâce à elle que le 19 Décembre dernier, j'ai réussi à mener au bout ce travail de thèse, grâce à l'assurance que cette autonomie m'a procurée. J'ai mis le temps mais j'ai compris.

Il me faut donc à présent remercier mon laboratoire d'accueil, l'UMR 1332, Biologie du Fruit et Pathologie, née il y a peu. Je remercie *Sylvie German-Retana* et *Anne-Sophie Dielen* de m'y avoir accueillie pour mon stage de Master 1. Je remercie *Thierry Michon*, *Jocelyne Walter* et *Geneviève Roudet-Tavert* de m'avoir conseillée et prêtée du matériel pour mes tentatives biochimiques. Merci à la plateforme du BIC et notamment à *Lysiane*, petite mais terriblement énergique ! Je lui souhaite beaucoup de bonheur tant professionnel que personnel, elle le mérite surtout avec tout ce qu'on lui fait subir (mais bon faut pas manifester autant d'enthousiasme quand on te maltraite aussi !). Mais surtout je remercie tout particulièrement l'ancienne UMR 619, Biologie du Fruit, celle que j'ai le plus cotoyée. Bientôt 4 ans avec vous et c'est du bonheur ! Merci à vous d'avoir aussi répondu à mes nombreuses interrogations et d'être aussi sympathiques ! Je pense à ceux d'en haut : *Martine L.*, *Pierrot*, *Joana*, *Daniel*, *Lisa*, *Antoine*, *Laurent*, *Florence*, *Massimo*, et bien sûr à ceux d'en bas : *Yo*, *Ninie*, *Jennifer*, *JP*, *Cécile*, *Kentaro*, *Nat*, les deux fripouilles de *Tonton* et *Tata*, *Christian*, *Michel*, *Lamia*, *Thomas*, *Aurélie*, *Guillaume* et la famille *Pirrelli*. Et puis, il y a les anciens : *Nico*, *Matthieu*, *Mehdi* et *Fabien*, et puis *Louise* et *Elodie*, les deux «mamans»

du bébé thésard que j'ai pu être. Je remercie mon chef d'équipe, *Christian Chevalier* qui a pris part à toutes les réunions organisées autour de ma thèse. Malgré toutes ses responsabilités, je le remercie d'avoir pris le temps à chaque fois que cela était nécessaire et de m'avoir donnée tout ce qui m'était matériellement nécessaire. Merci à *Michel Castroviejo*, qui avant d'être mon Président de jury, m'a confiée son système de gel filtration en ayant bien plus confiance que moi sur mes capacités à gérér l'affaire, j'ai été très heureuse de l'avoir dans mon jury de thèse. Merci à ceux qui m'ont aidée et qui ont fait avancé ce travail par leur investissement personnel, je pense particulièrement à *Adrien* qui lui aussi a toujours répondu présent, même loin ; à *Isis*, technicienne dévouée et pleine de bonne volonté, et à *Céline*, nouvelle recrue dans le gang des thésards. Je pense bien évidemment à ceux que j'appelle «mes quatre mousquetaires», *Christian*, *Michel* et les deux *Fred*. Un grand merci à *Lisa* d'avoir partagé durant 6 longs mois notre bureau de rédaction, merveilleux petit nid plein de gourmandises et d'échanges sur la création de bijoux et de robes. Sans toi, l'épreuve n'aurait pas été aussi aisée et ça a fait du bien de vivre cette étape ensemble. Je te souhaite beaucoup de bonheur pour la suite en Australie ou je ne sais où encore. Sans oublier l'autre aspect de ces trois années, je remercie l'équipe enseignante de Bordeaux 1 qui m'a accueillie avec le sourire et qui m'a laissée faire mes premiers pas en qualité de monitrice. Je pense à *Virginie Lauvergeat*, ma tutrice qui a toujours su remplir mon planning d'enseignement ;o) , à *Nat*, à *Emeline*, à *François*, à *Claudine* et les autres. Cette expérience fût riche et très plaisante, merci de m'avoir laissée effectuer ces enseignements comme votre égale. Enfin, je remercie mon jury de thèse, *Ioan Negrutiu*, *Sébastien Mongrand*, *Michel Castroviejo*, *Mondher Bouzayen* et *Catherine Perrot-Rechenmann* d'avoir lu ces 240 et quelques pages et de s'être investis dans la discussion qui a suivi ma présentation de thèse.

Bon le travail, c'est bien… mais ça fait pas tout ! Et je dois dire qu'en matière d'animation non scientifique, y'a des champions en la matière ! Je me dois de citer la fine équipe : *Elodie*, *Louise*, *Fabien*, *Yo*, *Guillaume*, *Cécile*, *Aurélie*, *Tonton Fred* et l'incontournable *Tata Fred* !! Et puis y'a celui qui a raccroché son wagon au train il y a plus d'un an, j'ai nommé le *Pirrello* ou «Pirrelli» ou «Pire-au-lit» ou «Le-Pire-est-là» ou «le petit bonhomme en mousse» et j'en passe. Il y a eu les évènements de la première heure au coin café d'en bas où des débats enflammés s'élevaient tous les midis. Beaucoup d'évènements : galette, Papin contest, enterrement de vie de jeune de fille de Louise, blague téléphonique à un Mr Rivet en détresse, railleries et râleries de paillasse, coloration d'une balance à l'amidoblack par Elodie, découverte d'un système de révélation de mes protéines qui fonctionne (les oreilles de Fabien s'en souviennent encore). Merci à *Elodie* qui s'est occcupée de moi pour mon premier stage qui fût une révélation. Son (comment dire…) enthousiasme (?) m'a toujours beaucoup fait rire. Son départ a été un déchirement mais aujourd'hui, vu sa vie, c'était un grand bien qu'elle s'en aille et je lui souhaite que ce bonheur continue et qu'elle fasse encore souffrir beaucoup d'étudiants. Un énormissime merci à

Fabien et à *Louise* qui, jusqu'au bout, ont répondu présent, même loin, même avec un bébé, même avec nos histoires de vie, ils sont là et j'espère que ça durera. A Louise et nos virées «Fitness First» sur du «Sexy bitch» & cie, à nos discussions, à nos remontées de moral, à nos fous rires, à ses atouts modes, au gâteau aux noix de son Papa, à mon anniversaire qu'elle a organisé chez elle parce qu'elle est «trop mignonne», à leur sublime mariage, à nos origines périgourdines, à ses encouragements, à mon squattage forcé de voiture, à sa doudoune Sonia Rykiel, à nos péchés mignons, à sa maternité et à nos rêves secrets. Et surtout surtout, pourvu que ça dure !! A *Yo* et *Guillaume*, les inconditionnels de la blague graveleuse, ce qui est bien, c'est que dans tous les remerciements de thèse, on en revient un peu au même… Mais heureusement qu'ils sont là pour détourner chaque mot, chaque phrase qui pourrait avoir un sens caché (et parfois bien caché !). Un coin café sans Yo, c'est de suite tout triste… il manque un peu de piment (d'Espelette bien sûr ! Celle-là, elle était fastoche !). L'arrivée de son petit (ou presque !) Paul nous a inondé d'anecdotes en tout genre et a révélé un aspect de sa personnalité insoupçonné (je m'en remets toujours pas que tu lui fasses un gâteau pour son moisi-versaire… !). Et puis que de déception quand après avoir tendu quelques hameçons, on ne voit pas rappliquer Guillaume qui vient faire la fouine ! Quoiqu'un peu moins depuis qu'il rédige sa thèse lui aussi. Bref tout ça pour vous dire que vous me manquerez, c'est certain ! A *Cécile*, la tornade du sud mais pas «cagole» ! Merci d'avoir percé les tympans de Yo aussi souvent et de m'avoir toujours réservé un espace de plaintes à volonté ! Merci pour tes nombreuses pendaisons de crémaillère qui nous ont donné l'occasion de tous nous réunir. Merci à *Julien*, arrivé sur le tard mais intégré instantanément et puis bientôt un nouveau départ. Je croise les doigts et espère que vos vœux se réaliseront rapidement. Merci à toi pour ton humour décapant ! Je retiendrai ton bordélisme inconditionnel, tes ADNc à partir d'eau (ça j'avoue, c'est fort…très fort), notre blague à ton initiative d'un étudiant amouraché de Tata Fred, ta collection de bac à glace, ta monstrueuse paire de seins au carnaval 2011, tes tentatives vaines de devenir sportif, ta purée de thon à la betterave (et encore, je l'ai même pas goûté !), ta femme, … Grâce au Pirello, on a appris qu'*Aurélie* avait un lieu de prédilection, la réserve pour des RDV cachés... Merci à tous les deux d'avoir rempli ce bureau de bonne humeur et de discussions passionnantes sur vos merveilleuses soirées et nuits avec vos chers bambins ! Non vraiment, ça fait envie ! Enfin je termine par le bureau des Dupont&Dupond, des Dodo&Fredo, des Mario&Luigi mais surtout des *Tonton* et *Tata* ! Merci de m'avoir supporté durant tout ce temps, j'avoue que chaque objet disparu, chaque machine en panne, chaque paillasse dégueulasse, ça vous retombait un peu dessus… Mais vous avez tenu bon et vous voilà presque au bout de vos peines… A Tonton, le jardinier, et son optimisme légendaire qui s'est souvent heurté à mon réalisme débordant, ne change rien ! Ca fait du bien des personnes comme toi et il y en a peu. Je te souhaite BEAUCOUP de bonheur et vite fait ! Bientôt tu seras le référent de l'histoire CSN5/IMA, sans moi, ce sera plus facile de te l'approprier et, je l'espère, de la faire perdurer un peu dans le temps… Je compte sur toi,

lâche pas l'affaire ! A Tata, pfff, il y en a des choses à dire !! Merci de ton investissement dans ce projet qui n'est pas le tien et de la pertinence de tes remarques. Merci de ta réactivité face au combat que j'ai livré quotidiennement contre mes protéines et d'avoir créé cette «plateforme» protéique qui m'est dédiée puisque comme l'a soulevé Pirrello, y'a que moi pour faire des manips de prot qui servent à rien ! Mais surtout merci merci merci de m'avoir suivie dans toutes les activités annexes du laboratoire : manip en gilet jaune, koh lanta day, carnaval et sans oublier l'inévitable, l'incontournable phénomène Tata Fred ! Ma plus belle manip de thèse qui malheureusement n'a pas pu être encore publiée à ce jour mais qui devrait paraître dans «Elle» ou «Gala» courant 2012 ou 2013 lors d'une HDR par exemple… Ah bientôt de la reconnaissance dans ce monde ! Ce petit trait d'humour acerbe des mauvais jours me manquera certainement mais que veux-tu ? Toi-même tu le dis, les étudiants, ça va, ça vient, c'est toujours la même rengaine, ça sert à rien de s'attacher ! Même si je ne sais pas ce que l'avenir me réserve, je ne serais certainement jamais très loin, on pourra parler de sacs Lollipop's, du pourquoi y'a des trous dans tes cannelés, comment faire pour que tes muffins ne soient pas secs, et pourquoi, POURQUOI, Clermont a encore paumé face à Toulouse (quand tu comprendras que c'est le talent et qu'on contourne peut-être les volcans mais pas le talent, t'arrêteras de te torturer, crois-moi !).

Pour finir, je voudrais remercier ma famille. Mon père et ma mère qui ont financé ces lonnnnnngues études sans en voir l'issue (et toujours pas d'ailleurs !) et qui ont surtout laissé libre cours à mes envies. Ils ne font pas partie des parents qui ont une idée préconçue sur l'avenir de leurs enfants et ma foi, tant mieux ! Je suis très heureuse de leur avoir fait partager ce petit bout de moi et de faire leur fierté. J'espère juste que j'arriverais à continuer mais heureusement, ils sont pas difficiles ! Je remercie ma belle-famille, mes grands parents, mon frère et mes amis d'avoir cherché à comprendre en quoi consistait mon métier et d'avoir même mis la main à la pâte en cette journée du 19 Décembre. Merci à Audrey et Céline d'avoir été présentes en ce jour avec leur énergie débordante, merci à Zaza pour les longs mails échangés au cours de ces années sur le pourquoi de continuer et comment. Enfin (le dernier !), je voudrais donner toute ma gratitude et ma reconnaissance à mon mari, Emilien. Malgré les difficultés pour toi de comprendre mon univers professionnel peu commun, tu m'as soutenue durant les «heures sombres», m'as encouragée à chaque instant et as cru en chaque possibilité. Même si je pense que parfois, tu mises trop d'espoir en moi, tu as confiance en moi, pour nous deux, et ça, c'est inestimable… Etre avec toi, c'est une force qui me permet d'envisager des projets que jamais je n'aurais osé imaginer avant.

A nos amours et à nos rêves…

SOMMAIRE

ABREVIATIONS **11**

INTRODUCTION **19**

I Les régulateurs de croissance chez les plantes ou phytohormones. **21**

1. Les cytokinines. ***21***

Métabolisme *21*

Transport. *23*

Transduction du signal. *25*

2. Les auxines. ***27***

Métabolisme *29*

Transport. *31*

Transduction du signal. *35*

3. Les gibbérellines. ***39***

Métabolisme *39*

Transduction du signal. *41*

4. L'acide abscissique. ***45***

Métabolisme *45*

Transport intercellulaire de l'ABA. *47*

Transduction du signal. *49*

II Le signalosome, candidat idéal pour l'intégration des signaux. **57**

1. Caractéristiques structurales et biochimiques. ***57***

Caractérisation des sous-unités *57*

Dynamique d'assemblage du complexe *59*

Homologies d'architecture avec le complexe d'initiation à la traduction eIF3 et le «couvercle» du protéasome 26S. *63*

Activité enzymatique isopeptidase *67*

2. Rôles du complexe signalosome dans la cellule. ***73***

Caractérisation du signalosome et de ses partenaires. *73*

Mécanisme d'action et assemblage de la machinerie protéolytique. *75*

III Rôles physiologiques du complexe signalosome. **81**

1. Caractéristiques phénotypiques des mutants csn. ***83***

2. Implication du signalosome dans la régulation des complexes SCF permettant la réponse aux phytohormones auxine et gibbérellines. ***87***

Signalosome, complexe ubiquitine-ligase SCF^{TIR1} et les auxines. *87*

Signalosome, complexe ubiquitine-ligase SCF^{SLY1} et les gibbérellines. *91*

3. Cas particulier d'une voie de signalisation non élucidée : la réponse à l'acide abscissique. 99
4. Implication du signalosome dans la réponse de la plante à la lumière. 103
5. Signalosome, cycle cellulaire et ADN. 109
Cycle cellulaire et réparations des lésions de l'ADN. 109
Le signalosome, un régulateur transcriptionnel ? 113
IV Développement du méristème apical et implication des phytohormones. 117
1. Mise en place du méristème apical. 119
2. Maintenance et régulation de l'activité méristématique. 121
Contrôle génétique. 121
Régulation par des facteurs de croissance. 127
- *Les cytokinines. 127*
- *L'auxine. 129*
- *Les gibbérellines. 131*
- *Interconnections entre les voies répondant à ces trois phytohormones. 131*

3. Passage du méristème d'un statut indéterminé à un statut déterminé. 135
4. Développement du méristème floral. 141
Contrôle génétique. 143
Implication des régulateurs de croissance. 147
Programmes génétiques et régulation hormonale du développement des ovules. . 149
5. Terminaison florale. 151
V Une nouvelle classe de gènes spécifiques du développement floral: les gènes ZF-HD ? 157
1. Les protéines ZF-HD. 157
2. Les protéines MIF. 163
Les gènes MIF1 et MIF3 163
Le gène MIF2. 167
VI Présentation du travail de thèse. 171
RESULTATS et DISCUSSION 177
I Caractérisation moléculaire de l'interaction entre les protéines IMA/MIF2 et CSN5 177
1. Découverte de l'interaction entre les protéines IMA et SlCSN5A chez la tomate. 177
2. Article 1: The Mini Zinc Finger protein MIF2 is involved in auxin signaling via the regulation of COP9-signalosome activity. 181
3. Interaction des protéines d'Arabidopsis MIF2 et AJH1. 205
4. Conséquence de l'interaction entre les protéines CSN5 et IMA/MIF2. 207

La protéine MIF2 inhibe l'activité de déneddylation liée à la sous-unité 5 du signalosome.....207

Mécanismes d'inhibition de la protéine MIF2 sur la protéine CSN5.....209

5. Conséquence de l'interaction MIF2/CSN5 dans la réponse à l'auxine.....217

II Caractérisation du gène *MIF2* lors du développement de la plante. 225

1. Caractéristiques phénotypiques des plantes surexprimant MIF2.....225

2. Régulation transcriptionnelle entre les gènes MIF2 et CSN5A. 227

3. Expression des gènes MIF2 et CSN5A et réponse à la lumière au cours de la germination. 229

4. Rôle du gène MIF2 dans la régulation des voies de signalisation aux phytohormones lors de la germination à l'obscurité. 233

Rôle du gène MIF2 dans la croissance de l'hypocotyle en réponse à l'auxine. 233

Rôle du gène MIF2 dans la croissance de l'hypocotyle en réponse aux gibbérellines. 237

5. Rôle du gène MIF2 dans la régulation de la voie de signalisation des gibbérellines lors de la réponse à la lumière.....241

III Etude préliminaire des interactions génétiques et protéiques entre *MIF2* et *ZHD*. 245

1. Régulation transcriptionnelle. 245

2. Interaction entre les protéines MIF2 et CSN5. 247

DISCUSSION, PERSPECTIVES.....255

I Etat des lieux des connaissances concernant les gènes *MIF* en 2008.....255

II IMA/MIF2, une protéine adaptatrice modulant l'activité du signalosome ? 257

1. Mécanismes d'interaction des protéines IMA/MIF2 et CSN5.....257

2. Les protéines IMA/MIF2 inhibent la réponse à l'auxine par leur action sur la protéine CSN5. 261

3. Le paradoxe de la fonction de la protéine MIF2 dans la réponse à l'obscurité et aux gibbérellines. 263

III IMA/MIF2, un interrupteur régulant l'activité du cycle cellulaire ?.....267

1. Description du cycle cellulaire et de ses différents niveaux de régulation.....267

2. Implication des protéines IMA/MIF2 et CSN5 dans la régulation du cycle cellulaire chez les plantes. 269

Implication des protéines MIF dans la progression des cellules dans le cycle cellulaire.....269

Implication de la protéine CSN5 dans la régulation du cycle cellulaire. 271

3. IMA/MIF2, une protéine végétale à visée thérapeuthique ?.....273

MATERIELS et METHODES.....281

I Matériel biologique.....281

1. Matériel végétal et milieux de culture. 281

2. Souches bactériennes et milieux de culture. 283
3. Souche de levures et milieux de culture. 283
4. Plasmides. 285
Vecteurs d'entrée. 285
Vecteur d'expression utilisé pour la transformation stable de plantes. 285
Vecteurs d'expression utilisés pour la transformation transitoire de plantes. 285
Vecteurs utilisés pour la recherche d'interaction protéique par la technique de double hybride. 287
Vecteurs utilisés pour la production de protéines recombinantes en système hétérologue bactérien. 287
II Méthodes de manipulation et d'analyse des acides nucléiques. 289
1. Extraction des acides nucléiques. 289
Extraction de l'ADN génomique d'Arabidopsis thaliana et de tomate. 289
Extraction des ADN plasmidiques de bactéries. 289
Extraction d'ADN de levure. 289
Extraction d'ARN totaux. 291
2. Clonage moléculaire par recombinaison selon la technologie Gateway®. 291
Préparation de l'insert. 291
Clonage dans le vecteur d'entrée. 295
Clonage dans le vecteur de destination. 295
3. Préparation et transformation des bactéries électrocompétentes. 295
4. Préparation et transformation des levures thermocompétentes. 297
5. Réaction de transcription inverse (RT). 299
6. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR). 299
Mélange réactionnel. 301
Conditions de PCR. 301
7. PCR en temps réel. 301
8. Electrophorèse des ADN. 305
9. Séquençage. 305
III Etude des interactions protéines-protéines par la technique de double-hybride. 305
1. Evaluation du phénomène d'auto-activation des protéines. 307
2. Criblage des interactions protéiques. 307
3. Vérification de la spécificité d'interaction. 307
IV Méthodes d'analyse des protéines 309
1. Production de protéines végétales recombinantes en système hétérologue bactérien. 309
2. Extraction de protéines. 309
Extraction de protéines recombinantes à partir de cultures d'E. coli. 309
Extraction de protéines à partir de tissus végétaux. 311

3. Purification des protéines recombinantes. 311
4. Concentration des protéines. 313
5. Analyse des protéines par électrophorèse monodimensionnelle en conditions dénaturantes (SDS-PAGE). 313
6. Révélation des protéines au bleu de Coomassie 313
7. Analyse par Western blot. 315
Electrotransfert des protéines sur membrane. 315
Production d'anticorps et liste des anticorps commerciaux utilisés. 315
Immunodétection des protéines sur membrane PVDF. 315
8. Analyse des protéines par chromatographie d'exclusion. 317
V Méthodes de transgénèse et de sélection des plantes transgéniques. 319
1. Transgénèse et sélection des plantes d'Arabidopsis thaliana. 319
Transformation stable d'Arabidopsis. 319
Etude de la ségrégation du transgène. 319
Sélection des plantes transgéniques. 319
2. Transformation transitoire des épidermes d'oignon et des hypocotyles de moutarde par biolistique. 319
3. Transformation de protoplastes de tomate. 321
Isolement des protoplastes. 321
Transformation des protoplastes. 323
VI Méthodes d'analyse des plantes et tissus transgéniques. 323
1. Etude de la sensibilité des plantes d'Arabidopsis vis-à-vis de divers régulateurs de croissance 323
2. Observation de la localisation subcellulaire, et de l'interaction in vivo par BiFC en microscopie. 325
BIBLIOGRAPHIE 329
COMMUNICATIONS 343
I Communications orales 343
II Posters 343

TABLE des ILLUSTRATIONS

Figure 1: Structures chimiques des différentes classes de phytohormones intervenant dans le développement des plantes (d'après *Santner et al., 2009*). 18
Figure 2: Voie de biosynthèse des cytokinines (d'après *Sakakibara, 2006*). 22
Figure 3: Transduction du signal cytokinine jusqu'au noyau (d'après *Santner et al., 2009*) 24
Figure 4: Voies de biosynthèse de l'acide 3-indole acétique (AIA) chez les plantes et les microorganismes ainsi que les différents modes de conjugaison (d'après *Woodwark et al., 2005* et *Zhao, 2010*). 30
Figure 5: Transport polaire de l'auxine et signalisation auxinique dans la cellule (d'après *Vanneste and Friml, 2009*). 32
Figure 6: Voie de biosynthèse des gibbérellines (d'après *Yamaguchi, 2008*). 40
Figure 7: Voie de biosynthèse et modes d'inactivation de l'ABA (d'après *Seo et al., 2002* et *Nambara et al., 2005*). 44
Figure 8: Voie de transduction du signal ABA, d'après (Hubbard, et al. 2010) 50
Figure 9: Caractéristiques des sous-unités à domaine PCI et MPN (a) et assemblage de ces sous-unités en complexe signalosome (b) (d'après *Dessau et al., 2008*, *Sharon et al., 2009* et *Enchev et al., 2010*) 58
Figure 10: Comparaison de la composition et de l'assemblage des trois complexes à domaine PCI (d'après *Pick et al., 2009*). 62
Figure 11: Rôle enzymatique du domaine JAMM de la sous-unité CSN5. 66
Figure 12: Cinétique d'assemblage de la machinerie protéolytique (d'après *Schwechheimer et al., 2004*). 74
Figure 13: Formation de clastosomes lors de la colocalisation des composants de la machinerie protéolytique et d'un substrat, IAA17, répresseur transcriptionnel de la réponse à l'auxine sous stimulation auxinique (d'après *Tao et al., 2005*) 80
Figure 14: Phénotypes des mutants d'insertion *csn5a* et *csn5b* (A) et effets des mutations dans le domaine JAMM de CSN5A chez un mutant *csn5b* (B, C, D et E) (d'après *Gusmaroli et al., 2004 et 2007*). 84
Figure 15: (a) Dégradation des Aux/IAA par le complexe SCF^{TIR1} permettant l'activation de la transcription des gènes de réponse à l'auxine et (b) modèle impliquant l'auxine comme une «glue» moléculaire entre le récepteur TIR1 et le co-récepteur Aux/IAA (d'après *Santner et al., 2009* et *Tan et al., 2007*). 88
Figure 16: Mécanismes de perception des gibbérellines (d'après *Murase et al., 2008*). 92
Figure 17: Bilan des réponses aux phytohormones faisant intervenir la machinerie protéolytique (d'après *Santner et al., 2009*). 96
Figure 18: Bilan des diverses ubiquitines-ligases régulant la réponse à l'ABA. 98
Figure 19: Régulation des facteurs de réponse à la lumière, en absence de lumière (d'après *Chen et al., 2010*) 106
Figure 20: Impacts de la machinerie protéolytique sur la synthèse de l'ADN et dans la réparation des lésions ADN. 112
Figure 21: Organisation du méristème apical en couches cellulaires et zones chez *Arabidopsis thaliana*. 118

Figure 22: Régulation génétique de l'activité méristématique d'après *Traas and Vernoux, 2002* (a). Description du système *CLAVATA* (*Brand et al., 2000, Rojo et al., 2002, Muller et al., 2008 et Kinoshita et al., 2010*) (b). 122
Figure 23: Distribution des principales phytohormones dans le SAM (a) et leur rôle sur les gènes impliqués dans l'activité méristématique (b). 128
Figure 24: Les différentes voies participant à la transition florale (d'après *Amasino, 2010*). 134
Figure 25: De l'établissement du méristème floral à la formation des organes floraux chez *Arabidopsis thaliana* 142
Figure 26: Organisation structurale des domaines des protéines ZHD et analyse de l'expression des gènes *ZHD* (d'après *Tan et al., 2006*) 158
Figure 27: Expression spatiale des gènes MIF (a) et phénotypes des plantes surexprimant le gène MIF1 (b à e) (d'après *Hu et Ma, 2006* ; *Hu et al., 2011*). 162
Figure 28: Interactions entre les protéines MIF et les protéines ZHD (a) et cas spécifique de l'interaction MIF1-ZHD5 (b et c) (d'après *Hong et al., 2011*). 166
Figure 29: Alignement des séquences protéiques IMA et MIF2 (*A*) et phénotypes des plantes surexprimant le gène *IMA* (*B-E*) 168
Figure 30: Alignement des séquences peptidiques des sous-unités 5 du signalosome de tomate (SlCSN5A et B), de vigne (VvCSN5) et d'Arabidopsis (AJH1 et 2). 176
Figure 31: Arbre phylogénétique des séquences protéiques des sous-unités CSN5 chez les Eucaryotes (*A*) et expression tissulaire des gènes de tomate SlCSN5A, SlCSN5B (*B*) et IMA (*C*). 178
Figure 32: Localisation subcellulaire des protéines AJH1-YFP (*A* et *B*), MIF2-YFP (*C*) et du complexe AJH1/MIF2 (*D*) dans des cellules d'hypocotyles de moutarde et expression tissulaire des gènes *AJH1*, *AJH2* et *MIF2* chez Arabidopsis (*E*). 204
Figure 33: Profils d'élution des extraits protéiques issus de plantules d'Arabidopsis de type sauvage (haut) et surexprimant le gène *MIF2* (bas) en chromatographie d'exclusion 214
Figure 34: Localisation des protéines CUL1 (A), CSN3 (B), PAA1 (C), CSN5 (D), MIF2 (E) et du complexe MIF2/CSN5 fusionnées à la protéine YFP seules (colonne de gauche) ou en présence de la protéine AXR3/IAA17 fusionnée à la protéine CFP et d'auxine (trois colonnes de droite). 218
Figure 35: Expression spatiale du transgène (A) et phénotypes des plantes MIF2^{OE} (B et C) 224
Figure 36: Phénotypes des fleurs des plantes MIF2^{OE}. 226
Figure 37: Expression des gènes *MIF2* (A) et *CSN5A* (B) dans les plantes WT, *csn5a1* et MIF2^{OE}. 228
Figure 38: Phénotypes des plantes MIF2^{OE} lors de la germination à l'obscurité (A) et à la lumière (B) et expression des gènes *MIF2* et *CSN5A* en fonction de la lumière chez des plantules de 7 jours (C et D). 230
Figure 39: Réponse aux auxines (AIA) et aux gibbérellines (GA_3) lors de la croissance des plantules à l'obscurité. 236
Figure 40: Caractéristiques des plantes MIF2^{OE} à la lumière lors de la réponse aux gibbérellines. 240
Figure 41: Expression des gènes *ZHD* chez les plantules de 7 jours WT et MIF2^{OE} (A) et des gènes *MIF2* et *CSN5A* dans des lignées mutées pour les gènes *ZHD9* (B) et *ZHD13* (C). 246
Figure 42: Localisation subcellulaire de la protéine ZHD5 (A) et interactions des protéines MIF2, ZHD5 et CSN5 (B à D) dans des cellules d'épiderme d'oignon. 248
Figure 43: Bilan des données acquises sur le rôle des gènes *MIF in planta* au début de mon projet de thèse. 254

Figure 44: Bilan des données sur le rôle des gènes *MIF in planta* à la fin de mon projet de thèse. 260
Figure 45: Le cycle cellulaire et ses différents niveaux de régulation. 268
Figure 46: Développement de la fleur (A) (Brukhin, et al. 2003) et du fruit de tomate (B) et schéma développemental d'Arabidopsis thaliana (C). 280
Figure 47: Clonage d'une séquence d'intérêt selon la technologie Gateway®. 290
Figure 48: Schématisation du principe de détection des interactions entre protéines par le système double hybride. 308

Schéma 1: Constructions ayant donné un signal positif en BiFC pour l'interaction des protéines CSN5A et IMA/MIF2 209
Schéma 2: Constructions ayant donné un signal positif en BiFC pour l'interaction des protéines ZHD5 et MIF2. 249

Tableau 1: Nombre de protéines séquencées classées par pic d'élution dans les extraits protéiques des plantes WT et MIF2^{OE}. 213
Tableau 2: Amorces utilisées pour le clonage de gènes candidats. 293
Tableau 3: Amorces utilisées pour la PCR en temps réel. 303
Tableau 4: Anticorps commerciaux utilisés. 314
Tableau 5: Composition des solutions et milieux utilisés pour l'isolation et la transformation des protoplastes 320

ABREVIATIONS

Terminologie Spécifique

2ODD	2-oxoglutarate-dépendante dioxygénases
AAO	Abscissic aldéhyde oxydase
ABA	Abscisic acid
ABC-B/G	ATP Binding Cassette B/G
ABF/AREB	ABRE-binding factors
ABP1	Auxin Binding Protein 1
ABI	ABA Insensitive protein
ABRE	ABA-Responsive Elements
ACC	1-aminocyclopropane-1-carboxylique
AFB 1-5	Auxin Signaling F-box 1-5
AFP	ABI Five binding Protein
AG	AGAMOUS
AHK/CRE	ARABIDOSPIS HIS KINASE/CYTOKININ RESPONSE 1
AHP	ARABIDOPSIS HIS PHOSPHOTRANSFER PROTEIN
AIA	Acide 3-indole acétique
AJH1/2	Arabidopsis JAB homolog 1/2
AKIN10/11	Arabidopsis SNF1 Kinase Homolog 10/11
ALC	ALCATRAZ
AP1/3	APETALA1/3
APC	Anaphase Promoting Complex
ARF	Auxin Response factors
ARR	ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATORS
AS1/2	ASYMETRIC LEAVES1/2
AtAIRP1	Arabidopsis thaliana ABA-insensitive RING protein 1
ATM	ATAXIA TELANGIECTASIA MUTATED
ATR	ATM AND RAD3-RELATED
Aux/IAA	AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID
AUX1/LAX	Auxin influx carrier/Like-AUX1
AuxRE	Auxin Response factor
AXR1/6	Auxin Resistant 1/6
BRI1	BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1
BRL1/3	BRI1-LIKE 1/3
BKI1	BRI1 KINASE INHIBITOR 1
BAK1	BRI1-ASSOCIATED RECEPTOR KINASE 1
BTB	Broad-complex, Tramtrack, Bric-a-brac.
CAND1	Cullin-Associated Nedd8-Dissociated protein 1
CBP1	C-terminal peptide-Binding Protein 1
CDD	COP10/DDB1/DET1
CDF	CYCLING DOF FACTORS
CKX	Cytokinines oxydases/déshydrogénases
CLV1-3	CLAVATA1-3
CO	Centre organisateur
CO	CONSTANS
COI1	CORONATINE-INSENSITIVE 1
COP	CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC
CPS	*ent*-copalyl diphosphate synthase

CRC	CRABS CLAW
CRF	CYTOKININ RESPONSE FACTORS
CRL	Cullin RING Ligase
CRY1/2	CRYPTOCHROME 1/2
CSN	COP9 Signalosome
CTR1	CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE 1
CUC1/2	CUP-SHAPED COTYLEDON 1/2
CUL	Culline
CYP/P450	Cytochrome P450 monooxygénases
CZ	Central zone
cZ	*cis*-zéatine
DCAF1	DDB1-CUL4 ASSOCIATED FACTOR
DDB1/2	UV-Damaged DNA Binding protein 1/2
DET	DEETIOLATED
DMAPP	Diméthylallyl diphosphate
DPA	Acide dihydrophaséique
DWA1/2	DDB1 binding WD40 hypersensitive to ABA 1/2
DWD	DDB1 binding WD40 protein
DZ	Dihydrozéatine
E(Z)	Enhancer of Zeste
EBF1/2	EIN3-BINDING F-BOX 1/2
EEP1	EARLY EXTRA PETALS 1
eIF3/2	Eukaryotic translation Initiation Factor 3/2
EIN2/3/4	ETHYLENE INSENSITIVE 2/3/4
ENT	Equilibrative nucleoside transporter
ERD1	EARLY RESPONSE TO DEHYDRATION STRESS 1
ETA2	Enhancer of *tir1-1* Auxin resistance 2
ETP1/2	EIN2 TARGETING PROTEIN 1/2
ERS1/2	ETHYLENE RESPONSE SENSOR 1/2
ETR1/2	ETHYLENE RESPONSE 1/2
EUI	Elongated Uppermost Internode
FBP	F-box protein
FD	FLOWERING LOCUS D
FKF1	FLAVIN-BINDING, KELCH REPEAT, F-BOX PROTEIN 1
FLC	FLOWERING LOCUS C
FRI	FRIGIDA
FT	FLOWERING LOCUS T
FUL	FRUITFULL
FUS	FUSCA
G1/2	Phase G1/G2 du cycle cellulaire
GA	Gibberellic acid
GA20/13/3/2ox	GA 20/13/3/2 oxydases
GAI	GA Insensitive
GAMT1/2	GA Méthyltransférases 1/2
GGDP	Géranylgéranyl diphosphate
GI	GIGANTEA
GID1/2	Gibberellin-Insensitive Dwarf1/ 2
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
H2A	HISTONE 2A
HIV-1	Human immunodeficiency virus-1
HMBDP	Hydroxyméthylbutényl diphosphate
HY5	LONG HYPOCOTYL 5

IAM	Indole-3-acétamide
IAMT1	IAA carboxyl méthyltransférase
IAOx	Indole-3-acétaldoxime
IAR4	IAA-conjugate resistant 4
IBA	Acide 3-indole butyrique
IMA	INHIBITOR OF MERISTEM ACTIVITY
IND	INDEHISCENT
iP	Isopentenyl-adénine
IPA	Indole-3-pyruvate
IPP	Isopentenyl pyrophosphate
IPT	Adenosine phosphate-isopentenyltransferase
JA	Jasmonic acid
JAB	c-Jun Activation-domain-Binding protein 1
JAZ	Jasmonate ZIM-domain
KAO	acide *ent*-kaurénoïque oxydase
KEG	KEEP ON GOING
KNAT	KNOX proteins from *Arabidopsis thaliana*.
KNOX	KNOTTED-like homeobox
KNU	KNUCKLES
KO	*ent*-kaurène oxydase
KS	*ent*-kaurène synthase
LFY	LEAFY
LHB1B1/LHCB2.2	LIGHT-HARVESTING CHLOROPHYLL-PROTEIN COMPLEX
LOG	LONELY GUY
LUG	LEUNIG
MADS	MCM1, AGAMOUS, DEFICIENS, SRF
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MAX2	MORE AXILLARY BRANCHES2
MEP	Méthylérythritol phosphate
MIF	Mini zinc Finger
MP	MONOPTEROS
MVA	Mévalonate
MZ	Medullar zone
NAC	NAM, ATAF, CUC
NCED	9-*cis*-époxycaroténoïde dioxygénase
NEDD8/RUB1	Neural precursor cell-expressed developmentally down-regulated gene 8/Related to Ubiquitin 1
NER	Nucleotide Excision Repair
PA	Acide phaséique
PAA1	Protéasome Alpha subunit A
PDS	Phytoène désaturase
PHYA/B	PHYTOCHROME A/B
PI	PISTILLATA
PID	PINOID
PIF	PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR
PIN	PIN-FORMED 1
PP2C	Protéines phosphatases 2C
PRC2	POLYCOMB REPRESSION COMPLEX 2
PRL1	Pleiotropic Regulatory Locus 1
PSY	Phytoène synthase
PTL	PETAL LOSS
PUP	Purine perméase

PYR/PYL/RCAR	Pyrabactin Resistance 1/PYR1-like/Regulatory Component of ABA Receptor 1
PZ	Peripheric zone
RAM	Root Apical Meristem
RBE	RABBIT EARS
RBL	REBELOTE
RBX1	RING BOX 1
RCE1	RUB1-Conjugating Enzyme 1
RE	Reticulum endoplasmique
RGA	Repressor of *ga1-3*
RGL1/2/3	RGA-like
RHA2a/b	RING-H2 E3 ligase
RMS4	Ramosus 4
RNR	ribonucléotide réductase
RPK2/TOAD2	Receptor-like Protein Kinase2/TOADSTOOL2
RPL	REPLUMLESS
RPN	Regulatory Particle Non-ATPasic
RPT	Regulatory Particle ATPasic
S	Phase S du cycle cellulaire
SAM	Shoot Apical Meristem
SCF	SKP1, Cdc53/cullin, F-box protein
SDIR1	SALT- and DROUGHT-INDUCED RING FINGER 1.
SEP	SEPALLATA
SERK1	SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1
SEU	SEUSS
SHP	SHATTERPROOF
SKP1/ASK1	S-phase Kinase-associated Protein 1/Arabidopsis SKP1-like 1
SLR1	SLENDER-RICE 1
SLY1	SLEEPY1
SnRK2	«SNF1-related» kinases 2
SPA1	SUPPRESSOR OF PHYA 1
Spd1	S-phase delayed
SPT	SPATULA
SQN	SQUINT
STK	SEEDSTICK
STM	SHOOTMERISTEMLESS
STM	SHOOTMERISTEMLESS
STY1/2	STYLISH1/2
SUP	SUPERMAN
SUR1/2	SUPERROOT1/2
SVP	SHORT VEGETATIVE PHASE
TAA1	Tryptophane aminotransferase
TAM	Tryptamine
TFL1	TERMINAL FLOWER1
TIR1	TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1
TPL	TOPLESS
TPS	Terpènes synthases
TSF	TWIN SISTER OF FT
tZ	*trans*-zéatine
Ubi	Ubiquitine
UBP12	Ubiquitin-specific Protease 12
UFO	UNUSUAL FLORAL ORGANS
ULT1	ULTRAPETALA1

VIN3	VERNALIZATION-INSENSITIVE 3
VRN5	VERNALIZATION 5
WOX	Wuschel-related homeobox
WUS	WUSCHEL
ZEP	Zéaxanthine époxydase

Domaines protéiques

bHLH	basic Helix-Loop-Helix
bZIP	basic leucine zipper
CHASE	Cyclase/His-kinase-Associated Sensing Extracellular
DBD	DNA binding domain
DELLA	Asp (D), Glu (E), Leu (L), Leu(L), Ala (A)
GRAS	GAI, RGA, SCARECROW
HD	Homédomaine
HECT	Homology to E6-AP C Terminus
JAMM	JAB1 MPN domain Metalloenzyme
LRR	Leucine Rich Repeat
MPN	Mrp1p and Pad1p N-terminal
PCI	Proteasome, COP9, eIF3
RING	Really Interesting New Gene
SAND	Sp100, AIRE-1, NucP41/P75, DEAF-1
Ser/Thr kinase	Sérine/Thréonine kinase
WD40	Domaine de 40 aa terminant par un Trp (W) et un Asp (D)
ZF	Zinc Finger

Acides nucléiques et nucléotides

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AMP, ADP, ATP	Adénosine 5’ mono/di/triphosphate
ARN	Acide ribonucléique
dNTP	Désoxynucléotide 5’ triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
GTP	Guanosine Triphosphate
RTP/RDP/RMP	Ribosides 5’-tri/di/monophosphate

Acides aminés

A (Ala)	alanine
D (Asp)	aspartate
E (Glu)	glutamate
H (His)	histidine
I (Ile)	isoleucine
K (Lys)	lysine
L (Leu)	leucine
N (Asn)	asparagine
W (Trp)	tryptophane

Unités

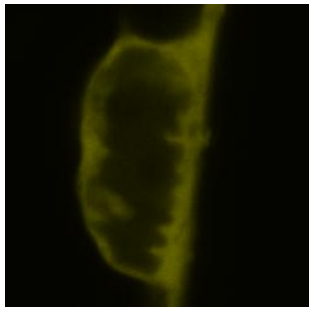
°C	degré Celsius
g	accélération
rpm	rotation par minute
kDa	kiloDalton
pb, kb, kpb,	paire de bases, kilobases, kilopaire de bases,
s, min, h	seconde, minute, heure

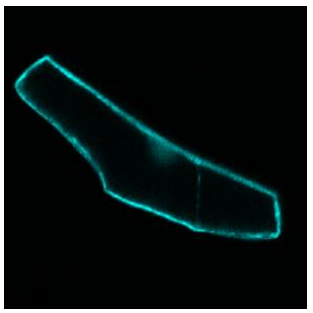
S	Svedberg, unité utilisée pour definer le coefficient de sedimentation.

Divers

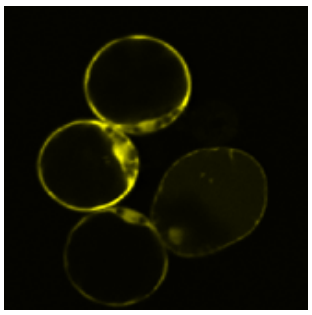
3-AT	3-aminotriazole
BiFC	Bimolecular Fluorescent Complementation
BSA	Bovine Serum Albumine
CaMV	Cauliflower Mosaic Virus
CFP	Cyan Fluorecent Protein
CHX	Cycloheximide
Col-0	Columbia 0
DAPI	4',6-diamino-2-phénylindole
DEPC	Diéthylpyrocarbonate
DNAse I	Désoxyribonucléase I
DO	Densité Optique
DTT	Dithiothréitol
EDTA	Ethylène diamine tétraacétique
IPTG	Isopropyl-β-thiogalactopyranoside
JAA	Jours Après Anthèse
LB, RB	Left Border, Right Border
mQ	milliQ
^{OE}	OverExpressor
p/p, p/v, v/v	poids/poids, poids/volume, volume/volume
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PEG	Polyéthylène glycol
RNAse	Ribonucléase
RT-PCR	Reverse transcription-Polymerase chain reaction
RT-qPCR	Reverse transcription- quantitative Polymerase chain reaction
SDS	Sodium dodécyl sulfate
TAE	Tris/Acide acétique/EDTA
TE	Tris/EDTA
Tm	Température moyenne à laquelle 50% des brins d'ADN sont hybridés
Tris	Tris(hydroxyméthyl)-aminométhane
U	Unité
UV	Ultraviolet
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl β-Dgalactoside
YFP	Yellow Fluorecent Protein

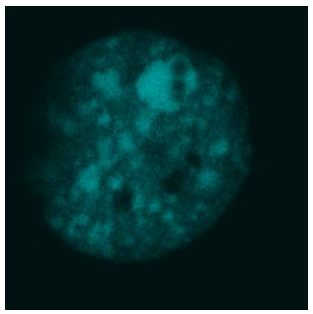






INTRODUCTION







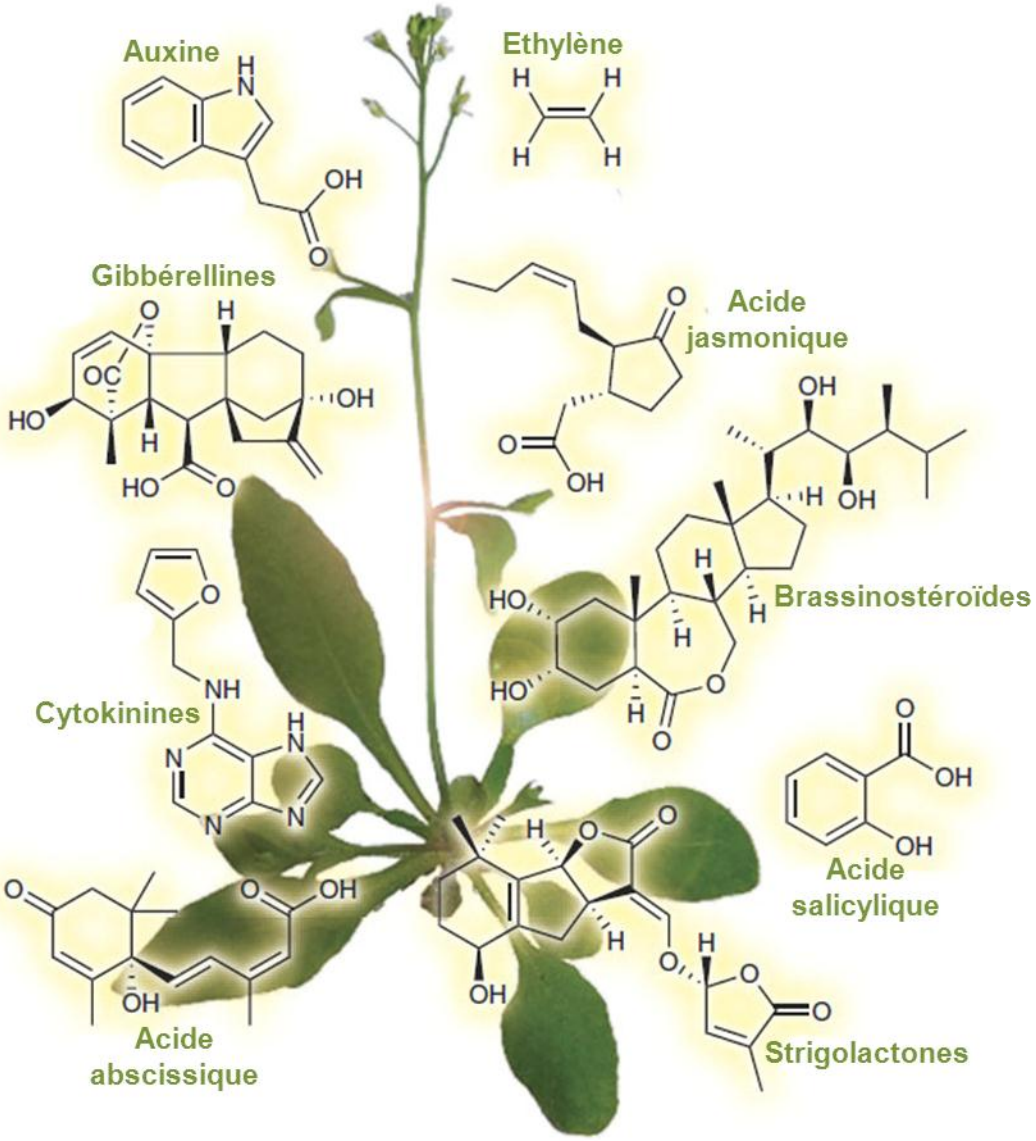


Figure 1: Structures chimiques des différentes classes de phytohormones intervenant dans le développement des plantes (d'après *Santner et al., 2009*).

INTRODUCTION

Les plantes sont des organismes sessiles qui doivent s'adapter aux conditions environnementales du milieu pour coordonner leur croissance et leur développement. Ce mode de vie est rendu possible grâce à leur capacité à former de nouveaux organes due à une croissance continue, ce qui les dote d'une plasticité hors du commun. Les études au XIXème siècle de Julius Von Sachs et Charles Darwin avaient démontré que la croissance des plantes était hautement régulée par des «substances» capables de migrer dans la plante. En effet, ces molécules nommées phytohormones ou encore régulateurs de croissance participent à l'acquisition de cette plasticité développementale grâce aux voies de signalisation dans lesquelles elles sont impliquées. Elles permettent de relayer les signaux endogènes et les signaux environnementaux. Il s'agit de petites molécules diffusibles dérivées du métabolisme secondaire, capables d'agir à de faibles concentrations en intervenant localement, sur leur lieu de synthèse ou dans des tissus distants de leur lieu de production. Les premières phytohormones identifiées durant la première moitié du vingtième siècle sont les auxines, les gibbérellines, les cytokinines, l'acide abscissique et l'éthylène. Plus récemment, les brassinostéroïdes, l'acide jasmonique, l'acide salicylique, l'oxyde nitrique et les strigolactones ont été classés dans la famille des phytohormones (**figure 1**). Tous ces composés régulent chaque aspect de la vie de la plante, du schéma organisationnel de la plante au cours du développement à la réponse aux stress biotiques et abiotiques. La quantité de ces molécules dans la plante est extrêmement régulée et varie selon les changements environnementaux. Les études génétiques menées chez le modèle végétal *Arabidopsis thaliana*, ont permis d'élucider de nombreux aspects de ces voies de signalisation et très récemment, d'identifier certains récepteurs. Plusieurs points essentiels sont ressortis de ces études. Les récepteurs sont divers et fonctionnent différemment selon la molécule concernée. Ensuite, les voies de dégradation dépendantes du protéasome ont un rôle central dans la signalisation hormonale. En effet, de nombreuses études ont permis d'identifier les acteurs moléculaires clés de cette signalisation hormonale dont un complexe protéique nucléaire, le signalosome. De plus, la signalisation hormonale conduit généralement à des changements importants au niveau transcriptionnel. Pour finir, les voies de signalisation hormonales interagissent à de nombreux niveaux afin de réguler la croissance harmonieuse de la plante (Depuydt and Hardtke 2011; Jaillais and Chory 2010; Santner, et al. 2009).

Au cours de cette introduction, j'aborderai les éléments suivants: (1) les diverses voies de réponse aux phytohormones; (2) le rôle du signalosome dans la cellule, un complexe protéique participant à l'intégration de nombreux signaux endogènes et environnementaux et (3) l'implication des phytohormones dans le développement et la maintenance de l'activité méristématique. Enfin, je présenterai une nouvelle classe de gènes, les gènes *MIF* et plus particulièrement le gène *MIF2* qui a été l'objet de cette thèse. En effet, mon projet de recherche a pour but de spécifier le rôle du gène *MIF2* qui occupe une place importante au carrefour des voies de signalisation hormonales et de la machinerie protéolytique à laquelle participe le complexe signalosome, au sein d'une structure particulière de la plante: le méristème floral.

I Les régulateurs de croissance chez les plantes ou phytohormones.

Ce premier chapitre a pour objectif de présenter les voies de signalisation de quatre phytohormones: cytokinines, auxines, gibbérellines et acide abscissique en abordant les étapes concernant leur métabolisme et les effecteurs agissant dans la transduction du signal.

1. Les cytokinines.

Les cytokinines ont été originellement découvertes dans les années 1950 par Carlos Miller par leur capacité à promouvoir la division cellulaire. Depuis, de nombreuses études ont montré que les cytokinines sont impliquées dans divers processus cellulaires, la germination, la sénescence foliaire et le fonctionnement des méristèmes apical et racinaire. Mais leurs implications dans les processus de nodulations chez les légumineuses, d'interactions avec les pathogènes et dans les rythmes circadiens ont également été proposées (To and Kieber 2008).

Métabolisme.

L'homéostasie des cytokinines est finement régulée par leur synthèse et leur catabolisme au niveau spatial et temporel (exemple **paragraphe IV.2**). Les quatre isoformes de cytokinines présentes naturellement et en abondance dans la nature sont l'isopentenyl-adenine (iP), la *trans*-zéatine (tZ), la *cis*-zéatine (cZ) et la déhydrozéatine (DZ). Ces phytohormones sont composées d'une base adénosine phosphorylée (AMP, ADP ou ATP) à laquelle sont rajoutés des groupements isoprènes par les enzymes IPT (adenosine phosphate-isopentenyltransferase). La voie de synthèse des cytokinines partage certaines étapes avec la voie métabolique des purines. En effet, certaines enzymes possèdent un large spectre de substrats puisqu'elles peuvent utiliser les cytokinines ou les adénines.

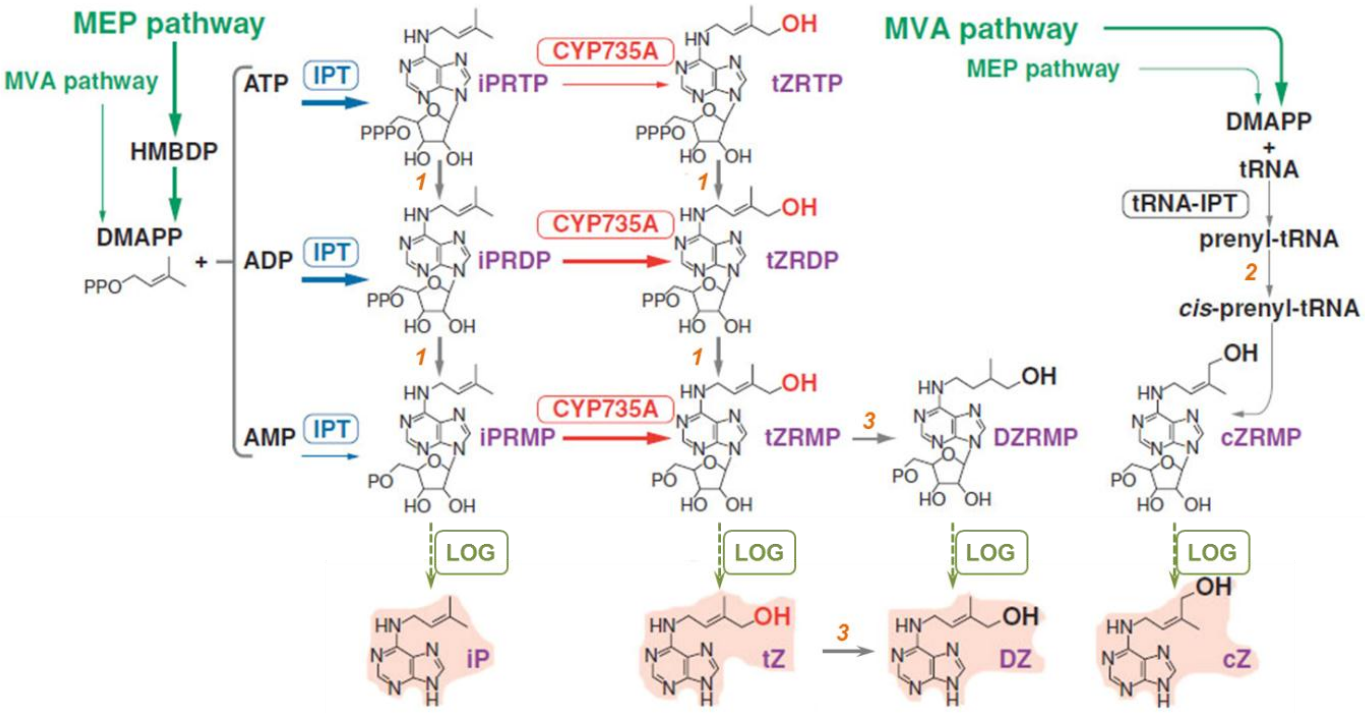


Figure 2: Voie de biosynthèse des cytokinines (d'après *Sakakibara, 2006*).

Les groupements isoprènes utilisés pour la production de cytokinines sont préférentiellement le DMAPP (diméthylallyl diphosphate) et le HMBDP (hydroxyméthylbutényl diphosphate). Le DMAPP est issu de la voie de synthèse du mévalonate (MVA) cytosolique, et de la voie du méthylérythritol phosphate (MEP) plastidiale, alors que le HMBDP est issu uniquement de la voie MEP. L'addition d'un groupement isoprénoïde DMAPP résulte en la production des isoformes iP alors que l'ajout d'un groupement HMBDP résulte en la production directe de *trans*-zéatine (tZ) sans intermédiaire iP.

Il est possible de passer de la forme iP/tZ-RTP à la forme iP/tZ-RDP et de la forme iP/tZ-RDP à la forme iP/tZ-RMP par l'action d'une phosphoribosyl phosphatase (*1*).

Les espèces d'ARN de transfert dont l'anticodon est complémentaire de codons débutant par l'uridine tel que l'ARNtLeu ou l'ARNtSer, portent une adénosine prénylée en *cis* adjacente à l'anticodon. Ainsi, une ARNt-isopentenyltransférase (tRNA-IPT) va catalyser la réaction aboutissant à la production d'ARNt prénylés. Les ARNt prénylés passent en conformation *cis* par une cytokinine *cis*-hydroxylase (*2*).

La déhydrozéatine est produite à partir de *trans*-zéatine riboside 5'-monophosphate (tZRMP) pour former la déhydrozéatine riboside 5'monophosphate (DZRMP) ou directement à partir de *trans*-zéatine par l'action d'une zéatine réductase (*3*).

Chez Arabidopsis, il existe sept gènes *IPT* impliqués dans la biosynthèse des cytokinines, qui utilisent principalement l'ADP ou l'ATP produisant des isopentenyl ribosides 5'-diphosphate (iPRDP) et isopentenyl riboside 5'-triphosphate (iPRTP). La *trans*-zéatine (tZ) peut être produite à partir de deux voies, une voie indépendante des iP passant par l'addition d'un groupement isoprène spécifique sur l'adénosine phosphate et une voie dépendante des iP. Dans cette deuxième voie, deux enzymes cytochrome P450 monooxygénases (CYP735A et B) hydroxylent les isoformes iPRMP, iPRDP et iPRTP afin de produire les isoformes tZRMP, tZRDP et tZRTP. L'isoforme *cis*-zéatine est produite à partir de la dégradation d'ARN de transfert qui représente une voie mineure dans la production de cytokinines (Sakakibara 2006). L'activation des molécules de cytokinines s'effectue par une enzyme phosphoribohydrolase libérant un groupe ribose 5'-mono-/di-/triphosphate afin de produire les cytokinines actives, iP, tZ et cZ (**figure 2**). L'enzyme possédant cette activité a été identifiée chez le riz et se nomme LONELY GUY (LOG) (Kurakawa, et al. 2007). Enfin, il existe des cytokinines aromatiques notamment chez Arabidopsis mais leur biosynthèse et voie de dégradation restent inconnues.

Le nombre de molécules actives de cytokinines dans la cellule dépend du taux de cytokinines conjuguées (inactives) par rapport aux cytokinines non conjuguées (actives) et de leur dégradation. En effet, les cytokinines peuvent être glycosylées soit par un *N*-glycoside sur leur base adénine ou par un *O*-glycoside ou un *O*-xyloside sur leur groupe hydroxyle. La *O*-glycosylation est réversible grâce à une β-glycosidase alors que la *N*-glycosylation est quasiment irréversible. La base adénine peut aussi être phosphoribosylée par une adénine phosphoribosyltransférase, ce qui tend à diminuer l'activité biologique des cytokinines. Concernant la dégradation des cytokinines, ce sont les enzymes cytokinines oxydases/déshydrogénases (CKX) qui catalysent la dégradation irréversible des cytokinines en clivant la double liaison des chaînes isoprénoïdes latérales (Sakakibara 2006).

Transport.

La biosynthèse des cytokinines par les enzymes IPT est spécifique d'un type de tissu voire d'un type cellulaire. La présence des cytokinines dans des tissus ou types cellulaires ne les produisant pas suppose que les cytokinines peuvent migrer vers un tissu-cible par diffusion ou par un système de transport sélectif. Les plantes sont capables d'absorber les isoformes tZ et iP et les formes ribosylées, tZR et iPR. Ces molécules peuvent être trouvées dans le xylème pour les formes tZ, et dans le phloème pour les formes iP (Corbesier, et al. 2003; Takei, et al. 2001). Dans des cultures cellulaires d'Arabidopsis, l'adénine et les isoformes iP et tZ traversent les membranes par un système de transport couplé à des protons.

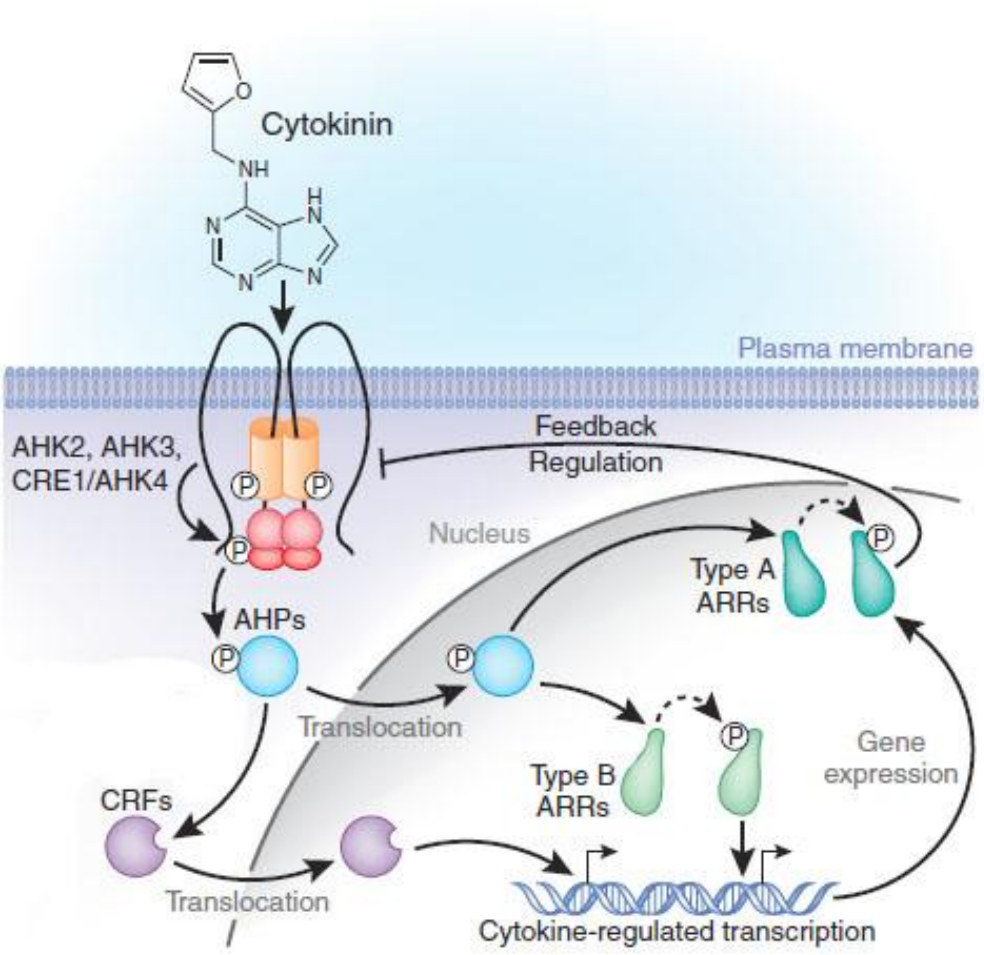


Figure 3: Transduction du signal cytokinine jusqu'au noyau (d'après *Santner et al., 2009*).

La voie de transduction passe en grande partie par une cascade de phosphorylation consistant à transférer un groupe phosphoryl d'après le schéma suivant: His → Asp → His → Asp. Les récepteurs des cytokinines, AHK, s'autophosphorylent et transfèrent le groupe phosphoryl aux protéines AHP qui peuvent aller dans le noyau pour transférer le groupe phosphoryl sur les ARR de type A et B afin de les activer et d'induire l'expression des gènes de réponse aux cytokinines.

Les protéines AHP peuvent aussi entraîner la translocation des facteurs de transcription CRF dans le noyau afin d'induire l'expression des gènes de réponse aux cytokinines.

Il existe deux gènes chez Arabidopsis, *AtPUP1* et *AtPUP2*, qui codent des perméases et participent à l'absorption des cytokinines. Ces transporteurs PUP ont une large spécificité de substrats et participent aussi à l'absorption d'autres dérivés de l'adénine. L'expression du gène *AtPUP2* dans le phloème suppose un rôle de cette protéine dans le transport dans ce tissu (Burkle, et al. 2003). Cependant, les formes prédominantes dans le xylème et le phloème sont les formes ribosylées des cytokinines, tZR et iPR et sont donc considérées comme les formes transportées. Certains membres des «equilibrative nucleoside transporter» (ENT) sont apparemment impliqués dans le transport sélectif des formes ribosylées. Le riz possède quatre gènes *ENT* dont le gène *OsENT2* qui code une protéine participant à l'absorption des formes ribosylées des cytokinines et de l'adénosine (Hirose, et al. 2005). Chez Arabidopsis, la protéine SOI33/AtENT8 exerce le même rôle. Le système de transport des cytokinines apparaît comme étant relativement aspécifique. Cependant, la différence de la composition en cytokinines de la sève entre le xylème et le phloème est suffisante pour assurer la distribution acropète de la *trans*-zéatine par le xylème, et pour la distribution systémique de l'isopentenyl-adénine par le phloème.

Il est intéressant de noter que bien que les plastes soient le compartiment cellulaire où se produit la majorité de la production de cytokinines grâce aux enzymes IPT, aucun système de transport à travers la membrane plastidiale n'a été découvert (Sakakibara 2006).

Transduction du signal.

Les cytokinines utilisent un système inspiré des systèmes bactériens à «deux-composantes» qui fonctionne par un jeu de cascades de phosphorylation transloquées dans le noyau. Dans ce système, un censeur à activité histidine (His) kinase perçoit le signal et provoque l'autophosphorylation d'un résidu His conservé dans le domaine kinase. Dans la signalisation cytokinique, les censeurs du signal cytokinine sont les protéines AHK2 (ARABIDOSPIS HIS KINASE), AHK3 et AHK4/CRE1 (CYTOKININ RESPONSE 1). Ces trois protéines transmembranaires possèdent un domaine extracellulaire CHASE (Cyclase/His-kinase-Associated Sensing Extracellular) et un domaine intracellulaire scindé en deux motifs, l'un à activité kinase possédant des résidus conservés His et l'autre à motif «receveur» contenant un aspartate. Les protéines participant à cette signalisation directement en aval des protéines AHK sont codées par cinq gènes *AHP* (*ARABIDOPSIS HIS PHOSPHOTRANSFER PROTEIN*) numérotés de 1 à 5. Les cytokinines se fixent sur une des protéines AHK et activent l'autophosphorylation du résidu His. Le groupe phosphoryl est transmis au domaine receveur des AHK sur l'aspartate puis sur un résidu His conservé des protéines AHP. Les protéines AHP migrent dans le noyau et transfèrent le groupe phosphoryl à un résidu aspartate présent dans le domaine receveur des ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATORS (ARR) (**figure 3**).

Il existe 23 gènes *ARR* chez Arabidopsis répartis en trois groupes selon la séquence de leur domaine receveur. Les ARR de type A (A-ARR) comportent dix membres (ARR3-9 et ARR15-17), les ARR de type B (B-ARR) comptent onze membres (ARR1, ARR2, ARR10-14 et ARR18-21) et les ARR de type C (C-ARR) sont composés d'ARR22 et ARR24. Les A-ARR possèdent un domaine C-terminal plus petit que les autres et sont rapidement induits lors d'ajout de cytokinines. Le domaine C-terminal des B-ARR contient un domaine de liaison à l'ADN et un domaine de transactivation qui permettent la régulation des gènes induits par les cytokinines. Les C-ARR ne contiennent pas de domaine de liaison à l'ADN et ne sont pas induits par les cytokinines.

Les gènes *A-ARR* ont donc été identifiés par leur induction rapide suite à un traitement par les cytokinines. Des études génétiques ont montré qu'au moins huit des dix gènes *A-ARR* sont des effecteurs négatifs de la voie de signalisation des cytokinines et qu'ils exercent des fonctions redondantes. La phosphorylation du résidu aspartate des protéines A-ARR permet de les stabiliser et ainsi, leur permet d'établir une régulation par «feedback» négatif sur le signal cytokinique. En revanche, six des onze gènes *B-ARR* sont des régulateurs positifs de la réponse aux cytokinines. Ils induisent, entre autres, l'expression des gènes *A-ARR*. Cependant, il apparait que chacune de ces protéines peut avoir des cibles distinctes. Parmi les cibles activées transcriptionnellement par les protéines B-ARR, il y a les gènes codant les CRF (CYTOKININ RESPONSE FACTORS). Cette famille est composée de six gènes (CRF1-6) appartenant à la famille de facteurs de transcription «APETALA2-like» et au moins trois de ces gènes sont induits par les cytokinines d'une manière dépendante des protéines B-ARR. Les protéines CRF sont nucléaires et leur accumulation dans le noyau est dépendante de la présence des cytokinines et des protéines AHK et AHP mais indépendante de la présence des protéines ARR. Les protéines CRF semblent avoir une fonction redondante avec les protéines B-ARR car deux tiers des gènes dont l'expression est altérée chez les mutants *crf* ont des modifications d'expression dans le mutant *arr1,12* (To and Kieber 2008).

2. Les auxines.

Les travaux de Skoog et Miller (1957), étudiant la multiplication végétative du tabac, ont permis de mettre au point le premier milieu de base pour la culture *in vitro* (Skoog and Miller 1957). Dans ce milieu, deux phytohormones, l'auxine et les cytokinines, sont des éléments essentiels pour l'organogenèse et la régénération de nouveaux individus *in vitro.* En effet, ils ont permis de montrer qu'une balance précise entre l'auxine et les cytokinines permet d'orienter une cellule vers un devenir indifférencié (mélange équimolaire d'auxine et de cytokinines) ou vers un devenir différencié où les cellules serviront soit à la régénération de parties aériennes de la plante (concentration en cytokinines > concentration en auxine), soit

à la régénération des racines (concentration en cytokinines < concentration en auxine). Ces éléments conduisent au fait que l'auxine possède un rôle central dans le développement de la plante. La voie de signalisation de l'auxine est complexe et régulée à de multiples niveaux. En effet, sa concentration est contrôlée à diverses étapes notamment au niveau de sa biosynthèse, de son transport, de sa perception et au cours de la voie de signalisation. La molécule d'auxine la plus répandue dans le règne végétal est l'acide 3-indole acétique (AIA). Elle est impliquée dans la dominance apicale, la phyllotaxie, l'initiation des organes latéraux, le tropisme, l'élongation de la tige et l'activation des divisions cellulaires dans les cellules du cambium.

Métabolisme.

La biosynthèse de l'auxine est complexe car il existe cinq voies différentes menant à la production *de novo* des auxines, quatre dépendantes du tryptophane et une indépendante du tryptophane.

Les premières avancées sur la découverte des voies de biosynthèse de l'auxine proviennent de l'étude de pathogènes de plantes utilisant l'auxine pour détourner les éléments nécessaires à sa croissance. Ainsi, les espèces des genres Pseudomonas et Agrobacterium utilisent une tryptophane-2-monooxygénase, iaaM, pour convertir le tryptophane en indole-3-acétamide (IAM) qui sera hydrolysé en AIA par une hydrolase, iaaH. Cette voie est entièrement dépendante du tryptophane mais elle ne semble pas être utilisée chez les plantes. Cependant, la molécule IAM a été isolée d'extraits de plante et a été suggérée comme étant un intermédiaire dans la conversion d'indole-3-acétaldoxime (IAOx) en AIA. Les analyses génétiques chez Arabidopsis ont conduit à l'identification de trois voies. La voie «IAOx et glucosinate» aboutit à la formation d'AIA et de glucosinate indolique par l'intermédiaire de IAOx. La molécule IAM semble être un intermédiaire important dans cette voie mais les enzymes convertissant IAOx en IAM ne sont pas encore connues. La deuxième voie est la voie «TAM» faisant intervenir les gènes *YUCCA*. Cette famille de gènes comprend onze membres codant des enzymes qui, pour certaines, possèdent des fonctions redondantes. Le substrat des enzymes YUCCA est la tryptamine (TAM) qui sera transformée, à son tour, en IAOx. Enfin, la dernière voie à citer ici, est la voie IPA (indole-3-pyruvate). Une enzyme tryptophane aminotransférase, TAA1, convertit le tryptophane en IPA qui sera converti en AIA par le biais d'autres intermédiaires (Zhao 2010). La voie indépendante du tryptophane se branche en amont du tryptophane, au niveau d'un précurseur indole-3-glycérol phosphate ou indole (**figure 4**).

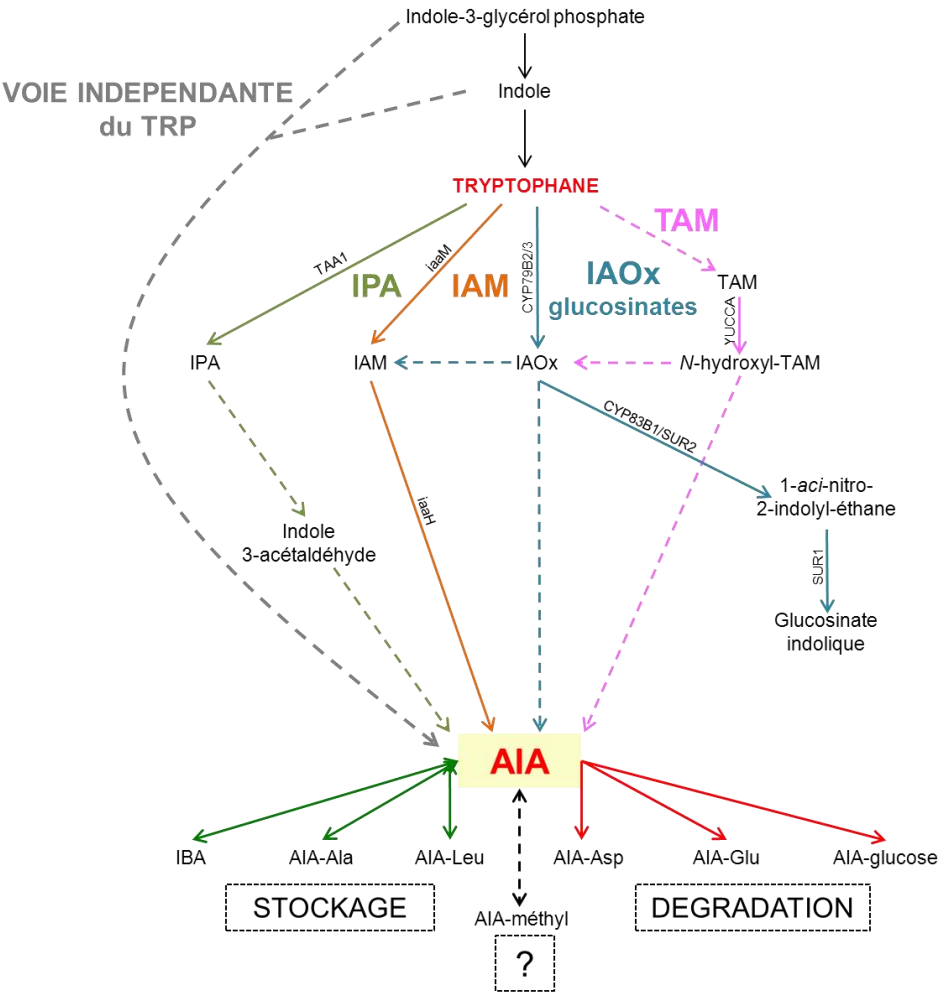


Figure 4: Voies de biosynthèse de l'acide 3-indole acétique (AIA) chez les plantes et les microorganismes ainsi que les différents modes de conjugaison (d'après *Woodwark et al., 2005* et *Zhao, 2010*).

Les flèches pleines représentent les étapes de la voie de synthèse dont les enzymes sont connues alors que les flèches en pointillés représentent des étapes dont les enzymes ne sont pas encore identifiées. La voie indépendante du tryptophane (TRP) est représentée en *gris* alors que la voie bactérienne IAM est en *orange*.

La voie «IAOx et glucosinates» (*bleu*) fait intervenir trois enzymes connues. Ainsi, deux isoformes des cytochromes P450 monooxygénases (CYP79B2 et CYP79B3) oxydent le tryptophane en IAOx alors que la cytochrome P450 monooxygénase, CYP83B1, codé par le gène *SUR2* (*SUPERROOT2*) synthétise la molécule de 1-*aci*-nitro-2-indolyl-éthane transformée par SUR1 en glucosinolate indolique.

La voie TAM (*rose*) fait intervenir une tryptophane décarboxylase qui convertit le tryptophane en tryptamine (TAM). Puis, les enzymes YUCCA, qui portent une activité flavine monooxygénase convertissent, vraisemblablement, la tryptamine en *N*-hydroxyl tryptamine qui deviendra l'acide 3-indole acétique par l'intermédiaire IAOx ou d'autres intermédiaires.

La voie IPA (*vert*) est composée d'une enzyme tryptophane aminotransférase, TAA1, qui convertit le tryptophane en IPA. Puis, l'IPA décarboxylase catalyse la conversion de l'IPA en indole-3-acétaldéhyde qui sera lui-même transformé en AIA.

La conjugaison de l'AIA à l'alanine (Ala) et à la leucine (Leu) ainsi que l'acide 3-indole butyrique (IBA) sont des molécules pouvant libérer de l'AIA et servent au stockage de l'AIA alors que la conjugaison de l'AIA à l'aspartate (Asp), au glutamate (Glu) et au glucose n'est pas réversible et représentent des intermédiaires de dégradation de l'AIA.

Peu de choses sont connues sur les enzymes participant à cette voie, en revanche, il apparaît que la voie indépendante du tryptophane tient un rôle très important dans la croissance en conditions normales de la plante. Une des hypothèses est que la plante favorise les voies de synthèse de l'auxine dépendantes du tryptophane lorsqu'elle est blessée et qu'elle a besoin d'une forte quantité d'auxine (Woodward and Bartel 2005).

L'AIA peut se trouver dans la cellule sous la forme d'acide indole-3-butyrique (IBA) qui peut redonner la molécule active d'AIA par β-oxydation. L'AIA peut également être lié par une liaison ester à des molécules de sucre ou par une liaison amide à un acide aminé et être libéré par hydrolyse. Ainsi, chez *Arabidopsis thaliana*, le contenu cellulaire en auxine se décompose en AIA conjugué aux acides aminés (~90%), conjugué à des sucres (~10%) et en AIA libre (~1%). Ces formes conjuguées d'AIA ont divers rôles, stockage, transport, compartimentation et détoxification d'un excès d'AIA. Les rôles vont être spécifiques selon la forme conjuguée (**figure 4**). En effet, certaines formes conjuguées actives dans la signalisation auxinique vont avoir un rôle de stockage notamment lors de la germination alors que d'autres, inactives dans cette signalisation, serviront d'intermédiaires de dégradation. Les formes conjuguées à des acides aminés se décomposent également en deux groupes. Le premier groupe composé d'AIA-Ala (alanine) et d'AIA-Leu (leucine), comporte des formes de stockage capables d'être actives et d'être hydrolysées par une aminohydrolase relâchant l'AIA libre. L'AIA-Ala est très présente dans les méristèmes apicaux alors que l'AIA-Leu est plutôt localisée au niveau des racines. Au contraire, le deuxième groupe, constitué d'AIA-Asp (aspartate) et d'AIA-Glu (glutamate) ne peuvent être hydrolysés et n'ont aucun rôle physiologique encore démontré à ce jour, ce qui suggère un rôle d'intermédiaire de dégradation (Woodward and Bartel 2005).

Chez Arabidopsis, l'inactivation permanente des molécules d'AIA fait intervenir une «ring» oxydation donnant une molécule d'oxAIA pouvant être conjuguée à un hexose. Ainsi, la liaison d'AIA aux acides aminés aspartate, glutamate et glutamine ainsi qu'au glucose conduit à l'inactivation de cette molécule. Il existe aussi une méthylation de la chaîne latérale carboxyl de l'AIA par une carboxyl méthyltransférase (IAMT1) susceptible d'augmenter la volatilité de l'AIA mais aucun rôle connu de cette forme n'a été mis en évidence (Woodward and Bartel 2005).

Transport.

Bien que l'AIA puisse être synthétisé dans de nombreux tissus, le transport de l'auxine est complexe et finement régulé. L'auxine a été découverte au niveau du méristème apical laissant penser à une forte production dans cette structure. En effet, il apparaît que l'auxine est accumulée dans les territoires présomptifs des primordia de feuilles dans le méristème apical.

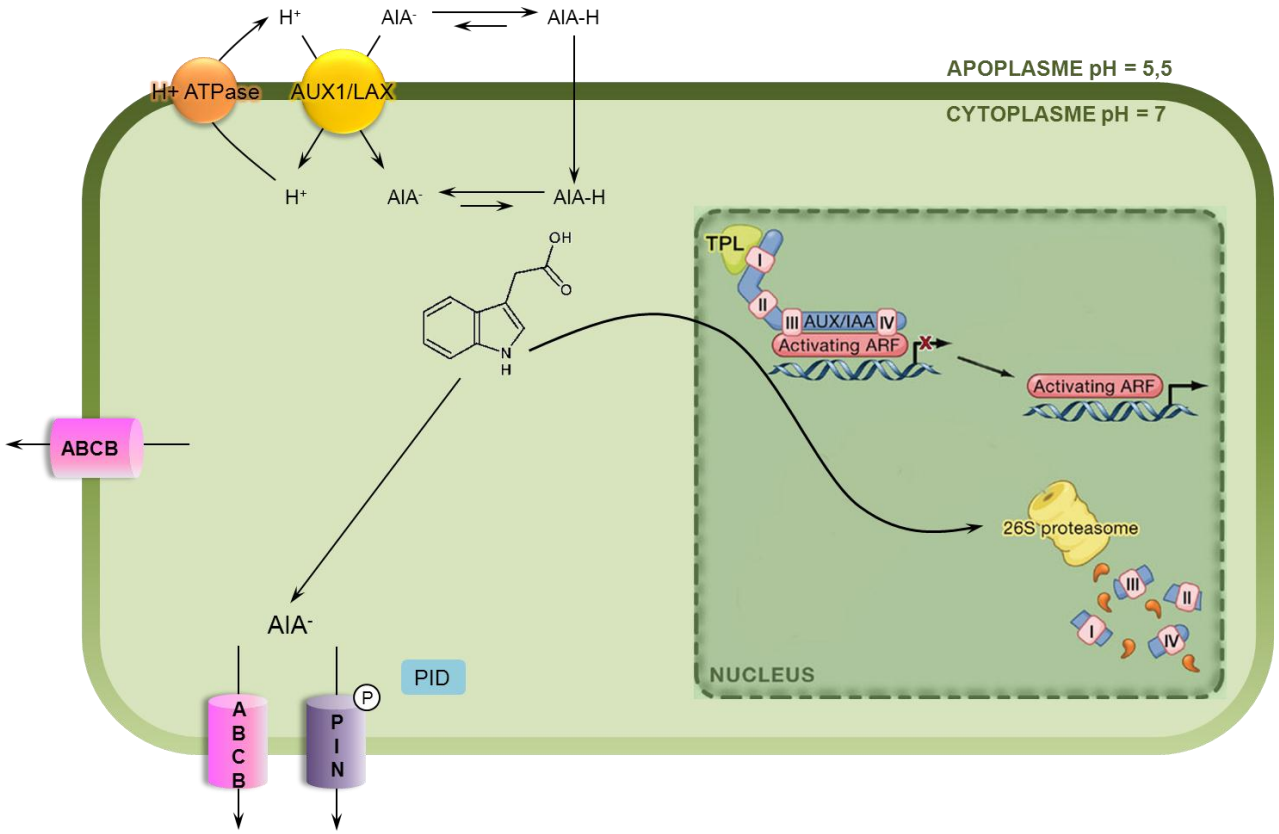


Figure 5: Transport polaire de l'auxine et signalisation auxinique dans la cellule (d'après *Vanneste and Friml, 2009*).

L'auxine traverse la membrane plasmique soit de manière passive car elle peut être protonée dans l'apoplasme (AIA-H), soit de manière active *via* un symport effectué par les protéines AUX1/LAX. Les protons sont exportés de la cellule grâce à l'action d'une pompe à protons ATP-dépendante (H+ ATPase). Dans la cellule, l'auxine est uniquement sous la forme AIA^- et ne peut être exportée que par l'action de transporteurs: les transporteurs ABCB et les transporteurs PIN. Les protéines PIN permettent un flux unidirectionnel de l'auxine et sont positionnés de manière précise grâce à l'action de la protéine à activité kinase, PINOID (PID).

En absence d'auxine, les protéines Aux/IAA interagissent avec les protéines ARF au niveau de leurs domaines communs III et IV et empêchent ainsi l'activation des gènes de réponse à l'auxine grâce à l'action du domaine répresseur I, potentiellement aidé du co-répresseur TOPLESS (TPL). Lorsque l'auxine pénètre dans la cellule, elle permet d'entraîner la dégradation des protéines Aux/IAA par le protéasome 26S et de libérer les protéines ARF engendrant ainsi l'activation des gènes de réponse à l'auxine.

Une caractéristique spécifique de l'auxine est sa capacité à migrer entre les cellules d'une manière directionnelle. Ainsi, dans les méristèmes apicaux, l'AIA est transportée de façon basipète (de l'apex vers la base) alors qu'au niveau des racines, dans le cylindre central, il y a un transport acropète et dans l'épiderme, un transport basipète (Woodward and Bartel 2005). Ce processus de distribution de l'auxine de manière directionnelle est crucial pour le développement de la plante. Il existe deux grandes voies participant à la distribution de l'auxine. La première est rapide et permet un transport longue-distance entre les tissus-sources et les tissus-puits. En général, les tissus-sources sont les tissus jeunes en formation au niveau du méristème, la distribution s'effectue grâce au phloème de manière passive afin de décharger l'auxine dans les tissus-puits.

La deuxième voie de distribution de l'auxine est plus lente et concerne des trajets plus courts, de cellule à cellule en faisant intervenir des protéines de transport. Cette voie de transport est polarisée et strictement contrôlée. Les auxines sont des acides faibles et sont, en partie, protonées (environ 15%) dans l'apoplasme. Ce phénomène les rend particulièrement lipophiles, ce qui leur permet de traverser passivement la membrane plasmique (**figure 5**). Lorsque les molécules d'auxine sont dans le milieu cytoplasmique neutre, elles sont déprotonées et se trouvent piégées dans le milieu intracellulaire. Cependant, pour faciliter l'entrée de l'auxine dans la cellule, il existe un transport actif assuré par des transporteurs d'influx codés par la famille de gènes *AUX1/LAX* composée de quatre membres. *AUX1* code une protéine assimilée à une perméase spécifique des acides aminés qui agit comme un symport H^+/AIA^- (**figure 5**). Pour sortir de la cellule, l'auxine doit être prise en charge par des transporteurs d'efflux représentés par deux familles de gènes. La famille des transporteurs ABCB est composée de glycoprotéines qui contiennent une cassette de fixation de l'ATP (ATP Binding Cassette). Cette famille de transporteurs n'est pas positionnée de façon directionnelle dans la cellule et permet sûrement de contrôler la quantité d'auxine disponible (**figure 5**). Il existe une deuxième famille de transporteurs codée par les gènes *PIN,* d'après le nom d'un des membres les plus importants, *PIN-FORMED 1*. Il s'agit de protéines transmembranaires avec une topologie prédite comme étant caractéristique des transporteurs. Les protéines PIN montrent une distribution cellulaire polaire coïncidant avec la direction connue du flux auxinique. En réalité, les protéines PIN sont les transporteurs essentiels à la distribution vectorielle de l'auxine et à l'établissement du gradient auxinique, élément capital pour l'acquisition du plan de développement de la plante. De plus, la protéine Ser/Thr kinase PINOID (PID) régule la distribution apico-basale des protéines PIN en les phosphorylant (**figure 5**). La localisation subcellulaire des protéines PIN est très dynamique puisqu'elles subissent des cycles d'endocytose «clathrine-dépendante» permettant une redistribution rapide (Vanneste and Friml 2009).

Transduction du signal.

Le système de perception de l'auxine fait intervenir deux voies indépendantes, une voie impliquant un récepteur membranaire, et une voie nucléaire «protéasome-dépendante». Cette dernière fait intervenir le plus caractérisé des récepteurs, TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1 (TIR1) et ses homologues AFB (Auxin-signaling F-box), des protéines à F-box qui, lorsqu'elles fixent une molécule d'auxine, ont la propriété de s'associer aux complexes E3 ubiquines-ligases eux-mêmes liés à la voie protéolytique du protéasome (Gray, et al. 2001). Nous aborderons ces aspects concernant cette voie et le lien avec la machinerie protéolytique dans le **paragraphe III.2** de l'introduction. La première voie fait intervenir une protéine caractérisée comme un récepteur membranaire, la protéine ABP1 (Auxin Binding Protein 1) dont les caractéristiques ont été listées par Tromas *et al*., 2010. La protéine ABP1 a été initialement purifiée à partir de fractions de membranes plasmiques et de réticulum endoplasmique (RE), issues de jeunes plantules de maïs. De façon intéressante, la composition peptidique de la protéine ABP1 la classe dans la catégorie des protéines solubles puisqu'elle ne contient aucune région hydrophobe permettant son ancrage à la membrane mais elle possède la capacité de fixer les molécules d'auxine, la désignant comme un récepteur de l'auxine. La recherche de protéines interactrices permettant d'ancrer ABP1 à la membrane a conduit à l'identification de la protéine CBP1 (C-terminal peptide-Binding Protein 1) chez le maïs. La protéine CBP1 est une protéine à ancre GPI (glycosylphosphatidylinositol) qui se fixe à la portion C-terminale de la protéine ABP1 qui contient le motif de rétention dans le RE (KDEL). Ainsi, le modèle proposé est que la protéine CBP1 fixe la protéine ABP1 dans le RE, masquant le motif de rétention dans le RE de la protéine ABP1. Le transport vésiculaire se charge d'acheminer le complexe ABP1-CBP1 à la surface externe de la membrane plasmique. Cependant, l'interaction entre les protéines ABP1 et CBP1 n'a pas encore été démontrée *in planta* et l'intervention d'un troisième partenaire impliqué dans le maintien d'ABP1 au niveau de la membrane plasmique n'est pas exclue. Les évènements identifiés qui résultent de la fixation de l'auxine par le récepteur ABP1 concernent l'activation d'une pompe à protons ATPasique et de canaux ioniques impliqués dans l'import de potassium au sein de la membrane plasmique. Ces évènements sont intrinsèquement liés aux phénomènes d'expansion cellulaire. En effet, l'acidification de l'apoplasme entraîne l'activation de protéines impliquées dans l'expansion de la paroi cellulaire et la modification du niveau de protonation de l'auxine, alors que l'importation d'ions potassiums diminue le potentiel hydrique de la cellule favorisant l'entrée d'eau indispensable à l'expansion cellulaire. D'autres processus physiologiques nécessitent la présence d'ABP1 mais les acteurs de la voie de signalisation en aval de la protéine ABP1 ne sont pas encore identifiés. Cependant, bien que les protéines ABP1 et TIR1 soient dans des compartiments cellulaires différents, elles ont toutes les deux la capacité à fixer l'auxine

et à agir sur les effecteurs de la réponse à l'auxine suggérant une interconnection possible entre ces deux voies (Tromas, et al. 2010).

Il existe deux classes d'effecteurs auxiniques qui agissent en tant que régulateurs transcriptionnels, les Aux/IAA (AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID) et les ARF (AUXIN RESPONSE FACTOR). Les Aux/IAA ont été identifiés comme étant des gènes régulés par l'auxine chez le pois et le soja. En effet, l'expression de ces gènes augmente très rapidement après un traitement auxinique et participent à la réponse «primaire» à l'auxine. Il existe 29 gènes codant des Aux/IAA chez Arabidopsis qui possèdent des fonctions redondantes. Lorsque ces gènes sont mutés, les plantes deviennent insensibles à l'auxine et les protéines codées par ces gènes deviennent plus stables suggérant que ces protéines agissent comme des répresseurs empêchant une réponse normale en présence d'auxine. Les protéines Aux/IAA sont des protéines nucléaires et possèdent quatre domaines relativement conservés. Le domaine I est un domaine répresseur capable d'agir seul ou en collaboration avec un co-répresseur transcriptionnel tel que TOPLESS (TPL) dont l'action a été identifiée au cours du développement embryonnaire. Le domaine II, constitué de 17 acides aminés, est responsable de la dégradation des Aux/IAA de manière auxine-dépendante. Les domaines III et IV partagent de fortes homologies de séquence avec les protéines ARF et servent à l'hétérodimérisation des Aux/IAA avec les ARF. En effet, les Aux/IAA ne sont pas capables de se fixer à l'ADN et ils exercent leur action inhibitrice en fixant les ARF qui sont des facteurs capables de se fixer à l'ADN (**figure 5**) (Calderon-Villalobos, et al. 2010).

Les protéines ARF sont des régulateurs transcriptionnels des gènes de réponse à l'auxine car elles reconnaissent une séquence spécifique dans les promoteurs, la séquence TGTCTC nommée AuxRE (Auxin Responsive Elements). Les facteurs de transcription ARF possèdent également quatre domaines dont deux fortement homologues aux domaines des Aux/IAA à l'extrémité C-terminale. A l'extrémité N-terminale, ils possèdent un domaine de liaison à l'ADN de type B3, le DBD (DNA binding domain) suivi d'un domaine variable II qui fonctionne soit comme un domaine activateur, soit comme un domaine inhibiteur. Le rôle activateur ou inhibiteur de ce domaine II est dépendant de sa composition peptidique. Ainsi, les domaines à fonction activatrice sont enrichis en glutamine, sérine et leucine alors que les domaines à fonction inhibitrice sont composés de sérine, proline, leucine et glycine. Chez Arabidopsis, il existe 23 gènes codant des ARF dont le gène *ARF23* qui contient un codon stop dans la séquence du DBD et dont le produit pourrait exercer un effet négatif par dimérisation avec les autres ARF. Il apparaît que cinq ARF fonctionneraient en tant qu'activateurs transcriptionnels et les autres ARF seraient des répresseurs transcriptionnels. Cependant, ces données ont été obtenues dans des protoplastes de mésophylle de feuille et

ne reflètent peut-être pas le rôle de chaque protéine ARF qui sont exprimées dans des tissus différents *in vivo*. De plus, toutes les protéines ARF sauf ARF3, ARF13 et ARF17 possèdent les domaines III et IV responsables de la dimérisation avec les Aux/IAA (Guilfoyle and Hagen 2007). L'interaction entre les Aux/IAA et les ARF est assez complexe, certainement à cause du grand nombre de combinaisons d'interactions possibles et les évènements transcriptionnels qui découlent de la perception de l'auxine sont encore assez mal connus. Cependant, le mécanisme régulant l'interaction des protéines Aux/IAA avec les protéines ARF est bien caractérisé. En absence d'auxine, les protéines Aux/IAA et les protéines ARF interagissent et cette interaction empêche la fixation des facteurs de transcription ARF sur les gènes de réponse à l'auxine. En présence d'auxine, les protéines Aux/IAA sont ciblées pour être dégradées par le complexe protéasome selon un mécanisme précis et décrit au cours du **paragraphe III.2**. Cette dégradation des protéines Aux/IAA a pour effet de libérer les protéines ARF qui pourront alors se fixer sur les promoteurs des gènes de réponse à l'auxine (**figure 5**). Parmi ces gènes, il y a les gènes Aux/IAA dont les promoteurs contiennent les séquences AuxRE, permettant d'assurer une boucle de rétrocontrôle négatif (Calderon-Villalobos, et al. 2010).

3. Les gibbérellines.

Cette classe de phytohormones a été découverte en 1938 lors de l'isolement d'un champignon pathogène, *Gibberella fujikuroi*, qui provoque sur des plants de riz une élongation de la tige conduisant à la verse des cultures. Lors de la «Révolution verte» dans les années 1960-1970, des nouvelles variétés de riz ont été adoptées, caractérisées par une tige courte. Ces variétés résultent de mutations dans les gènes de biosynthèse des gibbérellines et permettent ainsi une mobilisation des ressources de la plante pour la production de grains. Les gibbérellines sont impliquées dans le développement de la graine, l'élongation des organes et le contrôle de la floraison (Santner, et al. 2009).

Métabolisme.

Il existe une centaine de molécules de gibbérellines (GA) chez les plantes. Cependant seul un petit nombre de ces molécules sont biologiquement actives. Les autres isoformes de GA peuvent être des précurseurs des formes actives ou des formes inactives. Les gibbérellines sont des diterpènes tétracycliques synthétisées à partir de géranylgéranyl diphosphate (GGDP), un précurseur à 20 atomes de carbone (C_{20}) de la classe des diterpénoïdes. Les quatre formes biologiquement actives prédominantes sont GA_1, GA_3, GA_4 et GA_7. La molécule GA_1 est la forme bioactive la plus répandue mais GA_4 semble être l'isoforme majoritaire chez Arabidopsis.

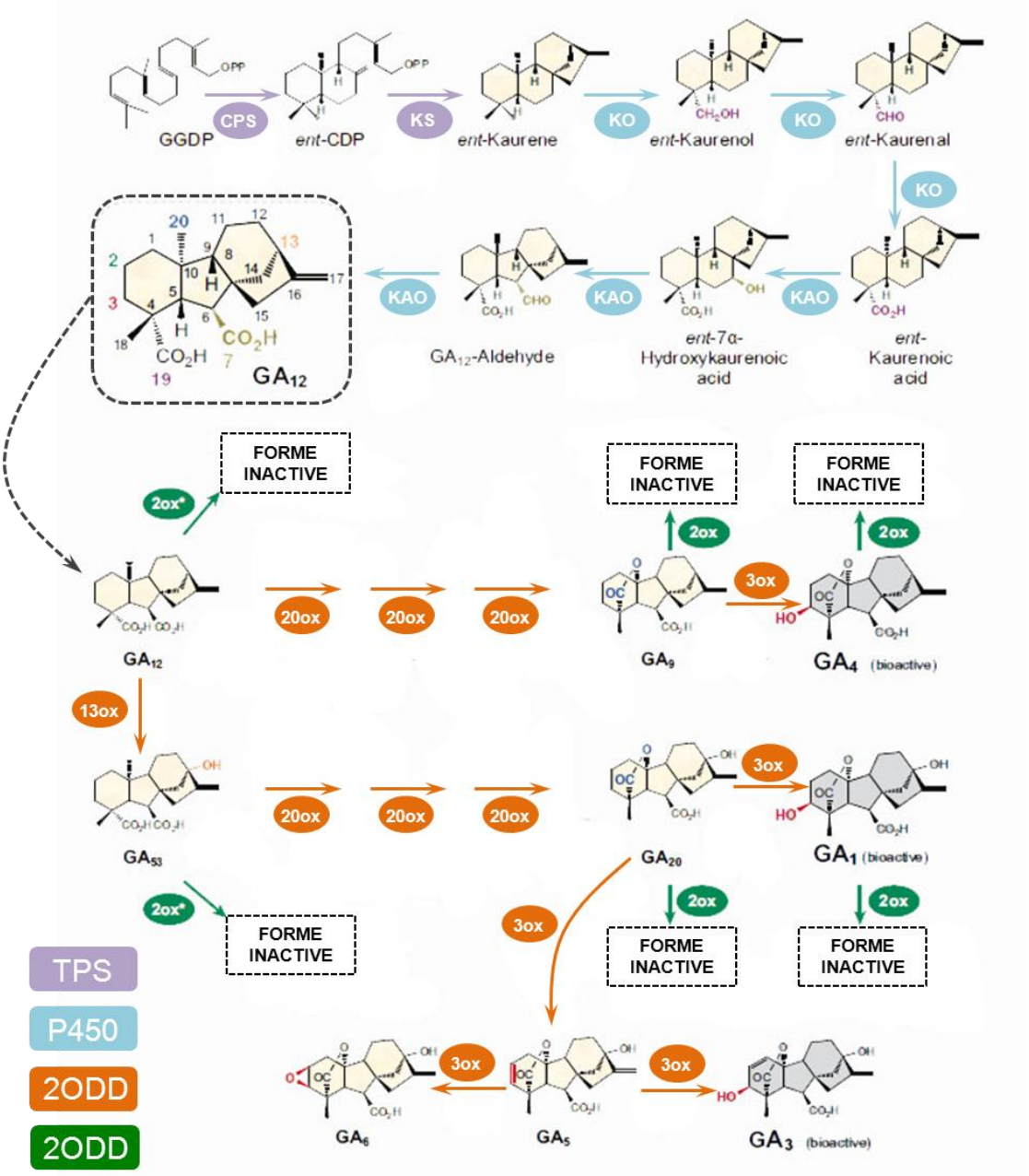


Figure 6: Voie de biosynthèse des gibbérellines (d'après *Yamaguchi, 2008*).

Les formes biologiquement actives, GA_1, GA_3, GA_4 et GA_7 ont en commun un groupe hydroxyl sur leur C3, un groupe carboxyl sur leur C6 et une lactone entre leur C4 et leur C10. Le groupe hydroxyl en C3 peut être remplacé par d'autres groupes entre le C2 et le C3 pour former les molécules GA_5 et GA_6 qui sont, elles aussi, biologiquement actives.

Deux enzymes TPS (*mauve*) sont nécessaires à la conversion du GGDP en *ent*-kaurène, un intermédiaire hydrocarboné tétracyclique. La première enzyme TPS est l'*ent*-copalyl diphosphate synthase (CPS) et la seconde, l'*ent*-kaurène synthase (KS). Ensuite, deux enzymes P450 (*bleu*) interviennent. L'enzyme CYP701A ou *ent*-kaurène oxydase (KO) va produire l'acide *ent*-kaurénoïque et l'enzyme CYP88A ou l'acide *ent*-kaurénoïque oxydase (KAO) va produire la molécule GA_{12}.

A partir du GA_{12}, toutes les formes bioactives peuvent être synthétisées grâce à l'action des enzymes 2-oxoglutarate-dépendante dioxygénases (2ODD *orange*) et notamment la GA20ox (20ox), la GA3ox (3ox) et la GA13ox (13ox).

Cependant, d'autres enzymes 2ODD (*vert*) servent à l'inactivation des molécules bioactives, c'est le cas de la GA2ox (2ox).

Trois classes d'enzymes sont nécessaires à la synthèse des isoformes bioactives des gibbérellines à partir du GGDP, des terpènes synthases (TPS), des cytochromes P450 monooxygénases (P450) et des enzymes 2-oxoglutarate-dépendante dioxygénases (2ODD). Deux enzymes TPS interviennent pour transformer le GGDP en *ent*-kaurène. Ces deux enzymes TPS sont localisées dans les plastes et catalysent chacune une réaction. La molécule, *ent*-kaurène, va ensuite être transformée en GA_{12} par les deux enzymes P450 qui vont catalysées trois réactions d'oxydation chacune. Une des enzymes P450 (KO) est présente dans la membrane externe des plastes alors que l'autre enzyme (KAO) est localisée dans le réticulum endoplasmique. La molécule GA_{12} est le point initial qui servira à la formation de trois des formes bioactives, GA_1, GA_3 et GA_4. Trois enzymes participent à la transformation de GA_{12} en GA_1, GA_3 et GA_4, la GA 20-oxydase (GA20ox) et la GA 3-oxydase (GA3ox) qui appartiennent à la classe des enzymes 2ODD. Ces enzymes sont supposées être cytosoliques car elles ne possèdent pas de séquence ciblant un compartiment de façon préférentielle. Une troisième enzyme 2ODD réalise la transformation de GA_{12} en GA_{53}, la GA 13-oxydase (GA13ox), afin de produire l'isoforme GA_1 (**figure 6**).

Comme pour les cytokinines et l'auxine, le fait de désactiver ou de dégrader les gibbérellines est très important pour réguler finement la concentration de ces hormones. La plus importante réaction de désactivation des molécules de gibbérellines est assurée par une enzyme de la classe des 2ODD, la GA 2-oxydase (GA2ox) qui hydroxyle les molécules bioactives GA_1 et GA_4 et leurs précurseurs directs, GA_9 et GA_{20}. Plus récemment, une autre enzyme GA2ox qui hydroxyle spécifiquement les premiers précurseurs à savoir GA_{12} et GA_{53} a été mise en évidence (**figure 6**). Par ailleurs, il existe trois enzymes qui inactivent les molécules bioactives de GA. L'enzyme EUI (Elongated Uppermost Internode) ou CYP714D1 transforme la double liaison entre le carbone 16 et le carbone 17 des molécules non hydroxylées en C13, ceci concerne la molécule bioactive GA_4 ainsi que ses précurseurs GA_9 et GA_{12}. Chez Arabidopsis, deux enzymes ayant une activité méthyltransférase, GAMT1 et GAMT2, catalysent la méthylation du carbone 6 des GA. Ces enzymes, GAMT1 et GAMT2, utilisent une large gamme de substrats, des précurseurs jusqu'aux formes bioactives.

Enfin, les gibbérellines peuvent être conjuguées et notamment au glucose. Cette liaison s'effectue soit grâce à un groupement hydroxyl des GA pour former un éther GA-*O*-glucosyl, soit grâce à un groupement carboxyl qui formera un ester GA-glucosyl. Le rôle de cette conjugaison dans la cellule semble être d'inactiver les GA mais ceci reste à confirmer (Yamaguchi 2008).

Transduction du signal.

Comme pour l'auxine, la voie de signalisation des gibbérellines fait intervenir la voie dépendante du protéasome. Les gibbérellines sont fixées par un récepteur qui est une

protéine à F-box, SLEEPY1 (SLY1) pouvant se lier au complexe E3 ubiquitine-ligase afin de dégrader les répresseurs transcriptionnels de la réponse aux gibbérellines (Dill, et al. 2004).

Ces répresseurs transcriptionnels sont les protéines DELLA, du nom d'un des domaines de 17 acides aminés présent dans ces protéines. Il existe cinq protéines DELLA chez Arabidopsis, GAI (GA Insensitive), RGA (Repressor of *ga1-3*), RGL1 (RGA-like 1), RGL2 et RGL3. Ces protéines sont très conservées chez les plantes puisque le riz possède un orthologue des protéines DELLA, SLR1 (Slender Rice 1), ce qui suggère qu'elles partagent une fonction cellulaire et une régulation similaire. Ces protéines possèdent trois domaines caractéristiques, les domaines DELLA et VHYNP à l'extrémité N-terminale, et un domaine GRAS (GAI, RGA, SCARECROW) à l'extrémité C-terminale. Lorsque les protéines sont déficientes dans des mutants perte-de-fonction, les plantes présentent un phénotype correspondant à une «overdose de gibbérellines»; elles sont plus grandes que les plantes sauvages et elles fleurissent de manière précoce. A l'inverse, des mutants gain-de-fonction des protéines DELLA entraînent un nanisme de la plante qui fleurit tardivement y compris en présence de gibbérellines. Il est important de noter que les mutations gain-de-fonction concernent des acides aminés dans le domaine DELLA. Ces éléments indiquent que ces protéines sont des effecteurs négatifs de la réponse aux gibbérellines et nécessitent donc d'être inactivés pour promouvoir cette réponse. *In fine*, la voie de réponse aux gibbérellines fait intervenir plusieurs étapes successives : 1) une répression de la transcription des enzymes de biosynthèse et une activation de la transcription des enzymes de dégradation des gibbérellines; 2) les gibbérellines entraînent la dégradation des protéines DELLA *via* le protéasome (**paragraphe III.2**) et dans un même temps activent la transcription des gènes codant les protéines DELLA; 3) une inhibition de la transcription des récepteurs aux gibbérellines (Schwechheimer 2008).

Les protéines DELLA sont des inhibiteurs transcriptionnels dont les cibles ne sont pas encore totalement identifiées. Cependant, de récentes études ont montré ce qui se produit dans la voie de signalisation aux GA, en aval des protéines DELLA. En fait, les protéines DELLA agissent de concert avec des effecteurs de la réponse à la lumière. En effet, l'élongation cellulaire lors de la croissance de la plantule est régulée de façon antagoniste par la lumière et les gibbérellines. La lumière provoque l'accumulation des protéines DELLA qui inhibent la croissance de l'hypocotyle permettant le phénomène de photomorphogenèse. A l'inverse, les gibbérellines provoquent une augmentation de la croissance des hypocotyles caractérisant le phénomène d'étiolement.

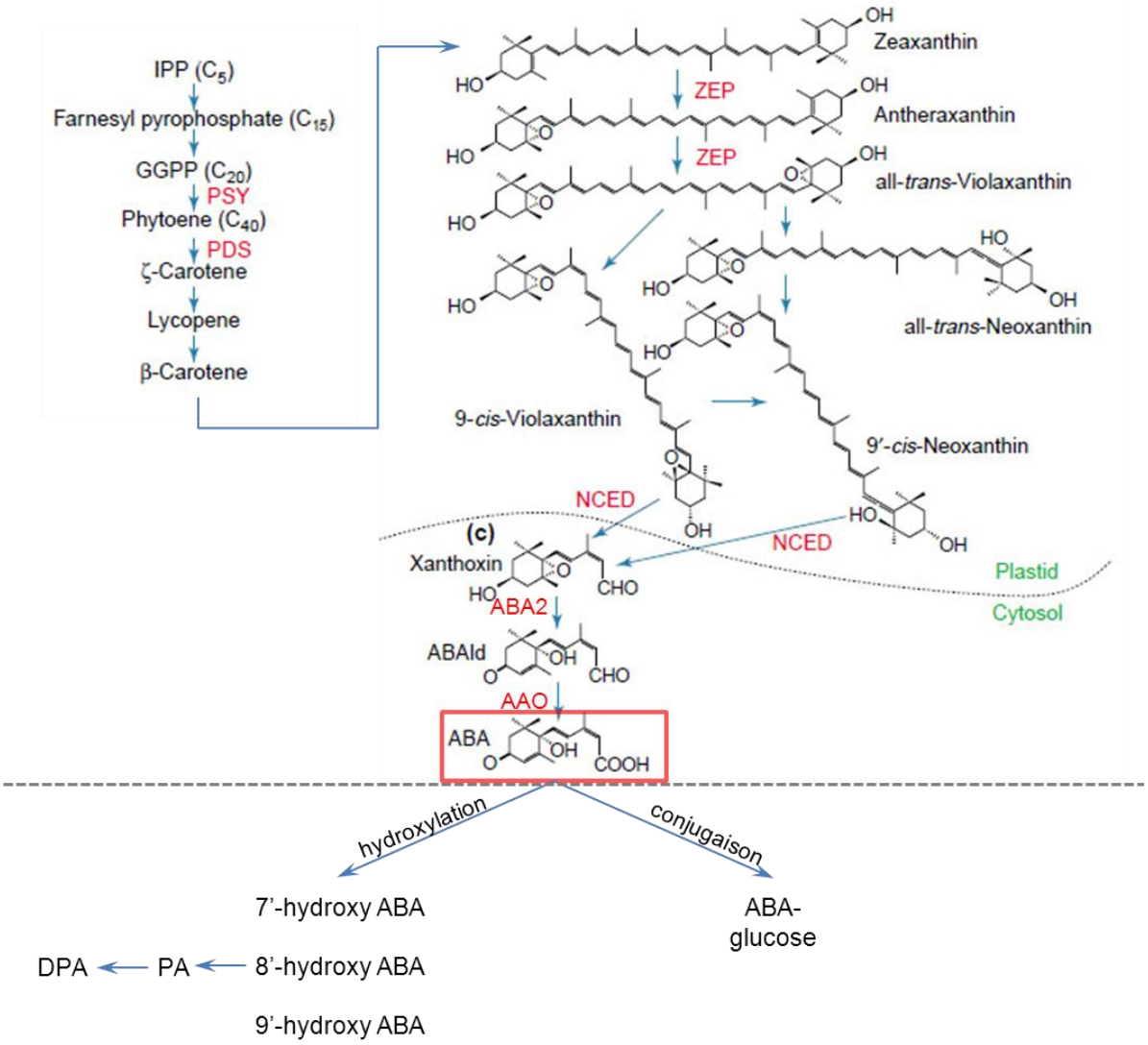


Figure 7: Voie de biosynthèse et modes d’inactivation de l’ABA (d’après *Seo et al., 2002* et *Nambara et al., 2005*).

La voie de biosynthèse des isoprénoïdes (en haut à gauche) va produire le β-carotène qui va servir de précurseur à la synthèse des xanthophylles: zéaxanthine, antheraxanthine et violaxanthine par l’action de l’enzyme zéaxanthine époxydase (ZEP).

En revanche, aucun gène n’a été identifié chez Arabidopsis pour permettre d’expliquer la transition de la violaxanthine à la néoxanthine même si deux néoxanthine synthase (NSY) putatives ont été isolées à partir de la tomate et de la pomme de terre. Le gène codant l’enzyme permettant l’isomérisation en *cis* de la néoxanthine n’a pas été identifié non plus. Par la suite, l’action des enzymes NCED (9-*cis*-époxycaroténoïde dioxygénase), ABA2 et AAO (abscissique aldéhyde oxydase) va permettre la formation d’ABA.

Les voies d’inactivation de l’ABA conduisent à la formation de formes hydroxylées. L’hydroxylation sur le carbone 8’ est réalisée par une des enzymes de la classe des cytochromes P450 monooxygénases (CYP707A) avant d’être spontanément isomérisée en acide phaséique (PA) puis en acide dihydrophaséique (DPA). Une autre voie d’inactivation correspond à la conjugaison à une molécule de glucose. Cette conjugaison s’effectue sur le carboxyl en C1 ou sur les groupements hydroxyles produisant des esters ABA-glucosyl par l’action d’une ABA glucosyltransférase (AOG).

PSY: phytoène synthase; PDS: phytoène désaturase.

Il a été montré que les protéines DELLA sont capables d'interagir avec des facteurs de transcription de type bHLH, (basic Helix-Loop-Helix) interagissant avec les phytochromes, les protéines PIF (PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR). Cette interaction s'effectue au niveau du domaine bHLH des protéines PIF, c'est-à-dire leur domaine d'interaction avec l'ADN, afin d'inhiber la transcription de certains gènes, tels que des gènes impliqués dans l'élongation de l'hypocotyle (de Lucas, et al. 2008; Feng, et al. 2008).

4. L'acide abscissique.

L'acide abscissique (ABA) est un régulateur important de la croissance et du développement de la plante, spécialement lorsque celle-ci est soumise à des conditions environnementales défavorables. Cette phytohormone participe à la maturation de la graine et peut prolonger la dormance de celle-ci si les conditions environnementales ne sont pas optimales pour initier la germination. De plus, l'ABA peut suspendre la croissance d'une jeune plantule si celle-ci subit un stress, afin de reprendre la croissance lorsque les conditions de croissance redeviennent favorables. L'ABA protège aussi les plantes matures contre divers stress extérieurs, une augmentation de la salinité des sols, le froid, la sécheresse et l'attaque de pathogènes, en induisant diverses réponses physiologiques (Stone, et al. 2006). Ainsi, les changements dans les voies de biosynthèse ou de catabolisme de l'acide abscissique sont très importants dans la régulation de la teneur de cette phytohormone.

Métabolisme.

L'ABA appartient à une classe des isoprénoïdes. Les isoprénoïdes dérivent d'une molécule à cinq atomes de carbone l'isopentenyl pyrophosphate (IPP) qui intervient aussi dans la biosynthèse des cytokinines. L'IPP peut dériver de deux voies, la voie du mévalonate (MVA), cytosolique, ou la voie MEP (2-C-méthyl-D-érythritol-4-phosphate) plastidiale. L'ABA contient quinze atomes de carbone qui pourrait correspondre dans la voie de biosynthèse des isoprénoïdes à un dérivé du farnesyl diphosphate, un composé en C15. Cependant, l'ABA semble être formé à partir du clivage d'une molécule en C40 dérivée des caroténoïdes et issue de la voie MEP.

Cette molécule dérivée du β-carotène est la zéaxanthine. La zéaxanthine va subir une première époxydation pour former l'antheraxanthine puis une seconde pour former la violaxanthine. Ces étapes sont réalisées par une zéaxanthine époxydase (ZEP) (**figure 7**). La violaxanthine est transformée en *cis*-violaxanthine et en *cis*-néoxanthine par des enzymes qui ne sont pas encore caractérisées. Cependant, une enzyme 9-*cis*-époxycaroténoïde dioxygénase (NCED) clive les isomères *cis* de violaxanthine et de néoxanthine pour former deux produits, l'un en C15 nommé xanthoxine et l'autre en C25 (**figure 7**).

Dans toutes les espèces de plantes analysées, les gènes NCED appartiennent à une famille multigénique; ainsi, chez Arabidopsis, neuf séquences de gènes apparentées à NCED ont été identifiées dont cinq semblent être impliquées dans la biosynthèse de l'ABA. Les enzymes NCED sont situées dans le chloroplaste, cependant les étapes suivantes de la biosynthèse de l'ABA sont cytosoliques, ce qui suggère une migration de la xanthoxine du plaste vers le cytosol. La *cis*-xanthoxine va être transformée en ABA en deux étapes. Tout d'abord, la *cis*-xanthoxine va former un aldéhyde abscissique par l'action de l'enzyme AtABA2 appartenant à une famille de déshydrogénases/réductases alcooliques. Puis l'aldéhyde abscissique va être oxydé pour donner l'acide carboxylique ABA, cette réaction étant catalysée par une abscissique aldéhyde oxydase (AAO) (**figure 7**). Parmi les quatre enzymes AAO présentes chez Arabidopsis, AAO3 semble posséder l'activité majoritaire dans la formation de l'ABA.

Comme pour les phytohormones vues précédemment, l'inactivation de l'ABA s'effectue selon deux grandes voies, l'hydroxylation et la conjugaison. Les cibles de l'hydroxylation sont les trois groupes méthyls présents sur la structure aromatique. Ces trois formes hydroxylées conservent une certaine activité métabolique mais elles restent des intermédiaires pour l'inactivation de l'ABA. A noter le 8'-hydroxy ABA qui est la forme de prédilection pour l'inactivation de l'ABA puisqu'il conduit à la formation des principaux catabolites, l'acide phaséique (PA) et l'acide dihydrophaséique (DPA). L'ABA et ses formes hydroxylées sont aussi inactivées par liaison à une molécule de glucose (**figure 7**). Ces molécules conjuguées, d'abord identifiées comme étant stockées dans la vacuole pour y être détruites, semblent peut-être avoir un rôle dans le transport de l'ABA. En outre, il existe une enzyme β-*D*-glucosidase capable d'hydrolyser la liaison ester reliant le glucose à l'ABA libérant ainsi la molécule active (Nambara and Marion-Poll 2005).

Transport intercellulaire de l'ABA.

La biosynthèse de l'ABA est la plus abondante dans les cellules compagnes du phloème et dans les cellules parenchymateuses du xylème des plantes en turgescence. Les tissus vasculaires sont le principal site de la synthèse de l'ABA chez les plantes non stressées. Dans ce cas également, l'ABA agit dans les processus d'ouverture/fermeture des stomates. Ainsi, l'ABA doit être transporté des tissus vasculaires jusqu'aux cellules de garde. Récemment, deux études ont mis en évidence des transporteurs de l'ABA, AtABCG25 (Kuromori, et al. 2010) et AtABCG40 (Kang, et al. 2010). Il s'agit de deux transporteurs possédant des motifs de fixation de l'ATP (ATP-binding cassette).

Le transporteur AtABCG25 est principalement présent dans les tissus vasculaires et est conservé chez de nombreuses espèces où il sert au transport de divers métabolites d'une manière dépendante de l'ATP. Le transporteur AtABCG40 est majoritairement présent dans les feuilles de jeunes plantules, tout particulièrement dans les cellules de garde, et dans les racines primaires et latérales. D'après ces études, AtABCG25 semble être un transporteur servant à l'export de l'ABA alors que le transporteur AtABCG40 apparaît comme un acteur dans l'import de l'ABA, ces processus s'effectuant au travers de la membrane plasmique. Ainsi, un premier modèle du transport de l'ABA a émergé, l'ABA est exporté des cellules des tissus vasculaires vers l'apoplasme des cellules de garde par AtABCG25 puis le transporteur AtABCG40 importe l'ABA de l'apoplasme dans le cytoplasme des cellules de garde afin de réguler l'ouverture des stomates.

Transduction du signal.

Jusqu'en 2009, les quelques éléments connus de la voie de réponse à l'ABA étaient des éléments indépendants qui ne pouvaient être associés les uns aux autres et semblaient agir dans des voies de transduction parallèles. La transduction du signal initié par l'ABA est complexe et implique de nombreuses protéines notamment deux protéines phosphatases 2C (PP2C), ABI1 et ABI2 (ABA Insensitive protein 1/2). Ces deux protéines appartiennent à un sous-groupe (A) de la famille des PP2C, qui contient neuf membres. Tous les mutants perte-de-fonction des PP2C de groupe A sont hypersensibles à l'ABA, ce qui suppose que ces protéines sont des effecteurs négatifs de la réponse à l'ABA. Ces protéines sont redondantes au niveau moléculaire mais leur distinction se fait au niveau de leur territoire d'expression et de leur localisation subcellulaire. En plus de ces protéines phosphatases, des protéines kinases ont aussi été identifiées comme intermédiaires dans la voie de signalisation de l'ABA. Les protéines «SNF1-related» kinases 2 (SnRK2) ont une action positive dans la transduction du signal abscissique. Il existe dix membres appartenant à cette famille chez Arabidopsis capables d'être activés par l'ABA ou par un stress hyperosmotique ou par les deux.

Enfin, certaines protéines ont été isolées grâce à leur capacité à se lier à la molécule d'ABA, c'est le cas de récepteurs couplés à la protéine G et d'une sous-unité H d'une chélatase de magnésium. Cependant leurs rôles respectifs et leurs liens avec les protéines PP2C et SnRK2 ne sont pas encore établis. En revanche, une nouvelle classe de protéines, PYR/PYL/RCAR, a été découverte et ces protéines solubles sont capables de se lier à l'ABA (Ma, et al. 2009; Park, et al. 2009). La protéine PYR (PYRABACTIN RESISTANCE 1) est capable de fixer un agoniste de l'ABA, la pyrabactine alors que la protéine RCAR1 (Regulatory Component of ABA Receptor 1) a été isolée à travers un criblage par la méthode de double-hybride pour identifier les protéines interactantes d'ABI1.

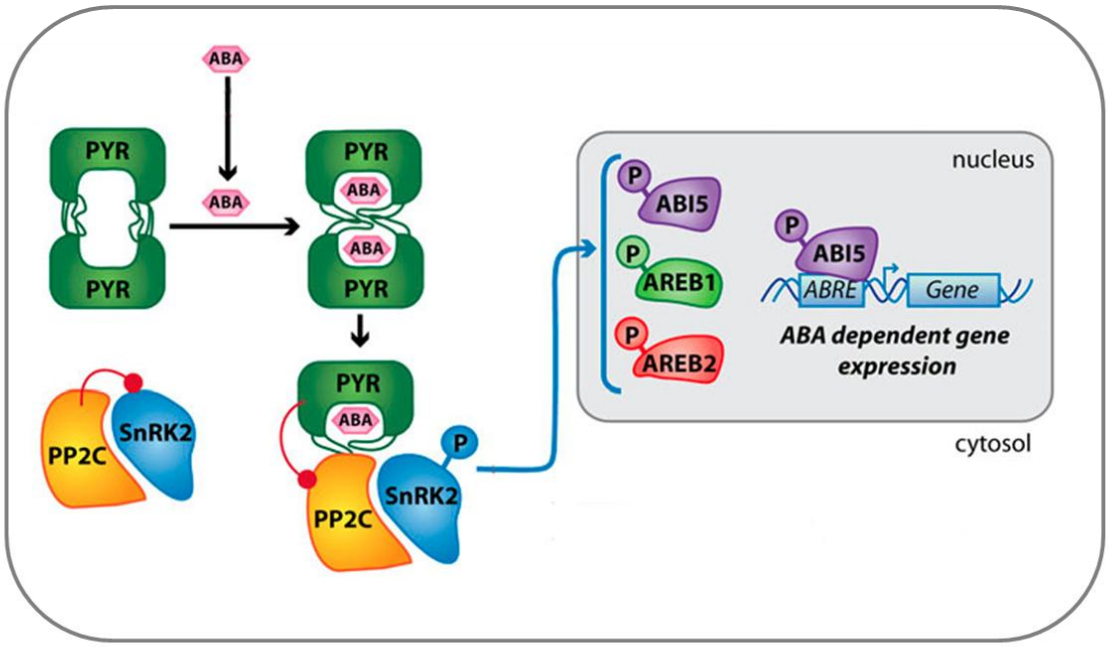


Figure 8: Voie de transduction du signal ABA, d'après (Hubbard, et al. 2010).

En absence d'ABA, les protéines phosphatases 2C (PP2C) déphosphorylent les protéines kinases SnRK2 et inhibent ainsi leurs activités kinases. En présence d'ABA, les protéines PYR/PYL/RCAR sont capables de se fixer aux protéines PP2C. Ainsi, les protéines PYR/PYL/RCAR inhibent l'activité phosphatase des PP2C et permettent aux protéines kinases d'être phosphorylées et de phosphoryler à leur tour, les facteurs de transcription ABF/AREB. Ces facteurs de transcription vont activés des gènes de réponse à l'ABA.

Ces deux protéines, PYR et RCAR1, appartiennent à une même famille de protéines possédant une cavité hydrophobe pour la fixation de ligands. Ces protéines sont codées par une famille de gènes contenant quatorze membres nommés *PYR1* et «*PYR1-like*» (*PYL*) *1-13* ou *RCAR1-RCAR14*. De façon intéressante, les protéines PYR/PYL/RCAR sont capables de se lier aux protéines PP2C de manière dépendante à l'ABA afin d'inhiber l'activité phosphatase des protéines PP2C, ce qui aura pour effet de lever l'inhibition qui était exercée sur la voie de réponse à l'ABA. En effet, l'ABA induit la phosphorylation de résidus sérine/thréonine dans le domaine catalytique des protéines kinases SnRK2 et il a été montré que les protéines PP2C déphosphorylent ces résidus et de ce fait, inactivent les protéines kinases SnRK2. Ainsi, le modèle établi est le suivant, les récepteurs de l'ABA, PYR/PYL/RCAR, désactivent l'inhibition dépendante des protéines PP2C qui est exercée sur les protéines kinases SnRK2 et, ce, en fonction de la présence d'ABA (Umezawa, et al. 2010) (**figure 8**).

Ces premiers éléments établissent une voie de signalisation et certaines des protéines régulées par cette voie ont été identifiées. En analysant les promoteurs des gènes induits par l'ABA, il a été souligné la présence d'éléments en *cis* notés ABRE (ABA-Responsive Elements). Ces séquences ABRE ont été utilisées pour des criblages simple hybride afin d'isoler les facteurs de transcription potentiels, les ABF/AREB (ABRE-binding factors). Les facteurs de transcription identifiés sont des protéines à domaine bZIP (basic leucine zipper) appartenant à une famille de neuf membres dont ABI5 qui tient un rôle très important durant la maturation de la graine. Ainsi, les facteurs de transcription ABF2, ABF3 et ABF4 sont induits lors de stress tels que la sécheresse et le stress salin ainsi que par la présence d'ABA. Ces facteurs de transcription ABF sont phosphorylés en présence d'ABA et cette phosphorylation est suffisante pour leur activation. De plus, une des protéines kinases SnRK2, est capable de phosphoryler les ABF *in vitro* (Umezawa, et al. 2010). D'autres facteurs de transcription sont impliqués dans la réponse à l'ABA, ABI3 qui contient le même domaine de fixation à l'ADN que les facteurs de transcription auxiniques ARF et ABI4 qui contient un domaine APETALA2 (Stone, et al. 2006).

Comme nous l'avons précédemment évoqué, d'autres phytohormones sont indispensables au développement de la plante. L'éthylène est une molécule gazeuse produite à partir de l'acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique (ACC), la production d'éthylène est limitée par l'activité des enzymes ACC synthases dont la stabilité est dépendante de l'éthylène lui-même. La production d'éthylène est spécifique de certains tissus et de certains stades de développement puisque cette phytohormone est impliquée dans des processus physiologiques spécifiques, tels que la maturation des fruits climactériques, la stimulation de la germination, l'accélération de la sénescence et l'activation de la mort cellulaire programmée. La voie de signalisation de l'éthylène fait intervenir des mécanismes déjà décrits pour les autres phytohormones. En effet, le système de perception de l'éthylène est constitué d'un système à «deux composantes» comme celui des cytokinines. Cinq récepteurs de l'éthylène sont identifiés chez Arabidopsis, ETR1 et 2 (ETHYLENE RESPONSE 1 et 2), ERS1 et 2 (ETHYLENE RESPONSE SENSOR 1 et 2) et EIN4 (ETHYLENE INSENSITIVE 4), localisés dans la membrane du RE. En absence d'éthylène, ces récepteurs interagissent avec la protéine CTR1 (CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE 1), une protéine MAP-kinase (MAPK pour Mitogen-Activated Protein Kinase) qui phosphoryle des éléments régulateurs positifs de la réponse à l'éthylène, tels que la protéine EIN2. La fixation de la molécule d'éthylène sur ces récepteurs nécessite la présence d'un co-facteur, le cuivre, et a pour effet d'inactiver la protéine CTR1, levant l'inhibition sur EIN2 et permettant une cascade d'évènements transcriptionnels initiée par la protéine EIN3 (Shan, et al. 2011; Wang and Irving 2011). L'implication de protéines à F-box dans la voie de signalisation de l'éthylène a été mise en évidence et sera abordée au **paragraphe III.3**.

La classe de phytohormones des brassinostéroïdes est composée, comme leur nom l'indique, de molécules stéroïdes de plantes, isolées initialement du pollen et ayant une activité positive sur la division et l'élongation cellulaire. Les récepteurs des brassinostéroïdes sont des protéines transmembranaires à domaine LRR possédant un domaine intracellulaire à activité kinase. Trois gènes codant ces récepteurs ont été identifiés chez Arabidopsis, *BRI1* (*BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1*), *BRL1* (*BRI1-LIKE 1*) et *BRL3*. La fixation de la molécule active, les brassinolides, sur ces récepteurs provoque la dissociation de la protéine BKI1 (BRI1 KINASE INHIBITOR 1) de la membrane plasmique et l'interaction de BRI1 avec les protéines BAK1 (BRI1-ASSOCIATED RECEPTOR KINASE 1) et SERK1 (SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1) entraînant une cascade de phosphorylations conduisant à l'activation de gènes de réponse aux brassinostéroïdes (Shan, et al. 2011; Wang and Irving 2011).

Les voies de signalisation aux phytohormones qui viennent d'être décrites nous montrent la complexité de ces réseaux et la nécessité, pour la cellule, de pouvoir intégrer ces différents signaux lorsqu'ils sont actifs de manière coordonnée. Par exemple, les gibbérellines, les auxines et les brassinostéroïdes participent à l'expansion cellulaire et régulent ainsi la taille des organes. Ces trois hormones agissent de manière synergique mais pas de manière redondante et un défaut de fonctionnement dans une de ces voies de signalisation ne peut être compensé par les deux autres. Ces diverses voies de signalisation peuvent aussi avoir des effets antagonistes. C'est le cas des auxines et des cytokinines dans la maintenance de l'activité méristématique (**paragraphe IV.2**) ainsi que des gibbérellines et brassinostéroïdes qui favorisent la croissance alors que l'acide abscissique l'inhibe. Ces exemples illustrent la complexité de la régulation par ces diverses phytohormones sur les processus de croissance et d'organogenèse. De plus, au sein de ces voies de transduction, il y a peu d'interconnections, dans le sens que les composants participant à ces différentes voies sont généralement spécifiques de la voie en question (Jaillais and Chory 2010).

Un défi majeur est de comprendre comment ces différentes voies de signalisation sont intégrées dans la cellule afin de permettre une réponse dynamique de la plante. En effet, il est nécessaire d'avoir des mécanismes qui permettent l'intégration à un moment précis de tous les signaux endogènes et environnementaux que la plante peut recevoir. Un des mécanismes participant à cette intégration fait intervenir le système de protéolyse. Certaines voies de réponse aux phytohormones font intervenir des répresseurs transcriptionnels qui doivent être dégradés pour permettre l'activation des gènes de réponse aux phytohormones. La machinerie protéolytique qui va maintenant être décrite est celle qui fait intervenir le protéasome 26S, les enzymes d'ubiquitinylation et le complexe signalosome. Ces processus vont être décrits au cours des deux paragraphes suivants en s'intéressant tout particulièrement au complexe signalosome. Ce complexe signalosome n'est pas un acteur impliqué directement dans l'ubiquitinylation du substrat ou dans sa dégradation mais il possède un rôle clé dans la régulation de ces mécanismes.

II Le signalosome, candidat idéal pour l'intégration des signaux.

1. Caractéristiques structurales et biochimiques.

Caractérisation des sous-unités.

Les huit sous-unités du signalosome ont été découvertes pour la première fois chez Arabidopsis grâce au phénotype particulier de leurs mutants respectifs, caractérisé par une photomorphogenèse constitutive. En effet, ces mutants ont la capacité de croître à l'obscurité comme s'ils étaient sous la lumière et présentent une forte accumulation d'anthocyanes au niveau des cotylédons (Wei, et al. 1994). Ces huit sous-unités ont été nommées CSN1 à 8 (CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 9 SigNalosome). Le signalosome est un complexe nucléaire de 450 kDa structurellement et fonctionnellement très conservé parmi les Eucaryotes.

Les huit sous-unités de ce complexe signalosome peuvent être regroupées en deux classes distinctes selon des domaines protéiques conservés. Le premier groupe rassemble six sous-unités, CSN1, 2, 3, 4, 7 et 8, qui possèdent un domaine PCI (Proteasome, COP9, eIF3). Ce domaine est lui-même composé de deux sous-domaines, un domaine «TPR-like» ou HEAT généralement impliqué dans les interactions protéine-protéine et situé à l'extrémité N-terminale de la protéine, et un domaine «winged-helix-like» habituellement identifié dans des protéines se liant aux acides nucléiques (ADN et ARN) et situé à l'extrémité C-terminale (**figure 9A**) (Dessau, et al. 2008). Le domaine PCI sert à l'interaction entre les sous-unités du signalosome lui conférant une structure solide souvent assimilée à un échafaudage.

Le second groupe correspond aux sous-unités CSN5 et CSN6 qui possèdent toutes deux un domaine MPN (Mrp1p and Pad1p N-terminal) qui semble servir à des interactions protéine-protéine. Par ailleurs, il a été montré au cours d'études réalisées chez la levure, qu'une protéine à domaine MPN était capable de se lier avec une forte affinité à l'ubiquitine suggérant que le signalosome peut lier l'ubiquitine ou des peptides assimilés (Wei, et al. 2008). CSN5 présente la particularité de posséder au milieu du domaine MPN, un motif JAMM (JAB1 MPN domain Metalloenzyme), aussi appelé MPN+ ($EX_nHXHX_{10}D$), lui conférant une activité enzymatique de type isopeptidase, c'est-à-dire la capacité de couper une liaison peptidique (**figure 9A**). En effet, le motif JAMM permet de lier un atome de zinc qui servira de cofacteur pour l'activité enzymatique, ce qui n'est pas le cas du domaine MPN présent dans la sous-unité CSN6. En revanche, même si seule la sous-unité CSN5 possède une activité enzymatique, ce n'est qu'au sein du complexe que l'activité isopeptidase fonctionne, suggérant le fait qu'un complexe correctement constitué est essentiel à la fonction du signalosome (Gusmaroli, et al. 2004).

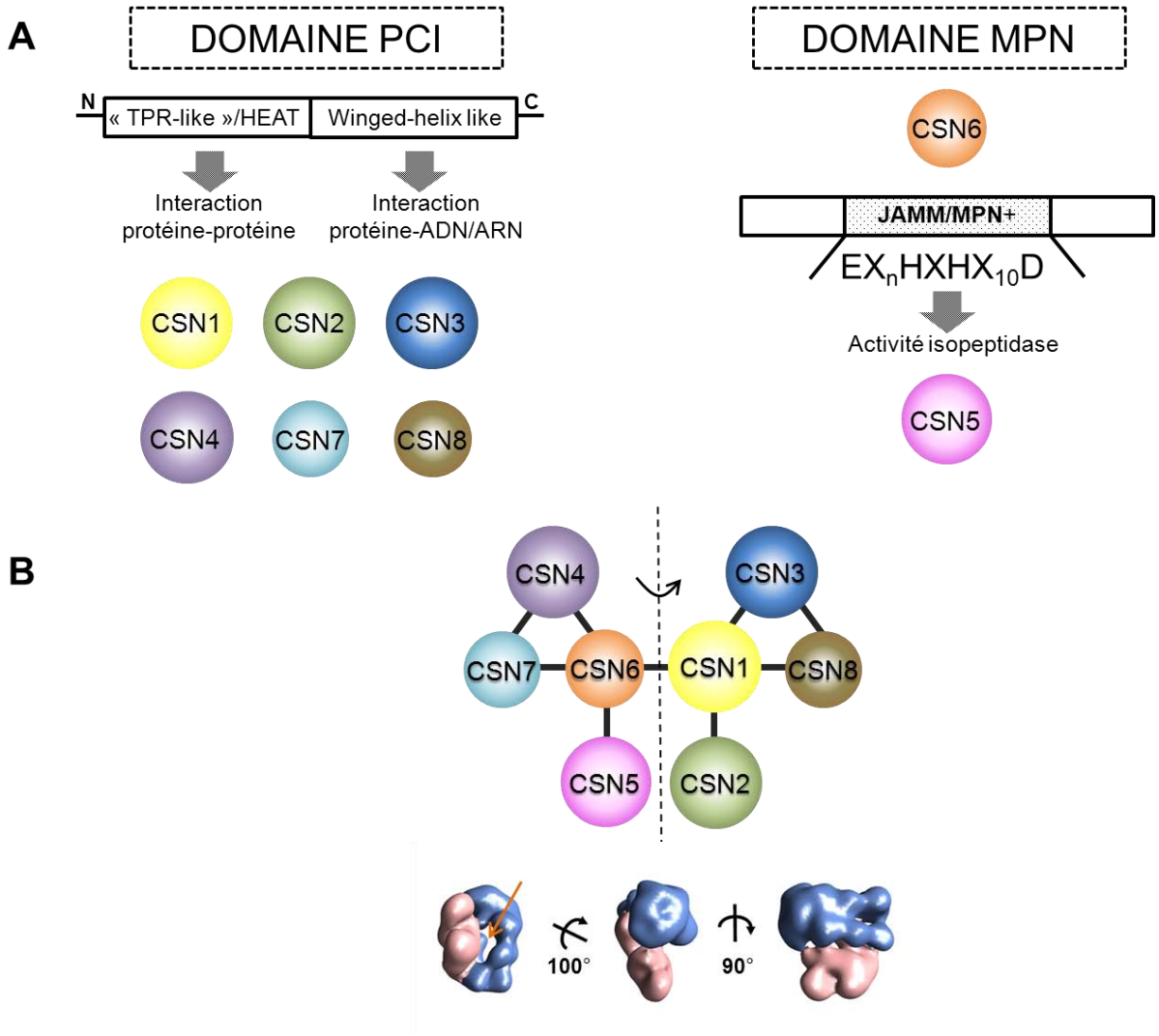


Figure 9: Caractéristiques des sous-unités à domaine PCI et MPN (A) et assemblage de ces sous-unités en complexe signalosome (B) (d'après Dessau, et al. 2008, Sharon, et al. 2009 et Enchev, et al. 2010).

Le signalosome est composé de six sous-unités à domaine PCI (CSN1, 2, 3, 4, 7 et 8) et deux sous-unités à domaine MPN (CSN5 et CSN6). La sous-unité CSN5 possède le motif JAMM/MPN+ dans le domaine MPN, lui conférant une activité isopeptidase. Les sous-unités sont représentées à l'échelle selon leur poids moléculaire.

Le complexe signalosome s'organise en deux tétramères: CSN4/5/6/7 et CSN1/2/3/8 reliés par les sous-unités CSN1 et 6. Les deux tétramères interagissent selon un plan perpendiculaire afin de générer une cavité au sein du complexe signalosome (flèche orange du schéma du bas).

Dynamique d'assemblage du complexe.

L'agencement des huit sous-unités formant le signalosome est resté longtemps non élucidé. La plupart des sous-unités sont plus stables *in vivo* lorsqu'elles participent au complexe que sous leur forme monomérique. Des études chez *Aspergillus nidulans*, *Arabidopsis thaliana* et chez les vertébrés ont montré que lorsqu'une sous-unité est altérée par une mutation, le complexe ne peut pas se former. Cette situation entraîne la létalité au stade plantule chez Arabidopsis et au stade embryonnaire chez la souris. L'identification chez Arabidopsis de la dernière sous-unité du complexe, CSN2, a permis de réaliser des expériences de double hybride et de «cross-linking» (Serino, et al. 2003). Ces expériences ont conduit à la création du premier modèle d'assemblage du signalosome en s'appuyant, en général, sur des interactions deux à deux comme c'est le cas pour le dimère CSN5/CSN6. Cependant, ce type de modèle ne permet pas une reconstitution tridimensionnelle du complexe en lui-même mais propose des pistes intéressantes.

Il a souvent été émis l'hypothèse que des sous-complexes se formaient avant l'assemblage du complexe entier mais les informations sur leur nombre et leur composition n'ont jamais été très claires. Déjà, en 2004, Gusmaroli et ses collaborateurs soulignaient le fait que des complexes différents pouvaient exister. Chez Arabidopsis, la sous-unité CSN5 est codée par deux gènes, *CSN5A* et *CSN5B,* et l'analyse de mutants d'insertion de ces gènes révèle qu'ils ne sont pas impliqués de la même manière dans le développement de la plante. En effet, ces deux sous-unités, CSN5A et CSN5B, ne sont pas intégrées dans le même complexe signalosome puisqu'une copie seulement de chaque sous-unité participe à l'élaboration du complexe. Cette étude a révélé, par des analyses de chromatographie d'exclusion, que la sous-unité CSN5A était présente dans un complexe d'une masse apparente d'environ 450 kDa, ce qui correspond au signalosome mais aussi dans des complexes plus petits d'environ 100 à 150 kDa contenant d'autres sous-unités telle que CSN3. De plus, Kwok *et al*. (1998) ont montré que la sous-unité CSN5 peut également exister à l'état monomérique montrant une localisation à la fois nucléaire et cytoplasmique (Kwok, et al. 1998).

Cependant, deux grandes idées s'opposent sur l'existence de ces sous-complexes. En effet, le fait de pouvoir pré-assembler le signalosome fait ressortir l'idée d'une certaine adaptabilité/modularité s'accordant avec son profil multifonctionnel. Mais étant donné la nature des analyses, principalement *in vitro,* permettant le plus souvent de visualiser des interactions deux à deux, les sous-complexes pourraient correspondre à des artefacts de manipulation sans réalité biologique. La question de l'existence ou non des sous-complexes pourrait être résolue par l'étude cristallographique des sous-complexes mais leur faible quantité ne permet pas de réaliser ce type d'étude.

Cependant, la première cristallisation d'une des sous-unités à domaine PCI a commencé à faire émerger un modèle plus pertinent de l'assemblage du signalosome (Dessau, et al. 2008). En effet, le domaine PCI a été caractérisé dans sa structure tridimensionnelle, comme nous l'avons mentionné plus haut, pour la sous-unité CSN7 d'Arabidopsis, et cela a permis de confirmer certaines des interactions dans lesquelles cette sous-unité est impliquée. Des expériences de chromatographie d'exclusion de taille ont montré que CSN7 était capable d'interagir avec CSN8 et avec CSN1 de manière spécifique puisque ces deux sous-unités n'interagissent pas ensemble. De plus, il a été montré que la partie C-terminale de CSN7 contenant le domaine «winged-helix-like» interagit spécifiquement avec la sous-unité à domaine MPN, CSN6 et donc que ce domaine est essentiel au bon assemblage du signalosome. Mieux encore, l'équipe de Dessau a mis en lumière la composition des premiers sous-complexes du signalosome. Ainsi, en plus des dimères déjà présentés, il existe deux trimères, CSN8/7/6 et CSN1/7/6. Aucun tétramère liant ces quatre sous-unités n'a pu être identifié. Ces données suggèrent que soit il y a plus d'une copie de CSN7 dans un complexe COP9 et chaque copie interagit soit avec CSN1, soit avec CSN8 ou alors CSN7 interagit au sein du complexe, soit avec l'une, soit avec l'autre des sous-unités, laissant la possibilité à une autre sous-unité de fixer celle qui n'a pas pu être fixée avec CSN7.

La dernière avancée en la matière a été d'utiliser une technique de spectrométrie de masse capable d'identifier dans les complexes entiers ou les sous-complexes, l'exacte composition de chaque assemblage. Cette étude a été réalisée sur un signalosome d'origine humaine entièrement reconstitué *in vitro* et présentant une activité isopeptidase fonctionnelle (Sharon, et al. 2009). Ainsi le signalosome est composé de deux modules symétriques en nombre de sous-unités : CSN1/2/3/8 et CSN4/5/6/7, de masses respectives de 171 kDa et 150 kDa, reliés grâce à l'interaction des sous-unités CSN1 et CSN6 (**figure 9B**). Le repliement de chacun de ces modules permet la formation entre les modules des dimères suivants: CSN1/6, CSN2/5, CSN3/4 et CSN8/7. Au sein de ces modules se dégagent deux trimères structurellement très stables, CSN1/3/8 et CSN4/6/7 auxquels s'ajoutent postérieurement CSN2 et CSN5, respectivement. L'observation la plus surprenante est que durant cette étude, il a souvent été détecté un complexe à sept sous-unités auquel manquait soit CSN2, soit CSN5, soit CSN8, complexe partiel généré à partir du complexe entier. Ces sous-unités ont donc une interaction moins stable avec le reste du complexe. De plus, bien que la sous-unité CSN5 soit positionnée en périphérie du signalosome, elle ne peut pas revenir s'associer directement au signalosome sans passer par l'interaction avec le trimère correspondant.

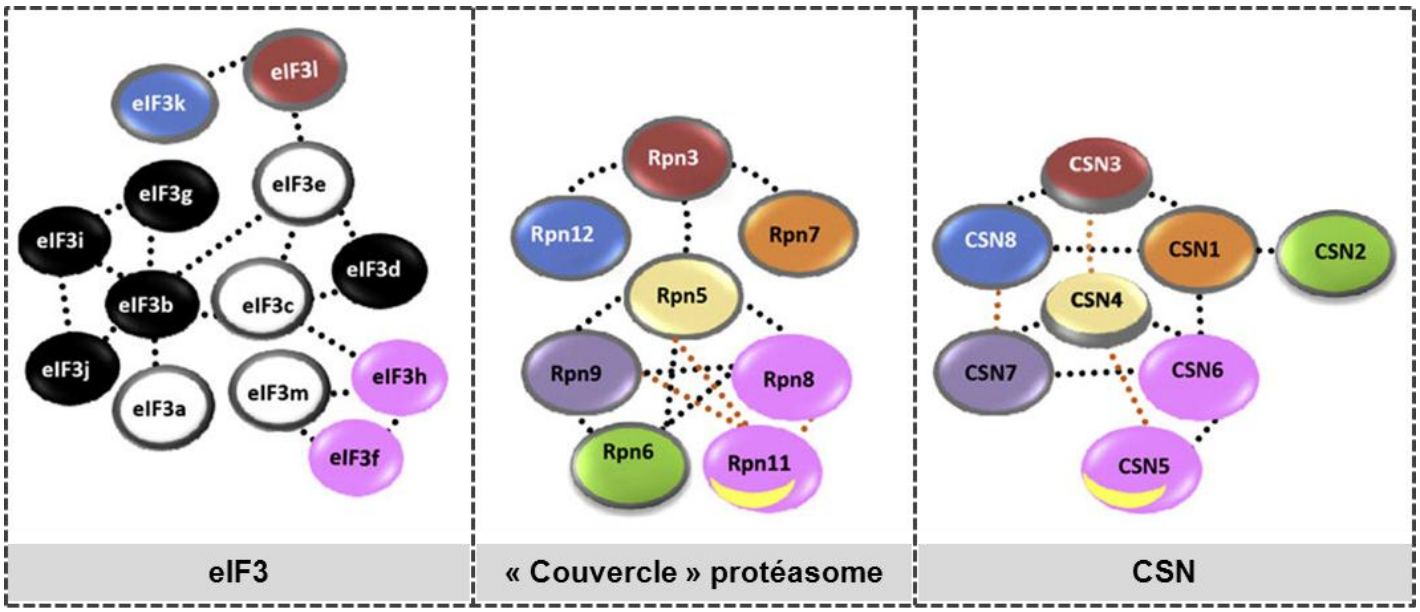


Figure 10: Comparaison de la composition et de l'assemblage des trois complexes à domaine PCI (d'après Pick, et al. 2009).

Les sous-unités à domaine PCI sont représentées avec les contours gris et les différents paralogues sont représentés avec les mêmes couleurs sauf quatre des sous-unités à domaine PCI du complexe eIF3 qui n'ont pas de paralogues dans les autres complexes. Les sous-unités à domaine MPN, sont représentées en rose et le motif jaune en forme de croissant appartient aux sous-unités possédant le motif JAMM/MPN+. Les autres sous-unités sont en noir.

Les interactions identifiées par spectrométrie de masse sont représentées en lignes pointillées noires alors que les interactions identifiées dans d'autres études sont en lignes pointillées orange.

La situation dans laquelle le signalosome, *in vivo*, après avoir été assemblé puisse perdre une de ces trois sous-unités pose la question de la fonction d'une telle structure et plus particulièrement lorsque CSN5, la sous-unité catalytique, est absente. En revanche, ces éléments apportent des arguments en faveur de ceux qui estiment que certaines des sous-unités et notamment CSN5 ou CSN2, peuvent avoir une fonction supplémentaire indépendamment du signalosome. Par exemple, CSN2 chez les mammifères est représentée par deux isoformes, l'une entière et intégrée au signalosome, l'autre tronquée de 143 acides aminés en C-terminal et nommée Alien. La protéine Alien est suspectée d'agir comme un corépresseur de certains récepteurs nucléaires afin de moduler l'assemblage du nucléosome. Cependant, rien n'indique qu'Alien est capable de se fixer aux autres sous-unités du signalosome (Wei, et al. 2008). Enfin, une dernière étude biochimique s'appuyant sur des techniques d'analyse de particules et de microscopie électronique montre que les deux modules du signalosome décrits précédemment, s'organisent de manière à générer une cavité en leur centre (**figure 9B**). En effet, lors d'expériences de chromatographie d'exclusion, la masse du complexe entier semble être de l'ordre de 450-500 kDa or cette étude montre que le volume total des sous-unités représente 320 kDa. Il s'avère que la technique de chromatographie d'exclusion prend en compte un paramètre reflétant les dimensions maximales d'un objet, ainsi un complexe générant une cavité aura l'air plus lourd qu'un complexe de même masse sans cavité (Enchev, et al. 2010). Cette étude révèle que les deux modules sont presque perpendiculaires l'un par rapport à l'autre et, génèrent la cavité centrale en se liant au moins par trois points de contact.

Homologies d'architecture avec le complexe d'initiation à la traduction eIF3 et le «couvercle» du protéasome 26S.

Les deux types de sous-unités, à domaine PCI et à domaine MPN respectivement, ne sont pas retrouvées que dans le signalosome mais dans deux autres complexes, le protéasome 26S et le complexe d'initiation de la traduction eIF3.

L'initiation de la traduction chez les Eucaryotes est effectuée par au moins douze facteurs différents. Parmi eux, le complexe eIF3 (eukaryotic translation Initiation Factor 3) est un des plus importants en taille puisqu'il possède treize sous-unités. eIF3 participe à la traduction en favorisant la fixation d'un complexe ternaire (eIF2, ARN de transfert fixé à la méthionine, GTP) à la sous-unité 40S du ribosome et en inhibant l'association prématurée des sous-unités 40S et 60S du ribosome. De plus, ce complexe sert de pont entre le complexe eIF4G, complexe se liant à la coiffe de l'ARNm, et la sous-unité 40S. Parmi ces 13 sous-unités, six possèdent un domaine PCI, deux possèdent un domaine MPN et les cinq dernières ne possèdent aucun de ces deux domaines mais sont impliquées dans des liaisons à l'ARN (**figure 10, colonne gauche**).

En revanche, aucune des sous-unités à domaine MPN ne possède le motif JAMM, amenant l'hypothèse que ces sous-unités servent ici de protéines «d'échafaudage» en interagissant avec les sous-unités à domaine PCI et pourraient avoir un rôle coordinateur dans l'activité globale du complexe (Zhou, et al. 2008). L'interaction entre les complexes signalosome et eIF3 a été démontrée, chez Arabidopsis et dans des cellules humaines, mais aucun rôle physiologique ne lui a été attribué. Récemment il a été montré chez Arabidopsis qu'une surexpression d'une des sous-unités à domaine PCI du complexe eIF3, eIF3e, induit un phénotype similaire aux phénotypes des mutants *csn* suggérant que ces deux complexes interviennent dans une même voie de signalisation. Or, aucun effet de la surexpression du gène *eIF3e*, n'est visible, que ce soit sur la quantité des protéines CSN ou sur l'activité isopeptidase du complexe. En revanche, chez des mutants *csn*, la quantité de transcrits du gène *eIF3e* est diminuée alors que la quantité de protéines est augmentée. Il s'avère que la sous-unité eIF3e est stabilisée chez des mutants *csn* car elle ne peut être dégradée par le protéasome 26S suggérant que le signalosome régule négativement la sous-unité eIF3e en induisant sa dégradation par le protéasome 26S (Yahalom, et al. 2008).

Le protéasome 26S est composé de deux complexes, un complexe catalytique 20S et deux particules régulatrices 19S localisées aux deux extrémités du complexe 20S. Ces sous-unités régulatrices sont essentielles à la dégradation « ubiquitine-dépendante » des protéines. En effet, les particules régulatrices du protéasome se scindent en deux sous-complexes, une partie basale contenant six sous-unités ATPasiques faisant le lien avec le complexe catalytique 20S et une partie apicale contenant huit sous-unités homologues aux huit sous-unités du signalosome et communément appelée «couvercle» du protéasome. La partie basale ainsi que le complexe 20S sont nécessaires et suffisants pour la dégradation de peptides et de protéines non ubiquitinylées, le premier «déplie» les protéines afin qu'elles soient dégradées par le deuxième, alors que pour la dégradation de protéines ubiquitinylées, il est nécessaire d'avoir le «couvercle» (Glickman, et al. 1998). Les huit sous-unités du «couvercle» du protéasome sont organisées en deux groupes, six sous-unités à domaine PCI et deux à domaine MPN (**figure 10, colonne centrale**). Les séquences entre les sous-unités du signalosome et du «couvercle» du protéasome présentent une forte homologie. Cette homologie est plus faible avec les séquences des sous-unités du complexe eIF3. La similitude d'architecture du signalosome et du protéasome 26S et l'homologie de leurs sous-unités suggèrent l'idée que ces deux complexes possèdent un ancêtre commun (Wei and Deng 2003). Comme dans le cas du signalosome, parmi les sous-unités à domaine MPN, la sous-unité RPN11 (Regulatory Particle Non-ATPasic 11), homologue de CSN5, mais pas la sous-unité RPN8 (homologue de CSN6) contient un motif JAMM dans son domaine MPN.

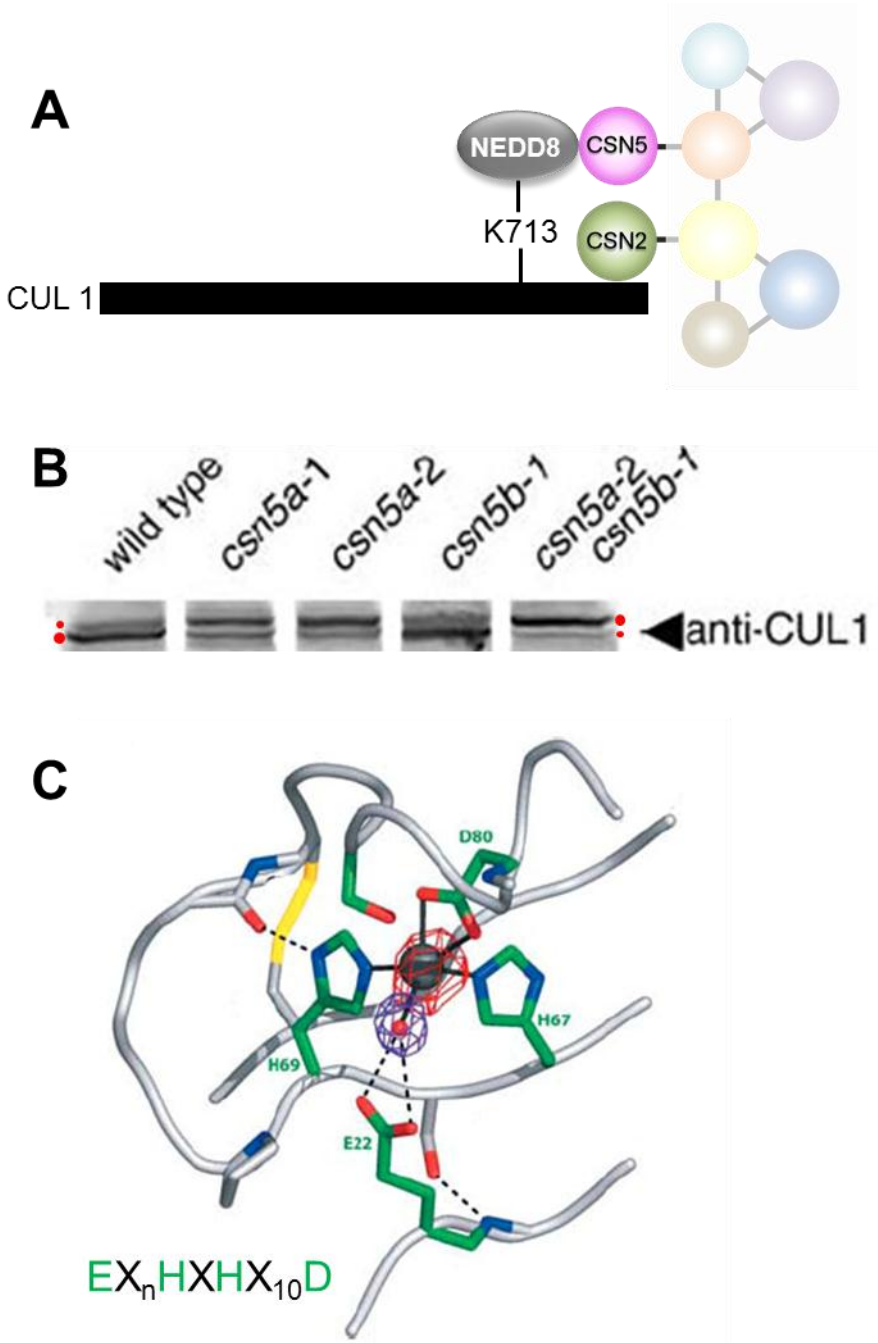


Figure 11: Rôle enzymatique du domaine JAMM de la sous-unité CSN5.

(A) Le complexe signalosome interagit avec la sous-unité culline 1 (CUL1) du complexe ubiquitine-ligase par la sous-unité CSN2, permettant à la sous-unité CSN5 d'hydrolyser la liaison entre le peptide NEDD8 et la lysine (K) 713 de la culline 1.

(B) Le statut de neddylation des cullines est visualisé par immunodétection avec un anticorps dirigé contre la culline 1. Cet anticorps révèle deux bandes. La bande de haut poids moléculaire correspond aux cullines neddylées, alors que la bande de faible poids moléculaire représente les cullines déneddylées. Ainsi chez une plante sauvage (WT), la culline 1 est majoritairement déneddylée grâce à l'activité isopeptidase de CSN5 (point rouge de taille plus importante) alors que des versions mutées des gènes *CSN5* provoquent une accumulation de cullines neddylées (d'après Dohmann, et al, 2005).

(C) Le domaine JAMM cristallisé d'*Archaeoglobus fulgidus* montre que les acides aminés identifiés en vert sont très importants dans la fixation de l'atome de zinc (sphère noire). Les deux histidines (H) et l'acide aspartique (D) participent à une connexion directe alors que l'acide glutamique (E) lie une molécule d'eau (sphère rouge) stabilisant le système (d'après Ambroggio, et al. 2004).

Par ailleurs, il arrive de retrouver des sous-unités du «couvercle» du protéasome qui interagissent avec les sous-unités du signalosome. D'autres éléments indiquant que le signalosome a la capacité de se lier aux complexes E3 ubiquitine-ligase ont apporté l'hypothèse que le signalosome pourrait agir en tant que «couvercle» du protéasome rapprochant ainsi la machinerie d'ubiquitinylation des protéines à la machinerie de dégradation des protéines (Schwechheimer and Deng 2001).

En revanche, malgré les homologies de séquences, voire d'architecture, la dynamique d'assemblage de ces complexes est différente. D'une part, alors qu'eIF3 est construit à partir de trois modules distincts, le protéasome et le signalosome sont assemblés à partir de deux modules. De plus les deux modules du signalosome sont symétriques alors que ceux du «couvercle» du protéasome ne le sont pas (RPN5/6/8/9/11 et RPN3/7/12). Cependant, les deux sous-unités à domaine MPN, CSN5/CSN6 et RPN11/RPN8, interagissent directement dans chaque complexe et celles possédant un motif JAMM seront, dans le protéasome et le signalosome, directement exposées vers l'extérieur. Il apparait toutefois que les complexes du «couvercle» du protéasome et eIF3 sont plus stables que le signalosome qui possède une certaine plasticité (Sharon, et al. 2009). De manière intéressante, ces trois complexes sont étroitement liés au métabolisme des protéines, de leur synthèse dans le cas du complexe eIF3 à leur dégradation dans le cas des complexes signalosome et protéasome (Pick, et al. 2009).

Activité enzymatique isopeptidase.

Les sous-unités CSN5 du signalosome et RPN11 du protéasome, possèdent grâce au domaine JAMM ($EX_nHXHX_{10}D$) une activité isopeptidase qui n'est active que lorsque le complexe en question est associé. Mais à quoi sert cette activité et quels sont ces substrats ?

Des premiers éléments de réponse ont été apportés par Lyapina *et al*. (2001). En effet, en recherchant des interacteurs potentiels d'un des complexes E3 ubiquitine-ligase dans des cellules humaines, ce sont les huit sous-unités du signalosome qui ont été identifiées (**figure 11A**). Le complexe SCF (SKP1, Cdc53/cullin, F-box protein) est un des complexes appartenant à la famille E3 ayant une fonction de liaison de l'ubiquitine à son substrat. Il s'agit d'un complexe de quatre sous-unités dont la sous-unité culline qui subit une modification post-traductionnelle lui permettant de rendre le complexe actif. Cette modification post-traductionnelle, la neddylation, consiste à lier un petit peptide de 81 acides aminés, soit 9 kDa, partageant 60% d'identité avec l'ubiquitine et appelé Nedd8 (Neural precursor cell-expressed developmentally down-regulated gene 8) (Kumar, et al. 1993). La voie menant à cette neddylation est décrite à la **figure 12** (**n°1**). Identifié chez la souris, ce

mécanisme a aussi été mis en évidence chez Arabidopsis et le peptide correspondant a été nommé RUB1 (Related to Ubiquitin 1) (Pozo, et al. 1998).

Chez *Schizosaccharomyces pombe*, la culline 1 subit une neddylation sur la lysine 713 (**figure 11A**). Cette forme neddylée s'accumule chez des mutants *csn1* à l'inverse des individus de type sauvage chez lesquels s'accumule la forme déneddylée. En revanche, l'ajout d'un extrait protéique de levure possédant un signalosome fonctionnel à l'extrait protéique des mutants *csn1*, permet d'obtenir la forme majoritairement déneddylée de la culline suggérant que le signalosome est directement liée à une activité enzymatique permettant la déneddylation. Par ailleurs, des expériences de mutagenèse du gène codant la sous-unité RPN11 du protéasome, ont montré une accumulation de substrats polyubiquitinylés chez la levure induisant la létalité de l'individu (Verma, et al. 2002). Or le clivage des chaînes ubiquitines est réalisé par une protéase à cystéine, soulevant ainsi un lien potentiel direct entre CSN5/RPN11, leurs activités isopeptidases, et les activités de déneddylation/déubiquitinylation.

Diverses expériences ont conduit à la confirmation que CSN5 est porteur de l'activité déneddylase. En effet, des chélateurs d'ions divalents bloquent l'activité de déneddylation mais pas l'assemblage du complexe signalosome chez la levure. Des mutations ponctuelles dans le domaine JAMM de CSN5 (notamment au niveau des histidines et de l'aspartate) empêchent aussi la déneddylation des cullines sans empêcher la formation du complexe signalosome (**figure 11B**). La mutation des deux histidines de ce domaine chez RPN11 conduit à un assemblage correct du protéasome mais qui ne peut dégrader les substrats encore ubiquitinylés (Verma, et al. 2002). Ainsi, CSN5 et RPN11 possèdent un domaine JAMM chélateur d'ion zinc qui est essentiel pour le clivage d'un peptide «related to ubiquitin» des cullines ou des substrats de la machinerie protéolytique (Cope, et al. 2002) permettant de regrouper les protéines possédant ce domaine dans la famille des métalloprotéases. La cristallisation d'une protéine d'*Archaeoglobus fulgidus* ne contenant que le domaine JAMM a permis d'identifier ses caractéristiques biochimiques. Ainsi, les acides aminés conservés de ce domaine, histidine et aspartate, servent à la liaison de l'atome de zinc alors que le glutamate sert à la liaison avec une molécule d'eau, ce qui en fait un catalyseur pour des réactions acido-basiques (**figure 11C**) (Ambroggio, et al. 2004).

Comme nous l'avons vu précédemment, chez Arabidopsis, il existe deux gènes codant la sous-unité CSN5, *CSN5A* et *CSN5B* ainsi que deux gènes *CSN6, CSN6A* et *CSN6B* alors que les autres sous-unités sont codées par un seul gène. Chacune des sous-unités CSN5 est capable de s'associer avec les autres sous-unités du signalosome.

Cependant, une seule sous-unité CSN5 intégrera un complexe signalosome même si les complexes CSN^{CSN5A} et CSN^{CSN5B} semblent pouvoir coexister dans une même cellule (Gusmaroli, et al. 2004). Des mutants perte-de-fonction de la sous-unité CSN5A montrent qu'à l'inverse des mutants concernant les sous-unités à domaine PCI, le signalosome peut s'assembler même en absence de la sous-unité CSN5. Pourtant ces mutants *csn5a* montrent un phénotype comparable aux phénotypes des autres mutants *csn* indiquant que ce phénotype est davantage lié au défaut d'activité de déneddylation qu'au défaut d'assemblage du signalosome (Dohmann, et al. 2005). Cependant, une deuxième étude est venue contredire cet élément en montrant que, chez un mutant *csn5a*, les autres sous-unités du signalosome sont en plus faible quantité hormis pour CSN2 et CSN4. Ces résultats montrent que la perte de la sous-unité CSN5A provoque, comme la perte des autres sous-unités, une diminution du complexe signalosome entier (Gusmaroli, et al. 2007). En revanche, les deux études s'accordent sur le fait que le mutant *csn5b* ne montre pas d'altérations phénotypiques flagrantes, ceci est certainement lié au fait que la quantité des sous-unités du signalosome, y compris de CSN5, ne semble pas être altérée chez ces mutants, alors que chez le mutant *csn5a*, la quantité de protéines de CSN5 est fortement réduite. Ces éléments sont en accord avec le fait que le gène *CSN5A* est exprimé en plus grande quantité dans tous les tissus de la plante par rapport au gène *CSN5B*. De plus, les mutations dans le domaine JAMM de la sous-unité CSN5A entraînent des altérations phénotypiques qui ne sont pas présentes lorsque les mêmes mutations sont appliquées dans le domaine JAMM de CSN5B. Ces données indiquent que les deux copies de la sous-unité CSN5 n'assurent pas un rôle équivalent dans le fonctionnement du signalosome et il apparaît clairement que la sous-unité CSN5A assure un rôle majeur dans le fonctionnement du signalosome (Gusmaroli, et al. 2004). De la même façon, les gènes codant la sous-unité CSN6 sont exprimés de façon différentielle durant le développement de la plante. En effet, le gène *CSN6A* est plus exprimé que le gène *CSN6B* dans la plantule et la plante adulte. Les mutants *csn6a* et *csn6b* montrent des défauts phénotypiques mais pas aussi sévères que dans le cas des autres mutants *csn*, suggérant que les deux gènes, *CSN6A* et *CSN6B*, peuvent avoir une fonction redondante dans le développement de la plante. En effet, ces deux gènes ont un rôle fonctionnel équivalent dans la régulation de tous les stades de développement de la plante et l'expression d'un des deux gènes semble être suffisant pour avoir la fonction complète de la sous-unité CSN6 (Gusmaroli, et al. 2007).

Tous les éléments décrits ci-dessus convergent vers un rôle prépondérant du signalosome dans la dégradation protéolytique et dans les processus de signalisation qui lui sont associés. Ces processus cellulaires sont intimement liés comme nous le verrons dans les paragraphes suivants.

2. Rôles du complexe signalosome dans la cellule.

Caractérisation du signalosome et de ses partenaires.

Lyapina *et al*. (2001) ont montré l'interaction entre un complexe ubiquitine-ligase, le complexe SCF et le complexe signalosome. Plus précisément, il existe une forte interaction de la sous-unité culline du complexe SCF avec la sous-unité CSN2 du signalosome et une interaction plus faible avec la sous-unité CSN6 (**figure 11A**) d'après des expériences de double hybride (Lyapina, et al. 2001). Ces données ont conduit à plusieurs études montrant que le signalosome est un complexe intégrateur de nombreux signaux qui participe à de multiples voies de signalisation essentielles dans le développement.

Chez *Arabidopsis thaliana*, plus de 1400 gènes codent des composants impliqués dans la voie de dégradation *via* le protéasome soit 5% du protéome et 90% de ces gènes codent des protéines participant à l'élaboration des complexes ubiquitine-ligase (Moon, et al. 2004). La voie d'ubiquitinylation a pour rôle de lier des peptides ubiquitines de 76 acides aminés à un substrat pour qu'il soit reconnu et dégradé par le protéasome. Trois enzymes interviennent dans la voie «ubiquitine dépendante» ou UPS, l'enzyme d'activation de l'ubiquitine, E1; l'enzyme de conjugaison de l'ubiquitine, E2 et l'enzyme de ligation de l'ubiquitine au substrat, E3. Ces réactions sont «ATP-dépendantes». L'enzyme E1 se lie à l'extrémité C-terminale de l'ubiquitine sur un résidu glycine par une liaison thioester puis elle assure le transfert de l'ubiquitine, *via* une liaison thioester, à l'enzyme E2. Puis, l'enzyme E2 transfère directement l'ubiquitine à l'enzyme E3 ou se fixe à E3 pour transférer l'ubiquitine directement au substrat. L'ubiquitine est fixée sur le substrat au niveau d'une lysine par une liaison isopeptidique. Cette chaîne de réactions se poursuit jusqu'à obtenir des substrats polyubiquitinylés constitués, au minimum, de quatre monomères d'ubiquitine (Dielen, et al. 2010).

La famille des enzymes E3 comprend de nombreux membres apportant une large diversité de protéines ou de complexes protéiques, possédant soit un domaine HECT (Homology to E6-AP C Terminus) ou un domaine RING (Really Interesting New Gene). Dans le cas de ces dernières, qui peuvent être seules ou associées à des complexes, le domaine RING est caractérisé par la présence d'un motif liant un atome de zinc. Le «zinc finger» ainsi formé permet la liaison à l'enzyme E2. Les complexes E3 ubiquitine-ligase regroupe, chez les plantes, le complexe APC/C (Anaphase Promoting Complex/Cyclosome), les complexes BTB/Cul3 (Broad-complex, Tramtrack, Bric-a-brac/Cullin 3), des complexes contenant la culline 4, et les plus caractérisés d'entre eux, les complexes SCF (SKP1, Cdc53/cullin, F-box protein). Tous ces complexes sont regroupés dans la famille CRL (Cullin RING Ligase) puisqu'ils contiennent tous une sous-unité à domaine RING et une sous-unité culline ou «cullin-like».

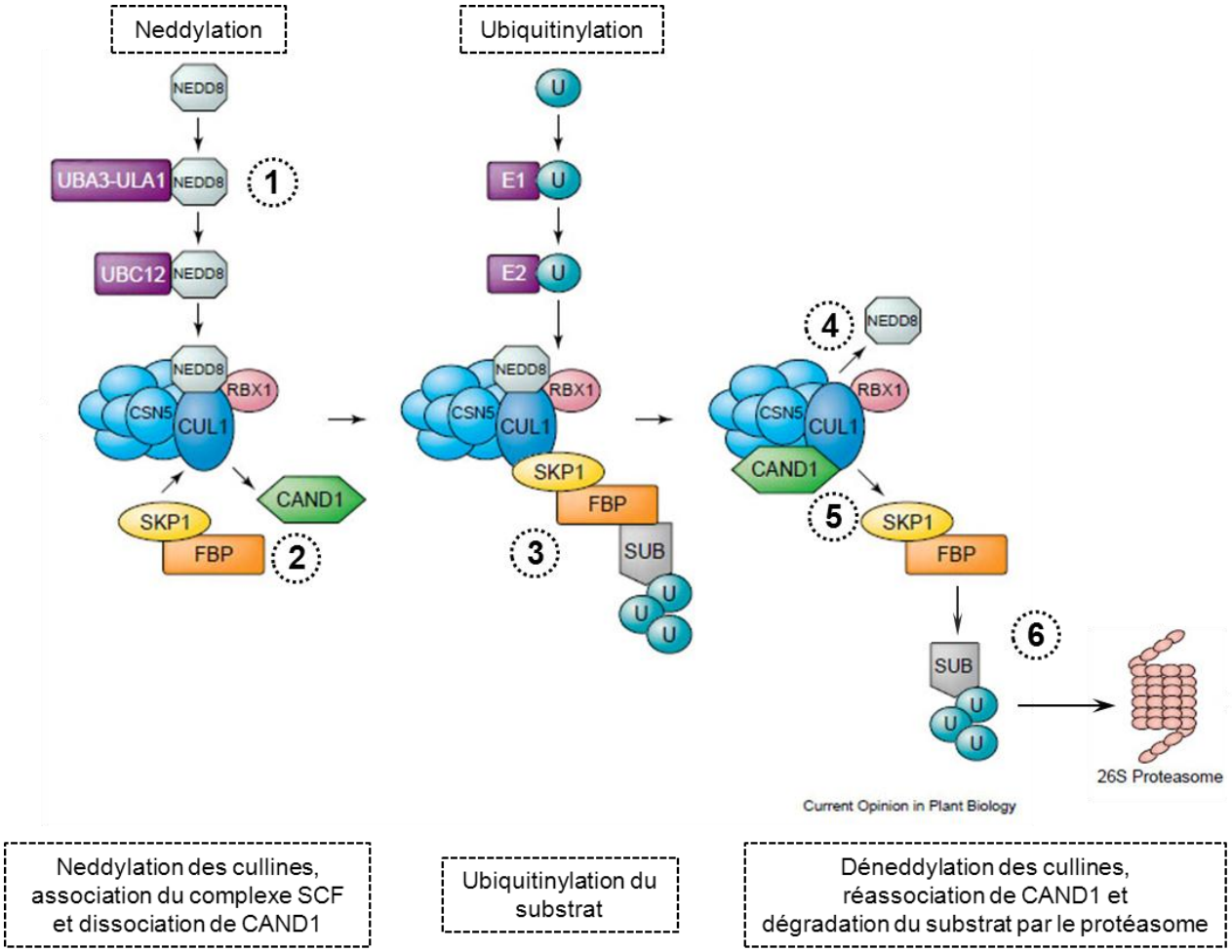


Figure 12: Cinétique d'assemblage de la machinerie protéolytique (d'après Schwechheimer, et al. 2004).

(**1**) La voie de neddylation fait intervenir l'enzyme UBA3-ULA1 qui est l'enzyme d'activation du peptide NEDD8 et qui transfère NEDD8 à l'enzyme de conjugaison UBC12, capable d'interagir avec RBX1 afin de fixer NEDD8 à la sous-unité culline (CUL1).

(**2**) La modification post-traductionnelle de la culline permet aux sous-unités culline et RBX1 de se dissocier de CAND1 et d'interagir avec les autres sous-unités du complexe, la protéine adaptatrice SKP1, et la protéine à F-box (FBP) afin de former le complexe SCF actif.

(**3**) Le complexe SCF ubiquitine-ligase est alors fonctionnel et peut agir dans la voie d'ubiquitinylation en recrutant d'une part l'enzyme E2 de conjugaison de l'ubiquitine (U) au niveau de la sous-unité RBX1 et en fixant la cible concernée par la protéine FBP.

Pour finir, le complexe signalosome *via* l'activité enzymatique de la sous-unité CSN5 va hydrolyser le peptide NEDD8 (**4**) provoquant la dissociation du complexe SCF. La protéine CAND1 peut alors se fixer à nouveau aux sous-unités culline et RBX1 (**5**). Le substrat polyubiquitinylé est ainsi relâché et reconnu par le protéasome qui va le dégrader (**6**).

Mécanisme d'action et assemblage de la machinerie protéolytique.

Le complexe SCF est composé de quatre sous-unités, RBX1 (RING BOX 1) qui possède le domaine RING, associée à la sous-unité culline, déjà évoquée plus haut, une sous-unité SKP1 (S-phase Kinase-associated Protein 1) ou ASK1 chez Arabidopsis (Arabidopsis SKP1-like 1), servant de protéine adaptatrice permettant de lier la protéine à F-box. Cette dernière appartient à une famille comptant plus de 700 membres chez Arabidopsis. Elle détermine la spécificité du complexe en fixant le substrat qui devra être ubiquitinylé. Chez Arabidopsis, il existe deux protéines RBX1, cinq sous-unités cullines dont deux seulement ont été montrées comme participant au complexe SCF, les cullines 1 et 2, et 21 protéines ASK. Le nombre de combinaisons possibles entre ASK et la protéine à F-box détermine une grande variabilité dans le choix du substrat (Moon, et al. 2004). La sous-unité culline, 1 ou 2, subit une modification post-traductionnelle sur son extrémité C-terminale par liaison du peptide NEDD8/RUB1. Il a été montré que lors de la dégradation d'une enzyme impliquée dans la réponse à l'inflammation chez l'homme, I-κB est ubiquitinylée seulement si la sous-unité culline du complexe SCF concerné est neddylée montrant la nécessité de cette modification post-traductionnelle dans l'activité ubiquitine-ligase du complexe. Curieusement, l'activité de ligation du peptide RUB1 requiert l'activité de ligation du complexe SCF lui-même. En effet, la voie d'activation et de fixation du peptide RUB1 est similaire à celle connue pour l'ubiquitine. Ainsi, l'enzyme E2 permettant la conjugaison de RUB1, Ubc12, est capable de se fixer à la sous-unité RBX1 afin de transférer RUB1 à la culline (**figure 12, n°1**) (Hochstrasser 2000). Cette modification post-traductionnelle est nécessaire pour l'association des quatre sous-unités du complexe E3 ubiquitine-ligase. Cependant, il existe des protéines, CAND1 chez l'homme (Cullin-Associated Nedd8-Dissociated protein 1) ou ETA2 chez Arabidopsis (Enhancer of tir1-1 Auxin resistance 2) qui régulent le processus d'association/dissociation. CAND1 a été identifiée pour la première fois dans des cellules HeLa, grâce à sa capacité à interagir fortement avec la sous-unité culline. De façon intéressante, cette protéine interagit aussi avec la sous-unité RBX1 mais pas avec la sous-unité SKP1 ou avec la protéine à F-box. Ainsi, il a été montré que le complexe SCF est organisé en deux modules. Le premier comporte la sous-unité culline et RBX1 alors que le deuxième est formé de la sous-unité SKP1 et de la protéine à F-box. L'association entre ces deux modules est régulée par CAND1 qui se lie à la culline empêchant le complexe SCF de s'associer. La neddylation de la culline entraîne la dissociation de CAND1 et l'assemblage du complexe SCF qui devient alors actif (**figure 12, n°2**) (Zheng, et al. 2002). Les données issues de ces travaux suggèrent que la protéine CAND1 exerce un effet négatif sur l'activité ubiquitine-ligase du complexe SCF. Cependant, les études réalisées sur Arabidopsis montrent l'inverse.

En effet, deux études datant de 2004, ont montré que des mutants de gènes codant des orthologues de CAND1 présentaient de fortes modifications phénotypiques et notamment une altération de la réponse aux phytohormones. Cette situation peut s'expliquer par la stabilisation des régulateurs négatifs de la réponse aux phytohormones, par exemple les Aux/IAA dans le cas de la signalisation auxinique, chez les mutants *eta2*. Ainsi, la protéine ETA2 a un rôle de régulateur positif de la réponse à l'auxine en modulant l'activité du complexe SCF (Chuang, et al. 2004; Feng, et al. 2004). Ce paradoxe a été commenté dernièrement en soulignant le fait que le cycle assemblage/désassemblage du SCF est requis pour qu'il soit actif. En effet, il faut que le complexe SCF présente une certaine plasticité car différentes protéines à F-box ont besoin d'accéder à ce complexe pour procéder à l'ubiquitinylation des cibles qu'elles reconnaissent spécifiquement.

Le cycle d'assemblage/désassemblage du complexe SCF est donc très largement contrôlé par le cycle de neddylation/déneddylation des cullines. On sait maintenant que l'activité de déneddylation est contrôlée par le complexe signalosome et tout particulièrement par la sous-unité CSN5. Ainsi, un mutant *csn5* montre une accumulation prépondérante de cullines neddylées. De plus, chez les mutants *csn*, l'hyperneddylation des cullines rend ces dernières instables, mais paradoxalement, les protéines à F-box ont tendance à être hyperubiquitinylées et donc dégradées de manière accrue, entraînant une diminution de l'activité du complexe SCF (Cope and Deshaies 2006). Chez l'homme et la levure, les protéines à F-box lorsqu'elles sont liées à SKP1 au sein même du SCF sont, pour certaines, ciblées par le système auquel elles appartiennent puis dégradées. Lorsque les substrats fixés par ces protéines à F-box sont présents, ce phénomène ne se produit pas. Au contraire, si la quantité de substrat diminue, la protéine à F-box présente dans le complexe est dégradée, ce qui constitue la solution pour pouvoir fixer un autre type de protéine à F-box (Wu, et al. 2006). Le modèle proposé illustrant l'action de ces trois éléments de régulation de la voie UPS, signalosome, complexe SCF et la protéine CAND 1, est le suivant: 1) le complexe SCF assemblé et actif ubiquitinyle le substrat fixé à la protéine à F-box (**figure 12, n°3**), 2) le complexe signalosome, de par son activité isopeptidase, hydrolyse le peptide RUB1 (**figure 12, n°4**); 3) CAND1, se fixant sur la culline déneddylée, va entraîner une dissociation du complexe SCF (**figure 12, n°5**) qui va relâcher le substrat polyubiquitinylé qui sera reconnu et dégradé par le protéasome (**figure 12, n°6**); 4) pour qu'il y ait de nouveau neddylation, CAND1 va relâcher la culline et la neddylation va permettre l'assemblage du complexe SCF *de novo* (Zhang, et al. 2008a). CAND1 doit agir de manière coordonnée avec le signalosome puisque l'un comme l'autre, ils ont un rôle dans le désassemblage du complexe SCF. En effet, un mutant d'une des sous-unités du signalosome, CSN1, présentant de faibles altérations phénotypiques, montre de grandes perturbations dans sa

croissance et son développement lorsque cette mutation est combinée à une mutation du gène *CAND1*. A l'inverse du signalosome, CAND1 ne possède pas d'activité déneddylase et un mutant *cand1* n'engendre pas une instabilité des protéines à F-box. Zhang et ses collaborateurs ont alors émis l'hypothèse que CAND1 minimise l'ubiquitinylation des protéines à F-box chez le mutant faible *csn1* en permettant le désassemblage du complexe SCF qui est alors hyperactif dans son activité d'ubiquitinylation. Chez la levure, une activité de déubiquitinylation associée au signalosome a été caractérisée et est portée par la protéine UBP12 (Ubiquitin-specific Protease 12) qui empêche la dégradation des protéines à F-box (Wu, et al. 2006). Ainsi, le système est verrouillé pour qu'il y ait le moins de perte possible au niveau des composants du complexe SCF. L'action combinée de déneddylation de CSN5 suivie de la dissociation du complexe SCF due à la fixation de CAND1, et de déubiquitinylation d'UBP12 permet de préserver l'intégrité des composants de ce complexe afin que l'assemblage du complexe SCF puisse se produire rapidement en réponse aux besoins de la cellule.

Dans la même dynamique de réponse rapide aux besoins de la cellule, des structures nucléaires particulières ont été caractérisées comme des lieux de dégradation protéolytique active. Ces structures portent des noms différents selon les études, des clastosomes (du grec «klastos» qui signifie rompre et «soma» qui signifie corps), des conglomérats ou encore, des corps nucléaires protéiques. Chez l'homme, ces structures ou «spots» nucléaires ont été caractérisés dans les cellules HeLa par leur composition particulière correspondant à un mélange de molécules d'ubiquitine, de protéasome 26S et de substrats du protéasome tels que des facteurs de transcription. Ces corps nucléaires sont des structures dynamiques qui s'assemblent transitoirement dans le noyau lorsque la protéolyse est activée et disparaissent lorsque la fonction du protéasome est inhibée. Chez l'homme, ces structures correspondent à des complexes de 0,2 à 1,2 µm enveloppés d'une «capsule» leur donnant l'apparence d'une structure torique. Ces complexes sont rares en condition normale suggérant qu'ils ne sont pas nécessaires pour le fonctionnement du protéasome mais leur quantité augmente rapidement en condition d'infection virale, de stress ou d'une stimulation hormonale (Lafarga, et al. 2002). Chez Arabidopsis, ce concept d'une structure dynamique composée du protéasome 26S, des complexes SCF ubiquitine-ligase et d'une partie du signalosome a été alimenté par les résultats d'expériences de chromatographie d'exclusion. En effet, les diverses sous-unités de chacun de ces complexes se situent dans des fractions de haut poids moléculaire, correspondant à un complexe d'environ 670 kDa. En revanche, le signalosome, même après un traitement des tissus avec un agent pontant n'apparaît pas forcément complet au sein de ce «super complexe».

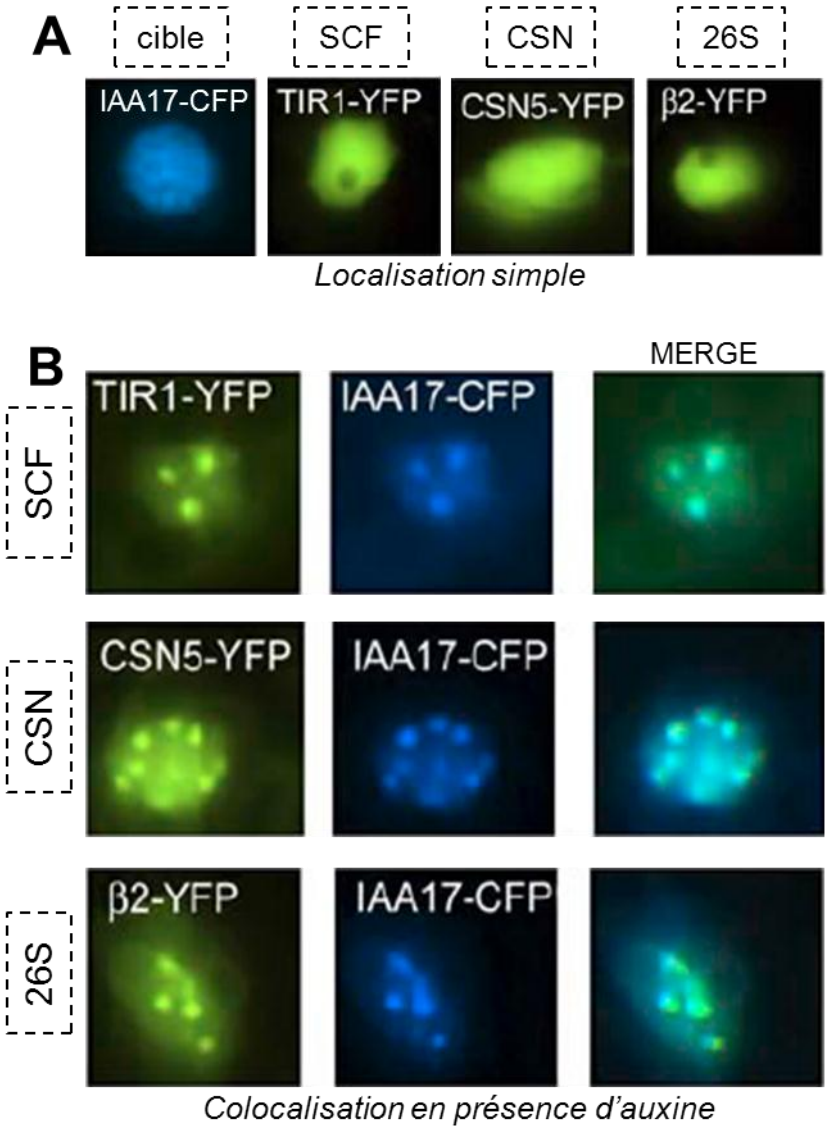


Figure 13: Formation de clastosomes lors de la colocalisation des composants de la machinerie protéolytique et d'un substrat, IAA17, répresseur transcriptionnel de la réponse à l'auxine sous stimulation auxinique (d'après Tao, et al. 2005).

(A) Les protéines appartenant aux complexes SCF (protéine à F-box TIR1), CSN (CSN5) et protéasome 26S (sous-unité β2 du complexe catalytique 20S) sont fusionnées à la protéine fluorescente YFP et exprimées dans des protoplastes d'Arabidopsis. Le répresseur transcriptionnel IAA17, reconnu par la protéine à F-box TIR1, est fusionné à la protéine fluorescente CFP. Toutes ces protéines sont localisées dans le noyau des protoplastes. La fluorescence associée à la protéine IAA17-CFP a tendance à se répartir de façon non uniforme dans la cellule faisant apparaître des «spots» dans le noyau.

(B) Les protéines TIR1, CSN5 et la sous-unité β2 fusionnées à la YFP sont co-exprimées avec la protéine IAA17-CFP. Les protoplastes sont incubés durant 30 min avec 10 µM d'AIA avant observation. Chaque expérience montre une colocalisation des protéines TIR1-YFP, CSN5-YFP et β2-YFP avec la protéine IAA17-CFP dans des structures nucléaires nommées clastosomes.

MERGE: superposition des deux images du noyau acquises en condition YFP et en condition CFP.

La découverte de ces structures dynamiques engendre de nouvelles hypothèses quant au mécanisme d'assemblage de la machinerie protéolytique. En effet, cette association peut refléter l'assemblage du signalosome avec le protéasome, le complexe E3 ubiquitine-ligase, voire même l'enzyme de conjugaison E2. Cet assemblage permettrait de faciliter la dégradation protéolytique des cibles ou de recruter le signalosome comme couvercle du protéasome à la place du couvercle habituel afin de contrôler la spécificité du substrat à dégrader (Peng, et al. 2003). Deux études ont mis en évidence la composition spécifique de ces clastosomes en fonction du substrat concerné, un facteur de transcription impliqué dans la réponse à l'acide abscissique et un répresseur transcriptionnel de la réponse à l'auxine, respectivement. En effet, le facteur de transcription ABI5 (**paragraphe III.3**) permettant la réponse à l'acide abscissique colocalise avec une protéine ubiquitine-ligase à domaine RING, COP1, dans des structures nucléaires apparentées à des clastosomes (Lopez-Molina, et al. 2003). La deuxième étude a montré que l'auxine est capable d'engendrer le regroupement de substrats tel que le répresseur transcriptionnel IAA17 (**paragraphe III.2**), le complexe ubiquitine-ligase associé, SCF^{TIR1}, et les complexes signalosome et protéasome (**figure 13**). Cependant, ces structures sont toujours observées lorsque ces différents acteurs de la machinerie protéolytique sont exprimés fortement par le biais de l'expression d'un transgène, ce qui suggère que ces structures nucléaires sont favorisées dans ces conditions par rapport aux conditions cellulaires normales. En effet, dans la cellule, des substrats tels qu'IAA17 sont très instables et faiblement visualisables par des techniques d'immunodétection et peu de constituants de la machinerie protéolytique sont détectés dans des «super complexes» protéiques suggérant que l'assemblage de cette machinerie est transitoire ou hautement dynamique. De plus, la colocalisation des complexes SCF^{TIR1}, du signalosome et du protéasome dans les clastosomes ne se fait ni spontanément, ni après induction par l'auxine mais seulement lorsqu'ils sont co-exprimés avec le substrat IAA17 en présence du signal inducteur auxine. La raison la plus probable de la formation des clastosomes est de compartimenter certains composants nucléaires fonctionnels afin que la cellule puisse supporter de multiples activités en parallèle (Tao, et al. 2005).

III Rôles physiologiques du complexe signalosome.

De par la grande variabilité des familles de gènes ASK et des gènes codant les protéines à F-box, les complexes SCF ubiquitine-ligase, vont intervenir dans de multiples processus cellulaires. Ne pouvant donc pas tous les citer, nous nous intéresserons aux études ayant caractérisées le rôle du signalosome dans le développement de la plante d'une manière générale et aux complexes SCF intervenant dans la régulation de la réponse aux auxines et aux gibbérellines. Puis, nous aborderons le cas d'autres complexes CRL qui ont un rôle

prépondérant dans la réponse à l'acide abscissique, la réponse à la lumière et dans la réparation des lésions de l'ADN et qui sont régulés par le signalosome.

1. Caractéristiques phénotypiques des mutants *csn*.

La caractérisation des mutants *csn* a permis d'identifier de nombreux défauts phénotypiques.

Outre une réponse altérée à la lumière, les mutations perte-de-fonction dans les gènes codant les sous-unités du signalosome entraînent une létalité au stade plantule, ce qui limite la connaissance du rôle du complexe signalosome dans le développement de la plante. Deux études datant de 2001 d'une même équipe, réalisées chez Arabidopsis, ont permis de détailler les premières altérations phénotypiques dues à la perte-de-fonction des sous-unités CSN3 et CSN6 (Peng, et al. 2001a; Peng, et al. 2001b). En effet, en générant des lignées surexprimant le gène *CSN3*, les auteurs ont obtenu des lignées de cosuppression du gène *CSN3*, et ont par la suite généré des lignées «anti-sens» pour le gène *CSN6*. Ces lignées sous-exprimant les gènes *CSN3* ou *CSN6* sont viables tout au long de leur développement. Les plantules déficientes peuvent présenter un, trois ou quatre cotylédons et peuvent être dépourvues de racines. Elles ont des difficultés à mettre en place des feuilles et présentent une expression plus faible du gène *SHOOTMERISTEMLESS* (*STM*). Alors que chez les plantes de type sauvage, les feuilles sont en forme de spatule, dentelées et positionnées deux à deux d'après une phyllotaxie spiralée, les feuilles des plantes déficientes ont des pétioles très longs et très étroits se terminant par des limbes également étroits, parfois les feuilles s'enroulent sur elles-mêmes. Au niveau de la mise en place du méristème inflorescentiel, la phyllotaxie est affectée puisque les méristèmes floraux peuvent tous émerger à partir d'un même point au niveau de la tige et, d'une manière générale, ne présentent pas de plan d'organisation précis. La réduction de la taille des axes floraux donne un phénotype proche d'une structure en capitule. Les défauts au niveau du développement floral ne sont pas très sévères, mais la diversité des phénotypes est relativement importante. Ainsi, des problèmes de terminaison florale avec la formation d'un gynécée dans un autre gynécée et des carpelles non fusionnés peuvent être observés. Il existe également des problèmes d'identité des organes avec des transformations homéotiques voire l'absence totale de certains organes. La formation d'organes ectopiques est également observée. Des carpelles peuvent se développer sur des sépales et des structures apparentées à des ovules se développent sur des structures ressemblantes à des sépales sans la présence des autres organes. De plus, les fleurs peuvent également présenter un nombre réduit des sépales, pétales et étamines.

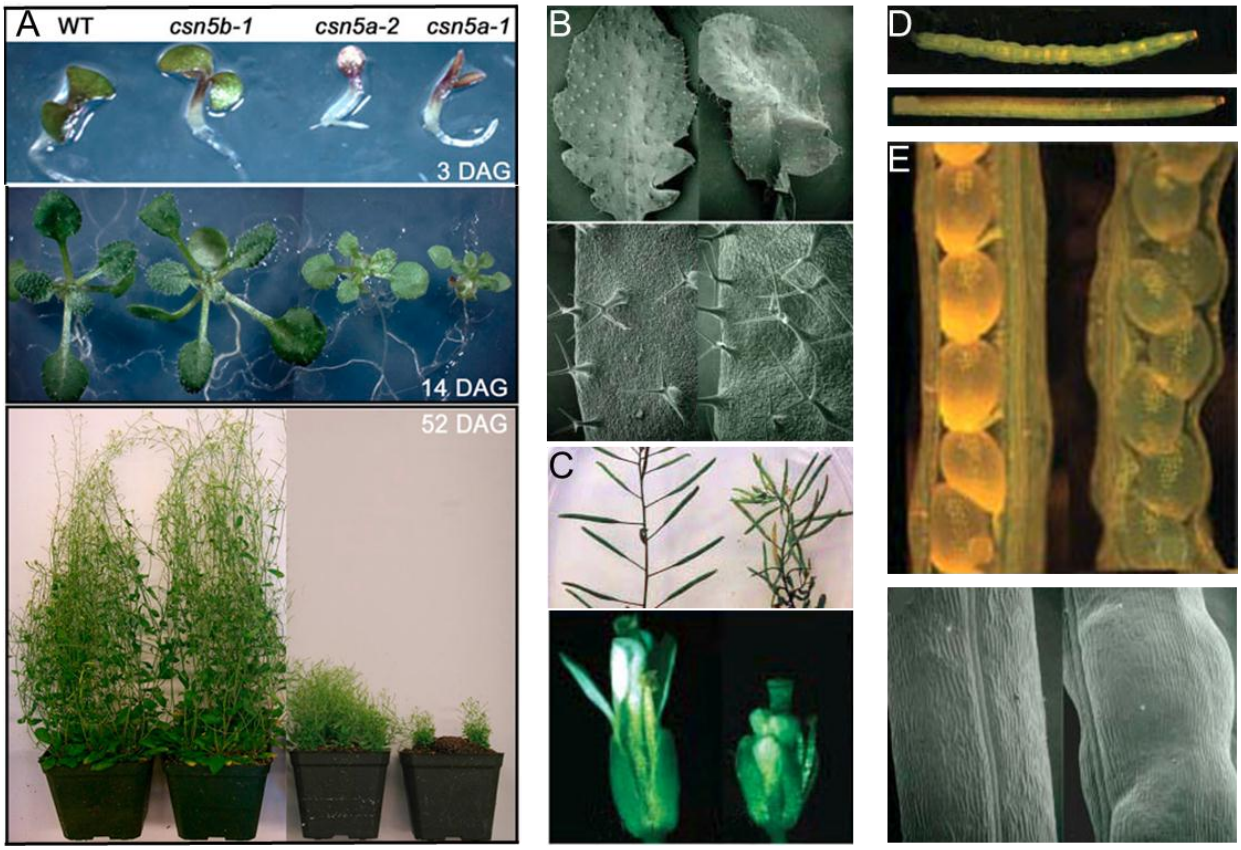


Figure 14: Phénotypes des mutants d'insertion *csn5a* et *csn5b* (A) et effets des mutations dans le domaine JAMM de CSN5A chez un mutant *csn5b* (B, C, D et E) (d'après Gusmaroli, et al. 2004 et 2007).

(A) Les mutants *csn5a* présentent un phénotype anthocyané 3 jours après germination (3 DAG) et possèdent un fort retard de croissance encore plus marqué pour le mutant *csn5a1*.

(B à E) La mutation concerne l'aspartate du domaine JAMM de CSN5A converti en asparagine. De nombreux défauts phénotypiques apparaissent (à droite ou en haut pour (D)) par rapport au sauvage (à gauche ou en bas pour (D)). Au niveau des feuilles, la dentelure foliaire est altérée ainsi que la densité des trichomes (B). Les inflorescences sont plus petites et plus condensées tout comme la fleur qui laisse exposer le style (C). Les siliques sont aussi plus petites et bosselées de l'extérieur, ceci est vraisemblablement dû à un manque d'espace pour les graines (D et E).

Des mutations dans le domaine JAMM de la sous-unité CSN5A montrent des phénotypes similaires, une rosette plus petite que celle de la plante de type sauvage, des pétioles plus petits et des feuilles qui présentent une hyponastie prononcée (**figure 14B**). La plante adulte est, dans son ensemble, plus petite que la plante de type sauvage (**figure 14A**) et présente un nanisme sévère ainsi qu'une augmentation du nombre d'inflorescences secondaires. Les entrenœuds sont beaucoup plus courts et les inflorescences secondaires émergent de façon désordonnée sur l'axe principal. Ces modifications phénotypiques donnent au mutant *csn* un aspect buissonnant lié à un défaut du processus de dominance apicale initié par l'auxine. Au niveau de l'inflorescence, les siliques, plus petites et déformées, sont positionnées sans plan d'organisation (**figure 14C**). En revanche, des mutations dans le domaine JAMM de la sous-unité CSN5B, ne montre pas de phénotype apparent suggérant que cette sous-unité CSN5B n'a aucune fonction essentielle dans le développement de la plante. En effet, la participation de la sous-unité CSN5B dans la constitution des complexes signalosome est minoritaire (Gusmaroli, et al. 2004). Il existe d'autres mutations alléliques, notamment des mutants d'insertion dans le gène *CSN5A* qui montrent les phénotypes décrits précédemment mais également un nombre inférieur de racines latérales et de poils absorbants. Ces mutants d'insertion sont viables et peuvent avoir une descendance homozygote pour la mutation. Il existe deux mutants d'insertion pour le gène *CSN5A* chez Arabidopsis, *csn5a-1* et *csn5a-2.* Ce sont des mutants perte-de-fonction. *csn5a-1* présente une insertion de l'ADN de transfert au tout début du premier exon et est caractérisé par une extinction presque totale de l'expression du gène *CSN5A. csn5a-2* qui a une insertion de l'ADN de transfert dans le quatrième intron perturbant partiellement l'épissage et résultant en la production partielle de l'ARNm complet présente un phénotype intermédiaire. Ces mutants ne présentent pas d'altérations de l'expression du gène *CSN5B*. En revanche, un double mutant *csn5a-1 csn5b-1* ou *csn5a-2 csn5b-1* présentent le phénotype caractéristique des mutants du signalosome à savoir une létalité au stade plantule, l'accumulation d'anthocyanes et une skotomorphogenèse affectée. Ces données montrent que la sous-unité CSN5B a un rôle dans le complexe signalosome même s'il semble mineur et reste mal connu (Dohmann, et al. 2005; Gusmaroli, et al. 2007).

Une partie des phénotypes floraux (**figure 14C**) peut être expliquée par la perturbation de l'action d'un complexe ubiquitine-ligase SCF contenant la protéine à F-box, UFO. L'observation des phénotypes des mutants *ask1*, *axr6-2* (pour lequel le gène codant la culline 1 a une mutation ponctuelle) et d'une plante possédant un RNAi dirigé contre le gène *RBX1*, révèle un nombre important de défauts phénotypiques au niveau des fleurs. En effet, lorsque les protéines du complexe SCF sont altérées, les fleurs présentent des malformations et des réductions du nombre des organes tels que les sépales qui sont

occasionnellement fusionnés, des pétales qui présentent eux-mêmes une taille réduite, des étamines qui présentent un filament plus court, les carpelles sont toujours au nombre de deux mais parfois ne sont pas fusionnés. En revanche, lorsque la fonction des protéines ASK1 et RBX1 est altérée, aux phénotypes précédemment décrits, s'ajoute l'apparition de structures chimériques pétales/étamines et de structures carpelloïdes dans les verticilles centraux de la fleur, suggérant que les gènes de la fonction B sont affectés dans ces territoires (définition du modèle «ABCDE» au **paragraphe IV.4**) (Ni, et al. 2004). Une précédente étude avait montré l'interaction génétique entre les gènes *ASK1* et *UFO* et entre les gènes *ASK1*, *LFY* et *AP3*. De plus, le gène *ASK1* régule l'expression précoce des gènes de la fonction B, *APETALA 3* (*AP3*) et *PISTILLATA* (*PI*) (Zhao, et al. 2001). Tous ces éléments suggèrent que la protéine à F-box UFO dont le gène interagit génétiquement avec le gène codant la culline 1, appartient à un complexe SCF, SCF^{UFO}, dont la fonction est de réguler les gènes de la fonction B en dégradant des répresseurs de ces gènes. Un mutant faible *csn1* montre, lui aussi, un développement floral aberrant accompagné d'une diminution de l'expression du gène *AP3*. Les sous-unités du complexe signalosome sont exprimées dans toute la fleur si l'on se base sur la localisation des protéines CSN4 et CSN6. Ces sous-unités s'accumulent d'abord dans les verticilles 2 à 4 et de façon très intense dans les noyaux. Puis, au cours du développement de la fleur, CSN4 et CSN6 s'accumulent dans les tissus sporogènes au niveau des étamines et dans les carpelles avant de se concentrer au niveau du replum dans le gynécée et dans les cellules du tapetum dans les anthères. Il a été montré que la protéine UFO interagit avec les sous-unités du SCF (culline 1, ASK1) et le complexe signalosome *in vivo*. Ainsi, le complexe SCF^{UFO}, régulé par le signalosome, est nécessaire à l'activation de l'expression du gène *AP3* dans la fleur (Wang, et al. 2003).

Le complexe SCF^{UFO} est le seul complexe SCF identifié directement dans la mise en place d'organes. L'intervention du complexe signalosome dans la régulation de l'activité de ce complexe SCF est fortement suspectée compte-tenu des arguments précédemment cités. Une démarche intellectuelle similaire permet de penser que d'autres phénotypes observés chez les mutants *csn* peuvent être expliqués par le rôle du complexe signalosome dans la réponse à certaines phytohormones et à des signaux extérieurs tel que la lumière.

2. Implication du signalosome dans la régulation des complexes SCF permettant la réponse aux phytohormones auxine et gibbérellines.

Signalosome, complexe ubiquitine-ligase SCF^{TIR1} et les auxines.

Les auxines sont tout particulièrement impliquées dans le recrutement de la machinerie protéolytique pour initier la réponse de la cellule et cette relation a été résumée par Calderon-Villalobos *et al.* (2010).

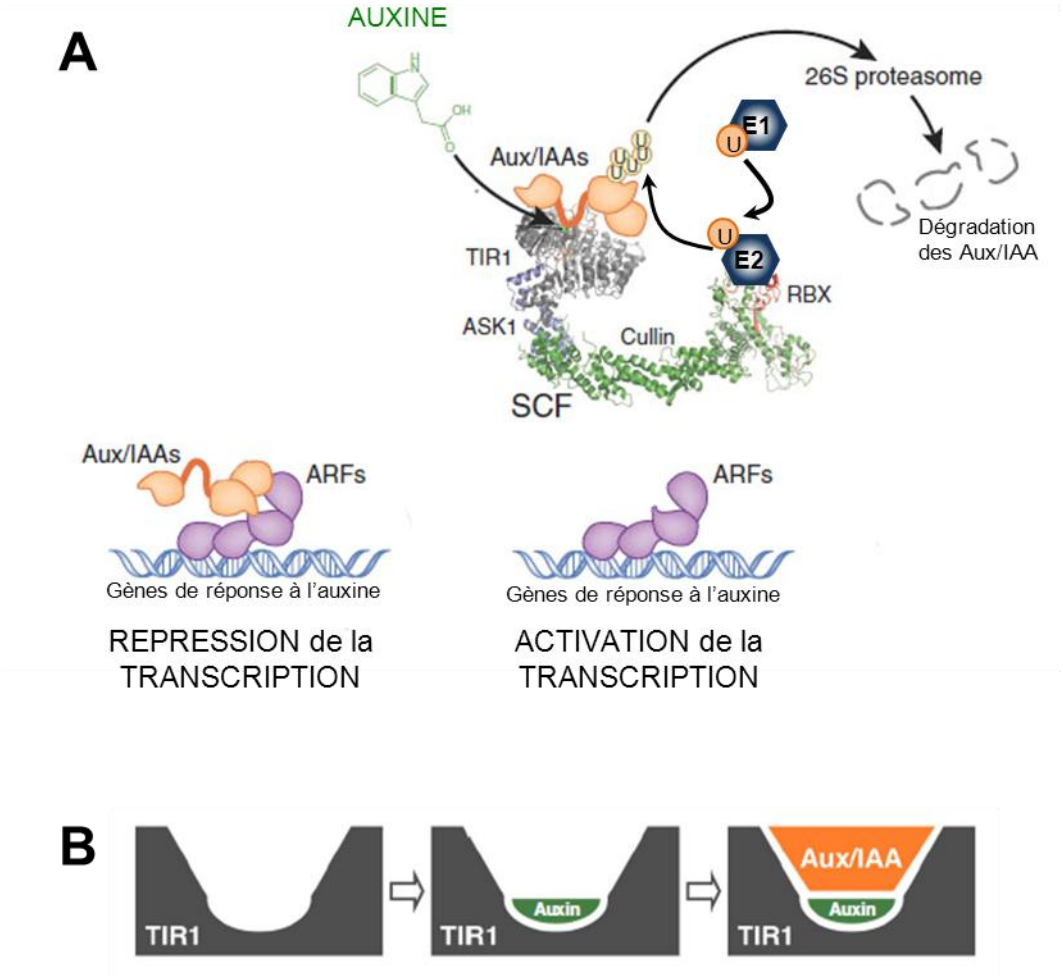


Figure 15: Dégradation des Aux/IAA par le complexe SCF^{TIR1} en présence d'auxine (A) et modèle impliquant l'auxine comme une «glue» moléculaire entre le récepteur TIR1 et le co-récepteur Aux/IAA (B) (d'après Santner, et al. 2009 et Tan, et al. 2007).

Dans les années 1980, de nombreux mutants insensibles à l'auxine ont été caractérisés et le clonage successif des gènes correspondants a permis d'identifier leur fonction et pour certains, leur implication dans la machinerie protéolytique.

Ainsi, le gène *AXR1* (Auxin Resistant 1) code une protéine qui forme un hétérodimère avec une autre protéine donnant un complexe enzymatique E1 qui transfère l'ubiquitine à l'enzyme E2 RCE1 (RUB1-Conjugating Enzyme 1). Le gène *AXR6*, comme nous l'avons indiqué précédemment, code la sous-unité culline 1. La plus grande avancée dans la caractérisation de l'implication de la machinerie protéolytique dans la réponse à l'auxine a été la caractérisation de la protéine TIR1 (Transport Inhibitor Response 1) qui est une protéine à F-box de la famille des protéines à LRR (Leucine Rich Repeat).

De façon intéressante, les Aux/IAA, répresseurs transcriptionnels de la réponse à l'auxine, ne sont pas dégradées en présence d'un inhibiteur du protéasome, le MG132, bien que le signal auxinique soit lui-même présent. Ce résultat suggère que la dégradation des protéines Aux/IAA est dépendante de la voie UPS. Ainsi, la protéine IAA7 est stabilisée chez des mutants *tir1*. Il a été montré que les protéines Aux/IAA interagissent avec le complexe SCF^{TIR1} (complexe SCF possédant la protéine à F-box TIR1) par leur domaine II afin d'être dégradées par le système protéolytique protéasome-dépendant. La fixation des Aux/IAA au SCF^{TIR1} se fait donc grâce à la protéine TIR1, et est favorisée en présence d'auxine (**figure 15A**) (Gray, et al. 2001). L'équipe de Dharmasiri a effectué une expérience de co-immunoprécipitation et a montré que l'interaction entre TIR1 et les Aux/IAA ne nécessite pas de modification d'un des deux partenaires, ce qui est pourtant courant pour le substrat d'une enzyme ubiquitine-ligase. Mieux encore, il apparaît que l'auxine se fixe directement sur le complexe SCF^{TIR1}. Etant donné que les trois protéines RBX1, CUL1 et ASK1 sont communes à tous les complexes SCF, il paraît probable que c'est TIR1, spécifique de la réponse à l'auxine, qui la fixe. Il existe cinq protéines, AFB 1 à 5 (Auxin Signaling F-box 1-5), homologues de TIR1 chez Arabidopsis. Les domaines composant ces protéines sont très conservés notamment les 18 motifs LRR permettant à AFB1, 2 et 3 d'interagir avec les autres composants du SCF, ASK1 et CUL1. Le domaine F-box de AFB1, 2 et 3 leur permet aussi de fixer les protéines Aux/IAA au même titre que TIR1, toujours en présence d'auxine (Dharmasiri, et al. 2005b). De plus, la perte de fonction des protéines TIR1 et AFB1, 2 et 3, empêche la liaison de l'auxine dans des extraits végétaux. Ces éléments conduisent à la mise en évidence d'une fonction supplémentaire pour ces protéines à F-box. En effet, ces dernières sont des récepteurs de l'auxine capables de la fixer de façon covalente (Dharmasiri, et al. 2005a).

Plus récemment encore, la cristallisation du complexe ASK1/TIR1 d'Arabidopsis dans des cellules d'insecte a apporté des éléments supplémentaires sur les modalités de cette

liaison (Tan, et al. 2007). Ce complexe, en présence du domaine II des Aux/IAA et de trois composés différents de la famille des auxines, fixe l'auxine dans une cavité générée à la surface de la protéine TIR1 au niveau des motifs LRR. Le domaine II des Aux/IAA vient fermer cette cavité, en étant ancré à la molécule d'auxine (**figure 15B**). Ainsi, l'auxine agit comme une «glue» qui permet de remplir les loges hydrophobes à la surface des protéines et d'augmenter l'affinité de TIR1 pour son substrat Aux/IAA. Il s'agit du premier modèle dévoilant la structure et la mécanistique d'un récepteur hormonal végétal. Ainsi, les protéines TIR1 et Aux/IAA agissent en tant que co-récepteurs dans la fixation de l'auxine.

Les mutants *csn* présentent de nombreuses anomalies du développement. Par exemple, le mutant *csn5a-1* présente une forte réduction de la taille de la plante et de la longueur des entrenœuds, et une augmentation du nombre d'inflorescences secondaires caractéristiques d'une perte de dominance apicale. Le phénomène de dominance apicale est régulé par la production d'auxine au niveau du méristème apical. Les mutants *csn5a-1*, tout comme les mutants *tir1*, sont insensibles à l'auxine et présentent une dégradation moins importante des protéines Aux/IAA. Une co-immunoprécipitation avec des anticorps dirigés contre la protéine TIR1 a permis d'isoler le complexe signalosome entier ainsi que les sous-unités CUL1 (culline 1) et ASK1 du complexe SCF. Ces éléments indiquent que le signalosome interagit avec le complexe SCF^{TIR1} et participe ainsi à l'ubiquitinylation des protéines Aux/IAA (Schwechheimer, et al. 2001). De plus, il apparaît que le mutant faible *csn2-5* montre une accumulation de la protéine IAA17/AXR3 en présence du stimulus auxinique, ce qui indique que l'activité du complexe SCF^{TIR1} est diminuée chez ce mutant. Comme cela a été évoqué au **paragraphe II.2**, le signalosome permet le désassemblage du complexe SCF et participe à la préservation des composants du complexe SCF de la dégradation protéolytique. En effet, chez le mutant *csn2-5*, les protéines CUL1 et TIR1 s'accumulent en moindre quantité, de l'ordre de 50% par rapport à la plante de type sauvage, ce qui explique la baisse d'activité du complexe SCF^{TIR1}. Lorsque le signalosome est inactif, le complexe SCF ne peut se dissocier ni recruter un nouveau substrat. Il devient alors hyperactif et ubiquitinyle les protéines CUL1 et TIR1 qui seront dégradées par le protéasome 26S. Ainsi, le signalosome est non seulement nécessaire au recyclage des composants du complexe SCF^{TIR1} mais surtout, l'action du signalosome est primordiale pour la stabilité des composants du complexe SCF^{TIR1} afin de les protéger de la protéolyse (Stuttmann, et al. 2009).

Signalosome, complexe ubiquitine-ligase SCF^{SLY1} et les gibbérellines.

En 2003, le gène *SLEEPY 1* (*SLY1*), a été identifié chez Arabidopsis et code une protéine à F-box. Une mutation dans le gène *SLY1* entraîne, chez Arabidopsis, un phénotype ressemblant à une perte de réponse aux gibbérellines.

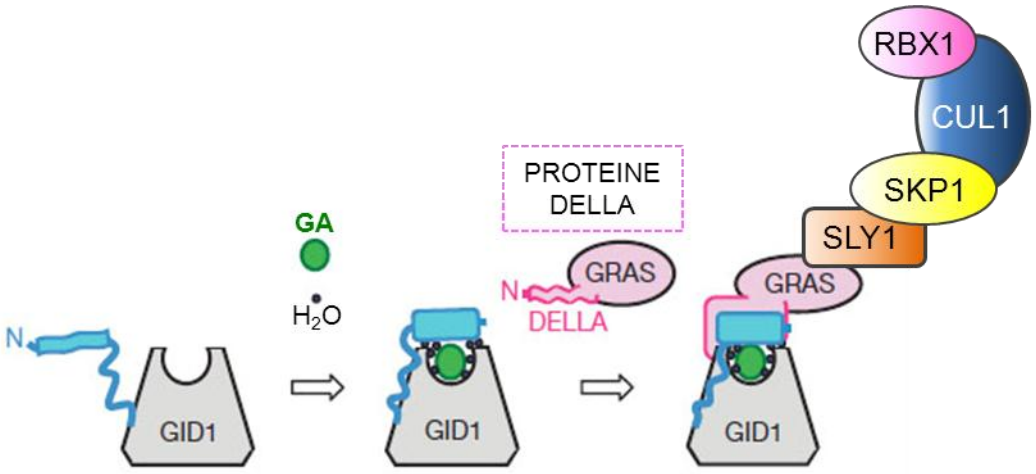


Figure 16: Mécanismes de perception des gibbérellines (d'après Murase, et al. 2008).

Après fixation de la molécule de gibbérellines, l'extrémité N-terminale du récepteur GID1 referme la cavité ayant fixé le ligand. Cette extrémité N-terminale de GID1 va pouvoir ainsi fixer le domaine DELLA des protéines DELLA et, potentiellement, entraîner une modification du domaine GRAS qui sera alors reconnu par la protéine à F-box SLEEPY1 (SLY1).

En effet, les mutants *sly1* présentent une forte accumulation de la protéine RGA même en présence de gibbérellines (McGinnis, et al. 2003). Plus précisément, la protéine SLY1 interagit avec les protéines GAI et RGA, régulateurs DELLA intervenant dans la réponse aux gibbérellines, *via* leur domaine GRAS. De la même manière, chez le riz, la protéine à F-box, GID2 (Gibberellin-Insensitive Dwarf 2) appartenant à un complexe SCF, est capable d'interagir avec la protéine SLR1 lorsque celle-ci est phosphorylée. Ces éléments indiquent que les complexes SCF^{SLY1} et SCF^{GID2}, chez Arabidopsis et chez le riz respectivement, sont capables d'induire la dégradation des protéines DELLA en présence de gibbérellines, afin de permettre la réponse à ces phytohormones (Dill, et al. 2004; Gomi, et al. 2004). En revanche, le domaine DELLA de ces protéines est nécessaire à leur dégradation mais pas à leur interaction avec la protéine à F-box, ce qui suggère potentiellement l'intervention d'un autre partenaire conduisant à la dégradation des protéines DELLA.

A l'inverse de la signalisation auxinique, ce ne sont pas les protéines à F-box, SLY1 ou GID2, qui vont servir de récepteur à la molécule de gibbérellines. Le premier récepteur aux gibbérellines a été identifié chez le riz, il s'agit de la protéine GID1, une protéine nucléaire qui présente des similarités avec des protéines lipases sensibles aux hormones. GID1 est capable d'interagir avec la protéine SLR1 en présence de gibbérellines, ce qui propose un nouvel élément pour le mécanisme de dégradation des protéines DELLA (Ueguchi-Tanaka, et al. 2005). Chez Arabidopsis, trois gènes orthologues du gène *GID1* ont été identifiés, *AtGID1a*, *b* et *c*. La protéine AtGID1b semble être la plus sensible aux gibbérellines puisqu'elle nécessite un dixième seulement de la quantité nécessaire aux deux autres protéines pour fixer les protéines DELLA. Ces trois protéines sont capables de complémenter le phénotype du mutant *gid1* chez le riz (Nakajima, et al. 2006). Il existe cependant un rétrocontrôle négatif puisque les gibbérellines diminuent l'expression des trois gènes *GID1* chez Arabidopsis. Par contre, les gibbérellines favorisent l'interaction de GID1 avec les protéines DELLA *via* leur domaine DELLA et la fixation des gibbérellines par GID1 augmente l'interaction entre la protéine DELLA, RGA, et la protéine à F-box, SLY1 (Griffiths, et al. 2006). Par ailleurs, un triple mutant des trois gènes *GID1* conduit à une accumulation des protéines DELLA suggérant que ces protéines GID1 sont nécessaires à la dégradation des protéines DELLA.

Le dernier modèle proposé pour la dégradation des protéines DELLA liée à la perception des gibbérellines a émergé grâce à la cristallisation d'un complexe ternaire d'Arabidopsis contenant GID1a, une molécule de gibbérellines et l'extrémité N-terminale de la protéine GAI. GID1a est capable de fixer la molécule de gibbérellines dans une cavité refermée par l'extrémité N-terminale de GID1a et ce domaine N-terminal de GID1a, est capable de recruter le domaine N-terminal de la protéine GAI. L'extrémité N-terminale de la protéine

GID1a est capable d'induire un changement de conformation de l'extrémité N-terminale des protéines DELLA, notamment au niveau du domaine GRAS. Cette modification entraînerait la reconnaissance des protéines DELLA par la protéine à F-box afin d'être dégradées (**figure 16**).

Alors que l'auxine sert de «glue moléculaire» capable d'associer un substrat à la protéine F-box correspondante, les gibbérellines sont des effecteurs allostériques capables d'induire des changements conformationnels afin de stimuler la reconnaissance du substrat par la protéine à F-box (Murase, et al. 2008).

Depuis que la caractérisation physiologique de l'interaction du complexe signalosome avec le complexe SCF^{TIR1} a été faite, il est supposé que le signalosome est capable d'interagir avec tous les complexes ubiquitine-ligase de type CRL. Cependant, l'implication de chaque complexe SCF dans les phénotypes observés chez les mutants *csn* n'est pas encore bien établie. Le rôle du signalosome dans les processus physiologiques liés à l'activité du complexe SCF^{SLY1} a été observé chez Arabidopsis. En effet, d'une manière générale, les mutants *csn* ont une sensibilité réduite aux gibbérellines et montrent une accumulation de la protéine RGA. De plus, la perte d'expression des gènes *RGA* et *GAI* permet de restaurer, en partie, une germination correcte chez les mutants *csn* et une croissance correcte chez un mutant *csn5*. La réponse aux gibbérellines est bloquée chez les mutants du signalosome et l'importance de ce blocage dépend du degré de perte de fonction du complexe signalosome chez ces différents mutants. Enfin, le manque de réponse aux gibbérellines est directement proportionnel à l'accumulation de la protéine RGA. Tous ces éléments indiquent que le signalosome participe activement à la réponse aux gibbérellines médiée par le complexe SCF^{SLY1} (Dohmann, et al. 2010). Cependant, la protéine RGA n'est que partiellement stabilisée dans les mutants les plus sévères du signalosome, alors que chez le mutant *sly1*, la protéine RGA est complètement stabilisée. Ceci suggère que le signalosome n'est pas tout à fait essentiel dans la voie de dégradation des protéines ciblées par les complexes SCF^{SLY1}. Cette hypothèse avait également émergé lors de travaux sur le complexe SCF^{TIR1} et la réponse à l'auxine pour lesquels il avait été montré que la dégradation des protéines Aux/IAA n'est que partiellement abolie chez les mutants *csn* (Dohmann, et al. 2008b). Ces éléments soulèvent l'hypothèse que le signalosome et son activité de déneddylation ne sont pas essentiels pour l'activité d'ubiquitinylation des complexes SCF.

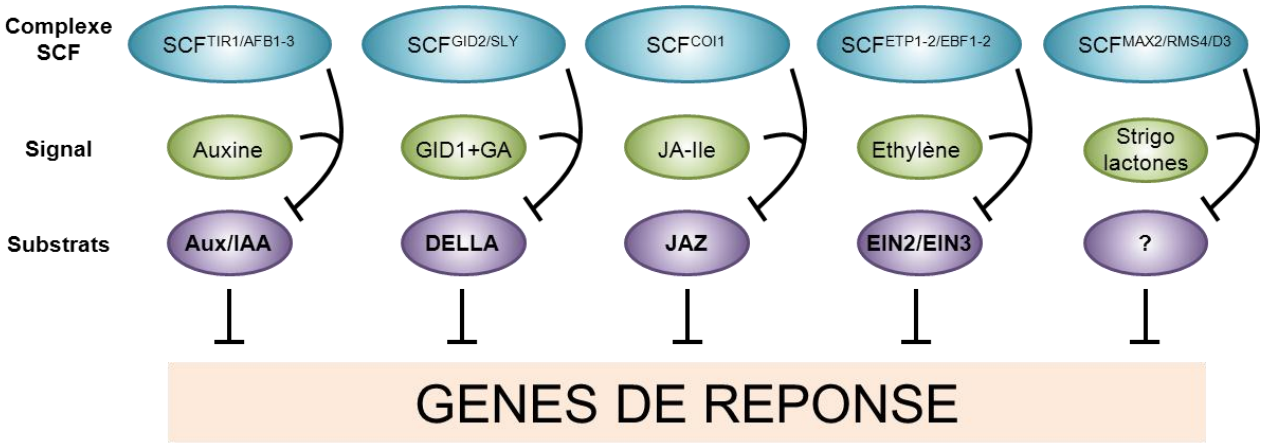


Figure 17: Bilan des réponses aux phytohormones faisant intervenir la machinerie protéolytique (d'après Santner, et al. 2009).

Au moins trois autres phytohormones font participer les complexes SCF dans leur voie de signalisation. Les jasmonates sont des molécules importantes dans la signalisation puisqu'elles déclenchent des réponses liées aux stress biotiques et abiotiques. L'acide jasmonique (JA) peut être conjugué à l'isoleucine (JA-Ile) ou être converti en composé volatile, le méthyl-JA. La voie de signalisation des jasmonates est très similaire à celle de l'auxine. En effet, les jasmonates induisent la dégradation de répresseurs transcriptionnels, les protéines JAZ (Jasmonate ZIM-domain), *via* l'action du complexe SCF^{COI1}. La protéine à F-box COI1 (CORONATINE-INSENSITIVE 1) est capable de fixer une phytotoxine structurellement ressemblante à l'acide jasmonique en présence des protéines JAZ. Chez la plante, c'est la molécule JA-Ile qui semble être la molécule active et qui elle aussi, est capable d'être fixée par le complexe COI1-JAZ (**figure 17**) (Santner, et al. 2009).

L'éthylène est une phytohormone présente sous forme de gaz, très bien caractérisée pour son rôle dans la maturation du fruit. Comme pour les cytokinines, l'éthylène est perçu dans la plante par un système à «deux-composantes» présent sur la membrane du réticulum endoplasmique et dont la protéine EIN2 (ETHYLENE INSENSITIVE 2) fait partie. En aval du système de perception de l'éthylène, une famille de facteurs de transcription est activée dont la protéine EIN3. Deux couples de protéines à F-box participent à la régulation de la quantité intracellulaire des protéines EIN2 et EIN3, ETP1 et 2 (EIN2 TARGETING PROTEIN 1 et 2) et EBF 1 et 2 (EIN3-BINDING F-BOX 1 et 2) respectivement. Ainsi, lorsque le taux d'éthylène est faible, les complexes $SCF^{ETP1/2}$ et $SCF^{EBF1/2}$ provoquent la dégradation des protéines EIN2 et EIN3 (Santner, et al. 2009).

Contrairement aux phytohormones qui viennent d'être décrites, la voie de signalisation des strigolactones a été caractérisée avant la découverte de la molécule. Les protéines à F-box MAX2 (MORE AXILLARY BRANCHES2) chez Arabidopsis (Stirnberg, et al. 2002), RMS4 chez le pois (Beveridge, et al. 1996) et DWARF3 chez le riz (Yan, et al. 2007) participent toutes trois à une voie de signalisation permettant de contrôler la ramification des plantes et de limiter la croissance des bourgeons chez le pois. Très récemment, deux études, Gomez-Roldan *et al*. (2008) et Umehara *et al*. (2008) ont permis d'identifier la famille de molécules activant cette voie de signalisation; il s'agit des strigolactones, dérivés des caroténoïdes (Gomez-Roldan, et al. 2008; Umehara, et al. 2008). La protéine à F-box MAX2 et sans doute ses orthologues, RMS4 et DWARF3, est intégrée dans un complexe SCF afin de réguler, en présence de strigolactones, divers processus développementaux tels que la ramification (Stirnberg, et al. 2007) et la réponse à la lumière (Shen, et al. 2007). Cependant, les cibles du complexe ubiquitine-ligase SCF^{MAX2} ne sont pas encore identifiées. Toutes les hormones ne mobilisent pas la machinerie de dégradation dépendante du protéasome ou du moins, pas de manière connue. L'acide abscissique fait partie des phytohormones pour

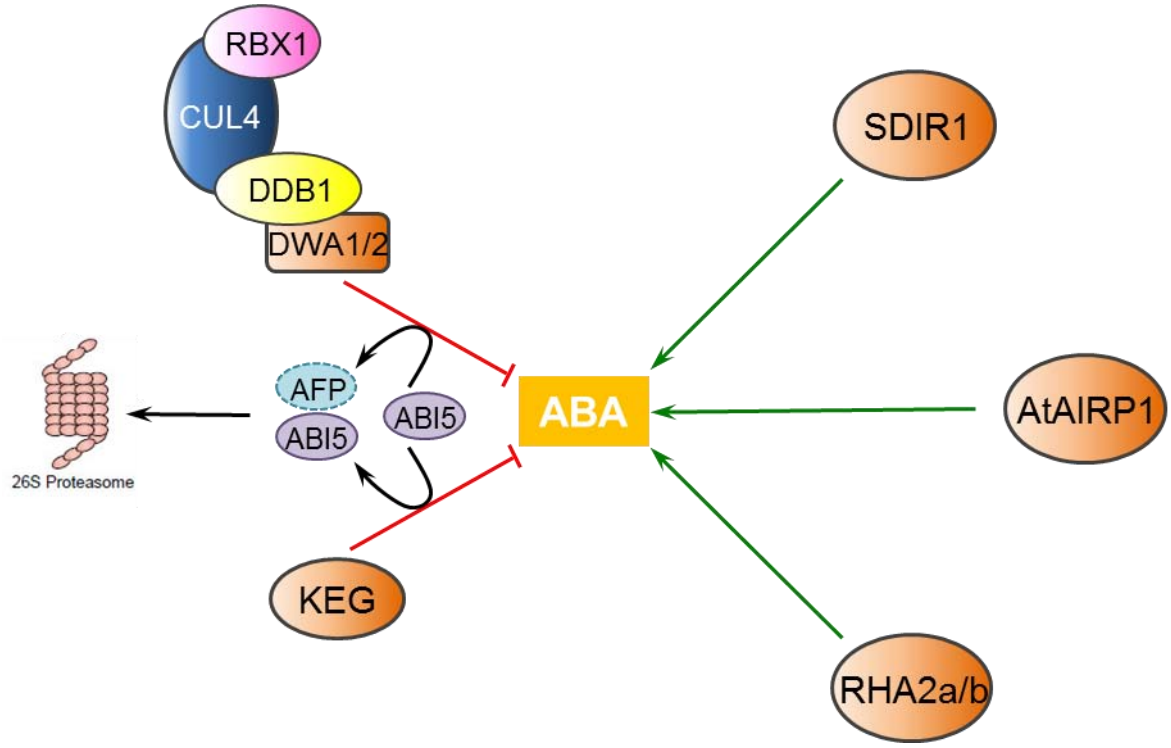


Figure 18: Bilan des diverses ubiquitines-ligases régulant la réponse à l'ABA.

Un complexe CRL a été identifié comme ayant un rôle négatif dans la réponse à l'ABA. Il contient la culline 4 (CUL4), la protéine adaptatrice DDB1 et les protéines à motif WD40, DWA1 et 2. Ce complexe cible le facteur de transcription répondant à l'ABA, ABI5. La protéine ubiquitine-ligase KEG cible aussi ce facteur de transcription, peut-être par l'intermédiaire de la protéine AFP capable d'interagir avec ABI5 dans des clastosomes.

En revanche, trois protéines ubiquitines-ligases, SDIR1, AtAIRP1 et RHA2a/b, ont un rôle positif dans la réponse à l'ABA. Cependant les cibles de ces protéines ne sont pas encore identifiées.

lesquelles l'implication de la machinerie protéolytique est suspectée mais la voie de signalisation de cette hormone est loin d'être entièrement élucidée.

3. Cas particulier d'une voie de signalisation non élucidée : la réponse à l'acide abscissique.

Le facteur de transcription, ABI5, est un régulateur central dans la signalisation conduisant à l'arrêt de croissance post-germination. En effet, des mutants *abi5* sont insensibles à l'ABA et ne sont pas capables d'arrêter leur croissance post-germination en présence d'un stress. L'équipe de Nam Hai Chua (Lopez-Molina, et al. 2003) a révélé une des pistes liant ABI5 à la machinerie de dégradation dépendante du protéasome. Notamment, une protéine interagissant avec ABI5, AFP (ABI Five binding Protein) est capable, uniquement si elle est exprimée avec ABI5, de colocaliser avec ABI5 dans ces clastosomes, structures nucléaires où les composants de la machinerie protéolytique sont regroupés. Ainsi, dans les clastosomes, COP1, une protéine à domaine RING impliquée dans la réponse à la lumière, colocalise aussi avec ABI5 et AFP. L'expression du gène *AFP*, comme celle du gène *ABI5*, est induite par la présence d'ABA durant la germination mais la présence de ces deux protéines est inversement proportionnelle. De plus, un mutant *afp* est hypersensible à l'ABA et ce, à cause de l'accumulation de la protéine ABI5. Ainsi, il a été proposé que la protéine AFP régule la réponse à l'ABA en induisant la dégradation protéasome-dépendante du facteur de transcription ABI5. Depuis cette étude, beaucoup de protéines ubiquitine-ligase à domaine RING ont été montrées comme impliquées dans la régulation de la quantité du facteur de transcription ABI5 (**figure 18**).

La plus caractérisée des ubiquitines-ligases impliquées dans la réponse à l'ABA est la protéine KEG (KEEP ON GOING). Cette protéine est un peu différente des protéines à domaine RING habituelles puisqu'elle possède en plus, un domaine «ankyrin» susceptible d'être impliqué dans des interactions protéine-protéine, un domaine Serine/Thréonine kinase (Ser/Thr), et un domaine composé de 12 répétitions du domaine caractéristique d'une autre classe d'ubiquitine-ligase, le domaine HECT. La protéine KEG est essentielle au développement de la plante puisqu'une mutation du gène *KEG* conduit à l'arrêt de croissance prématuré de la plantule juste après la germination, suggérant une hyperactivité de la voie de signalisation répondant à l'ABA. Plusieurs éléments ont conduit au fait que la protéine ubiquitine-ligase KEG est essentielle à la dégradation de la protéine ABI5 lorsqu'il n'y a pas de stress afin de permettre à la jeune plantule de se développer. En effet, les mutants *keg* accumulent une grande quantité d'ABI5 et ce, même en absence d'ABA exogène, mais la perte de fonction de la protéine ABI5 dans un mutant *keg* permet de restaurer une croissance de la plantule normale. De plus, la protéine KEG interagit avec la protéine ABI5 *in vitro* (Stone, et al. 2006). Plus récemment, il a été montré que la protéine

KEG ubiquitinyle le facteur de transcription ABI5 *in vitro*. Mais il a surtout été montré qu'en présence d'ABA, la protéine KEG est dégradée par le protéasome et que cette dégradation est dépendante du domaine RING de la protéine KEG, ce qui suggère que la protéine KEG est reconnue pour être dégradée à cause de son ubiquitinylation. L'activité kinase de KEG participe aussi à cette dégradation. En effet, la protéine KEG possède un domaine Ser/Thr kinase fonctionnel capable de s'autophosphoryler *in vitro* et de phosphoryler des substrats non spécifiques tels que la caséine et l'histone IIa mais cette activité de phosphorylation est requise pour l'ubiquitinylation et la dégradation de KEG. Ainsi, l'ABA, en initiant la dégradation de la protéine KEG, permet l'accumulation du facteur de transcription ABI5 et le ralentissement de la croissance de la plantule (Liu and Stone 2010).

Un complexe CRL semble être aussi impliqué dans la dégradation d'ABI5, il s'agit d'un complexe qui possède la sous-unité culline 4, la sous-unité RBX1 et une protéine un peu particulière, DDB1 (UV-Damaged DNA Binding protein 1), qui possède un domaine WD40. Ce complexe CRL interagit avec de nombreuses protéines à domaine WD40 *via* DDB1 afin de participer à la réponse de la plante à la lumière et aux lésions de l'ADN en particulier. Deux protéines à domaine WD40, DWA1 et DWA2 (DDB1 binding WD40 hypersensitive to ABA 1 et 2) participent à un complexe CRL contenant la culline 4 et ses partenaires afin de réguler négativement la réponse à l'ABA. Les mutants des gènes *DWA1* et *DWA2* sont hypersensibles à la présence d'ABA et montrent une forte induction de gènes de réponse à l'ABA, notamment du gène codant le facteur de transcription ABI5. Le fait que les protéines DWA1 et 2 interagissent *in vivo* avec ABI5 et que celui-ci soit moins dégradé dans des mutants *dwa1* et *2*, suggère que les protéines DWA1 et 2 servent de récepteurs reconnaissant le substrat ABI5 afin de l'ubiquitinyler et d'initier sa dégradation. De plus, les protéines DWA1 et DWA2 sont capables d'interagir *in vivo* et le double mutant *dwa1 dwa2* est hypersensible à l'ABA et au stress salin, ce qui indique que ces deux protéines peuvent agir ensemble dans la régulation négative de la réponse à l'ABA. De façon intéressante, les transcrits de ces deux gènes sont présents dans la graine sèche et leur expression augmente durant l'imbibition, ce qui concorde avec une action des protéines correspondantes au cours de la germination. En résumé, les protéines DWA1 et DWA2 en interaction avec un complexe CRL et la protéine KEG reconnaissent le même substrat, ABI5, mais aucune région protéique pouvant servir au ciblage d'ABI5 ne semble commune entre ces différentes protéines. Il a été émis l'hypothèse qu'un autre composant peut recruter ABI5 afin que celui-ci soit ciblé par ces différentes ubiquitines-ligases. Un des candidats proposé est la protéine AFP, capable de réguler négativement ABI5 et de colocaliser avec lui dans des sites nucléaires de dégradation active.

Une autre possibilité est que chacune de ces ubiquitines-ligases possède une spécificité d'action en fonction du tissu ou du stade de développement (Lee, et al. 2010).

Au moins quatre autres protéines à domaine RING ont été montrées comme étant impliquées dans la réponse à l'acide abscissique mais en ayant un rôle positif dans cette signalisation. La protéine SDIR1 (SALT- and DROUGHT-INDUCED RING FINGER 1) est une protéine E3-ligase. L'expression du gène *SDIR1* est ubiquitaire dans la plante et est induite par la sécheresse et le stress salin, pas par l'ABA. Cependant, une surexpression du gène *SDIR1* conduit à une hypersensibilité de la plante à cette phytohormone et la protéine ABI5, entre autres, est capable de complémenter l'insensibilité de plantes mutées pour le gène *SDIR1* (Zhang, et al. 2007). La protéine AtAIRP1 (Arabidopsis thaliana ABA-insensitive RING protein 1) est une protéine cytosolique à domaine RING qui possède une activité ubiquitine-ligase *in vitro*. L'expression du gène *AtAIRP1* est induite par la présence d'ABA et par un stress sécheresse et, comme pour SDIR1, les plantes surexprimant *AtAIRP1* sont hypersensibles à la présence d'ABA et aussi plus résistantes à la sécheresse (Ryu, et al. 2010). Enfin, les protéines RHA2a et RHA2b (RING-H2 E3 ligase) agissent de manière redondante afin de réguler positivement la réponse à l'ABA (**figure 18**). Ces deux protéines agissent en aval de la protéine phosphatase 2C, ABI2, et en parallèle des facteurs de transcription tels qu'ABI5. Il est supposé que ces quatre protéines ubiquitines-ligases initient la dégradation de substrats qui sont des régulateurs négatifs de la réponse à l'ABA. Cependant aucun substrat n'a encore été identifié (Li, et al. 2011).

Malgré la découverte de nombreuses protéines ubiquitines-ligases impliquées dans la réponse à l'acide abscissique, il n'y a pas d'études qui relatent un lien entre le complexe signalosome et ces protéines. Cependant, tous ces éléments proposent une large gamme de perspectives et de nombreuses voies à explorer en amont et en aval de ces ubiquitines-ligases.

4. Implication du signalosome dans la réponse de la plante à la lumière.

Comme indiqué précédemment, le signalosome a été découvert par la réponse qu'il induit lors de la réponse de la plante à la lumière. Les plantules exposées à la lumière vont avoir un hypocotyle court et deux cotylédons ouverts et chlorophylliens alors que celles qui grandissent à l'obscurité, vont avoir un long hypocotyle se terminant par les deux cotylédons fermés en une crosse apicale non chlorophyllienne. Le premier processus est nommé photomorphogenèse et donnera lieu à des plantules vertes alors que le second se nomme skotomorphogenèse induisant le développement de plantules étiolées. La perception de la lumière s'effectue par de nombreux photorécepteurs, phytochromes, cryptochromes, etc. qui vont être le point de départ de diverses voies de signalisation menant à un développement correct de la plantule en fonction des conditions lumineuses.

Les huit sous-unités du signalosome appartiennent à un groupe de gènes nommés *COP/DET/FUS* (*CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC/DETIOLATION/FUSCA*) identifiés par leur photomorphogenèse constitutive. Parmi ces gènes, *COP1*, *COP10* et *DET1* sont directement impliqués dans la régulation de la réponse à la lumière. COP1 a été identifié comme un répresseur de la photomorphogenèse dont la localisation subcellulaire est régulée par la lumière. En effet, la protéine COP1 est localisée dans le noyau des hypocotyles à l'obscurité. En revanche, cette localisation nucléaire diminue de façon drastique lorsque les plantules sont à la lumière. Ce changement de localisation est dépendant de la présence des photorécepteurs et du complexe signalosome. En effet, en absence des photorécepteurs, la quantité de la protéine COP1 dans le noyau augmente même en présence de lumière alors qu'en absence des sous-unités du signalosome, COP1 n'est pas nucléaire et ce, même à l'obscurité (Osterlund, et al. 1999). Plus récemment, il a été montré que la sous-unité CSN1 est responsable de la localisation nucléaire de COP1. Ces deux protéines sont capables d'interagir faiblement *in vivo* et l'expression de l'extrémité N-terminale de la protéine CSN1 est nécessaire et suffisante pour la localisation nucléaire de la protéine COP1 (Wang, et al. 2009). La première cible identifiée de COP1 est le facteur de transcription de type bZIP, HY5 (LONG HYPOCOTYL 5) qui est un régulateur positif de la photomorphogenèse en induisant l'expression de gènes de réponse à la lumière. COP1 et HY5 interagissent *in cellulo* dans ces structures déjà évoquées, les clastosomes. Alors que la protéine HY5 est 15 à 20 fois plus abondante dans des plantules exposées à la lumière que dans celles restées à l'obscurité, la quantité d'ARNm est seulement 2 à 3 fois plus importante entre les deux conditions. Ceci souligne le fait que la régulation transcriptionnelle du gène *HY5* peut contribuer à l'accumulation différentielle de la protéine HY5 mais qu'une régulation traductionnelle ou post-traductionnelle de la protéine est sûrement à l'origine de cette différence. En effet, la protéine HY5 est dégradée par la voie du protéasome et la présence du signalosome est nécessaire pour ce processus. De plus, la protéine COP1 possède trois domaines distincts, un domaine RING, une région contenant une «superhélice» et un domaine WD40, tous trois impliqués dans des interactions protéine-protéine. COP1 est donc potentiellement une E3 ubiquitine-ligase, grâce à son domaine RING, capable de cibler HY5 (Osterlund, et al. 2000). Cette hypothèse a été renforcée par la caractérisation de COP10, une protéine ayant de fortes homologies de séquence avec les enzymes E2. COP10 est capable d'interagir avec COP1 et avec le signalosome. Ce dernier permet d'assurer la stabilité de COP10 dans le noyau (Suzuki, et al. 2002).

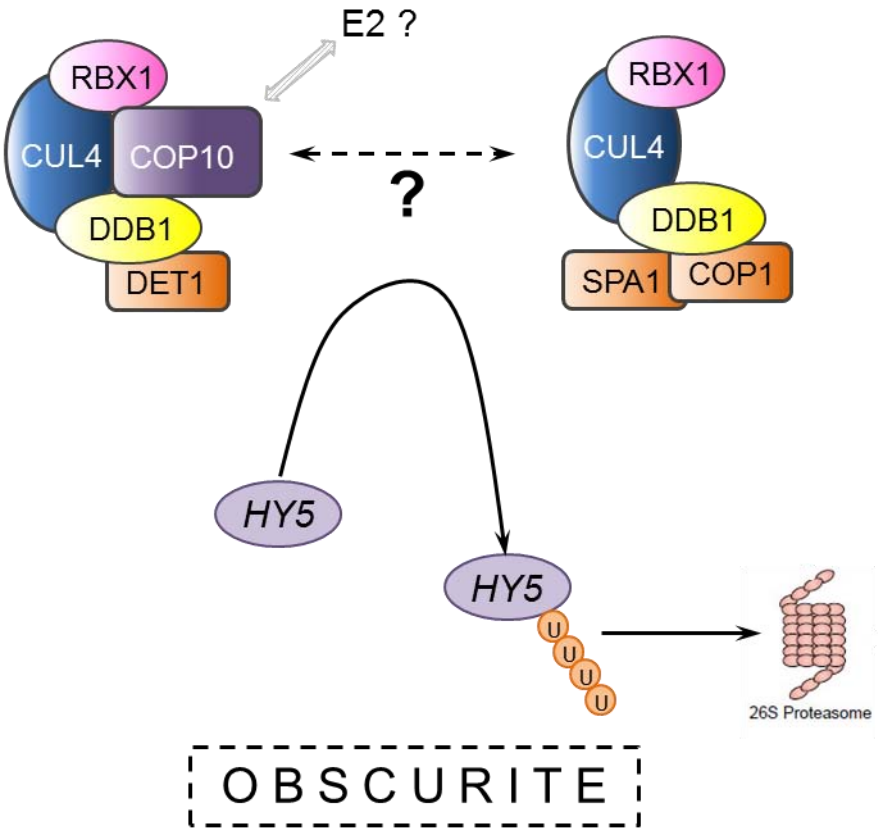


Figure 19: Régulation des facteurs de réponse à la lumière, en absence de lumière (d'après Chen, et al. 2010).

Deux complexes CRL participent à l'ubiquitinylation des facteurs de transcription favorisant la réponse à la lumière (HY5 par exemple). Ces deux complexes agissent de manière coordonnée mais leur cinétique d'action reste inconnue.

Des expériences de chromatographie d'exclusion ont montré que COP10 est élué dans la même fraction qu'un complexe d'environ 300 kDa différent du complexe signalosome. De la même manière, COP1 appartient à un complexe d'environ 700 kDa identifié dans des plantules à l'obscurité, différent du complexe signalosome et de celui auquel participe COP10. Cependant, l'association de ce complexe est indépendante du signal lumineux et de la présence du signalosome. SPA1 (SUPPRESSOR OF PHYA 1) est un répresseur nucléaire de la voie de réponse à la lumière médiée par le phytochrome A. SPA1 contient trois domaines dont deux ressemblant à ceux de COP1, une région constituée d'une «superhélice» et d'un domaine WD40. La protéine SPA1 peut être co-purifiée avec COP1 dans le complexe de 700 kDa et interagit avec ce dernier par la région correspondant à la «superhélice». Il apparaît que SPA1 module l'activité ubiquitine-ligase de COP1 sur le facteur de transcription HY5 (Saijo, et al. 2003). Enfin, le gène *DET1* code une protéine de 62 kDa dont la fonction est inconnue mais qui participe aussi à la réponse à la lumière en intégrant un complexe de 350 kDa contenant la protéine DDB1, déjà connue pour être associée à la culline 4 (Schroeder, et al. 2002). En fait, il a été montré que COP10, DDB1 et DET1 appartiennent au même complexe nommé CDD (**figure 19**).

Le premier complexe CRL identifié avec la culline 4 a été le complexe liant la culline 4, RBX1 et le complexe CDD afin de cibler des substrats impliqués dans la réponse à la lumière. COP1 n'est pas capable de s'associer au sein du complexe CDD. Cependant, il est capable d'interagir avec la culline 4 suggérant une association possible entre le complexe ubiquitine-ligase «CUL4-RBX1-CDD» et le complexe ubiquitine-ligase COP1, peut-être *via* une interaction entre COP1 et COP10. En revanche, l'activité du complexe «CUL4-RBX1-CDD» est essentielle à l'activité du complexe ubiquitine-ligase COP1 pour réprimer la photomorphogenèse. De plus, l'activité du complexe «CUL4-RBX1-CDD» dépend du cycle neddylation/déneddylation du signalosome et de la fixation de la protéine CAND1 (Chen, et al. 2006). Concernant le complexe «CUL4-RBX1-COP1-SPA1», les protéines COP1 et SPA1 possèdent toutes deux un domaine WD40 capable d'être reconnu par la protéine DDB1 en l'absence du complexe CDD suggérant que le complexe CDD, *via* sa sous-unité COP10, ne participe pas à l'interaction avec COP1 ce qui remet en cause l'existence d'un «super complexe». Le complexe «CUL4-RBX1-COP1-SPA1» est donc différent du complexe «CUL4-RBX1-CDD» mais agit de manière coordonnée avec celui-ci pour initier la réponse à la lumière chez la plante (Chen, et al. 2010) (**figure 19**). Ainsi, une nouvelle classe de CRL a été mise en évidence ouvrant la possibilité que des complexes CRL contenant la culline 4 puissent avoir d'autres rôles que celui associé à la réponse à la lumière. En effet, en parallèle de ces études, de nombreuses découvertes ont été faites sur le rôle des CRL «CUL4-RBX1» dans la réparation des lésions de l'ADN.

5. Signalosome, cycle cellulaire et ADN.

Cycle cellulaire et réparations des lésions de l'ADN.

Les mutants des sous-unités CSN des eucaryotes supérieurs arrêtent leur croissance très précocement au cours du développement. Comme nous l'avons vu, si le signalosome est déficient, les complexes ubiquitines-ligases le sont aussi et l'accumulation des substrats devant être dégradés peut être responsable de ce phénotype. Or, plusieurs études montrent que les mutants *csn* subissent de nombreuses lésions de l'ADN. Un des processus de réparation de l'ADN consiste à exciser les nucléotides affectés par l'action d'agents mutagènes tels que les rayons ultraviolets (voie NER pour Nucleotide Excision Repair). Ce processus fait intervenir deux protéines DDB1 et 2 possédant des motifs répétés WD40 et qui se dimérisent pour reconnaître les lésions sur l'ADN afin de recruter la machinerie de la voie NER. Chez l'homme, il a été montré que, par le biais de DDB1, la protéine DDB2 est associée à un complexe ubiquitine-ligase faisant intervenir la culline 4 et la sous-unité RBX1 (**figure 20**). Le signalosome interagit aussi avec ce complexe ubiquitine-ligase et régule ainsi la réponse induite par l'irradiation aux UV. En effet, chez des mutants des gènes codant les sous-unités CSN, la voie NER est altérée empêchant la réparation des lésions de l'ADN (Groisman, et al. 2003).

Le complexe CRL contenant la culline 4 diffère des autres CRL car ce n'est pas SKP1 qui sert de protéine adaptatrice mais DDB1, une protéine impliquée dans de nombreux processus cellulaires tels que la transcription, le cycle cellulaire, la mort cellulaire et le développement embryonnaire. Ainsi les multiples rôles de cette protéine peuvent s'expliquer par son implication dans un complexe ubiquitine-ligase. L'identification des substrats potentiels fixés par DDB1 a permis la caractérisation d'une famille de protéines contenant des motifs répétés WD40, «WDxR», nommées DCAF (DDB1-CUL4 ASSOCIATED FACTOR) ou DWD (DDB1 binding WD40 protein). Ainsi, les protéines DCAF sont essentielles à la fixation des substrats mais pas forcément suffisantes car d'autres facteurs ou des modifications post-traductionnelles des DCAF peuvent aussi avoir un rôle prépondérant dans la présentation du substrat à l'enzyme E2. Chez l'homme, il a été identifié 60 nouvelles DCAF dont 52 avec un motif WD40 (Lee and Zhou 2007) puis en 2008, 85 protéines à WD40 chez Arabidopsis et 78 chez le riz ont été identifiées par un motif de 16 acides aminés de type «WDxR» (Lee, et al. 2008). Chez Arabidopsis, onze de ces protéines interagissent directement avec DDB1 et peuvent ainsi servir à fixer les substrats. Deux exemples récents de DCAF chez Arabidopsis ont été identifiés, PRL1 (Pleiotropic Regulatory Locus 1) dont le substrat est AKIN10 (Arabidopsis SNF1 Kinase Homolog 10) et DCAF1 aussi identifiée chez l'homme. PRL1 est une protéine précédemment identifiée comme étant impliquée dans le contrôle de la réponse au glucose et à quelques phytohormones.

Cette protéine est capable de se lier à DDB1 et CUL4 mais aussi à AKIN10 et 11, deux membres d'une famille de kinases impliquées dans la signalisation métabolique. PRL1 inhibe *in vitro* l'activité kinase de AKIN10 et 11, lesquelles semblent être moins dégradées chez des mutants *prl1* (Lee, et al. 2008). DCAF1, chez l'homme, a été identifiée comme étant une protéine capable de lier une protéine virale du HIV-1, Vpr. Cette protéine Vpr recrute le complexe CRL «CUL4-DDB1-DCAF1» afin de conduire à la destruction de certains constituants cellulaires essentiels menant à l'arrêt du cycle cellulaire. Chez Arabidopsis, une mutation insertionnelle homozygote dans le gène *DCAF1* conduit à une mort de l'embryon. Des lignées de plantes ayant une cosuppression de ce gène présentent de multiples altérations phénotypiques, une phyllotaxie anormale, des feuilles de rosette plus petites mais plus abondantes, un développement irrégulier des nœuds et entrenœuds, des fleurs possédant des pétales en surnombre, etc. La protéine DCAF1 interagit préférentiellement avec la culline 4 neddylée et avec le complexe signalosome. En revanche, elle n'est pas associée au même complexe que la protéine CAND1, puisque cette dernière ne se fixe qu'aux cullines déneddylées. Ces derniers éléments concordent avec une activité ubiquitine ligase du complexe «CUL4-DDB1-DCAF1» même si les cibles de ce complexe ne sont pas encore identifiées (Zhang, et al. 2008b). De plus, le complexe CRL, «CUL4-DDB1-DET1-COP10» identifié, au préalable, comme étant impliqué dans la dégradation de régulateurs positifs de la photomorphogenèse à l'obscurité, semble être impliqué dans la voie de réponse aux lésions de l'ADN (**figure 20**). Chez des mutants *cul4*, *cop1* et *det1*, il existe une accumulation de cassures simple ou double brin suggérant que la voie de réparation des lésions ADN est défaillante chez ces mutants. Par ailleurs, l'orthologue de COP1 chez l'homme est important pour la régulation d'un facteur de transcription ayant un rôle suppresseur de tumeur, en réponse à l'activation de la voie de réparation des lésions de l'ADN.

Les cellules eucaryotes possèdent des protéines spécialisées dans la reconnaissance de lésions de l'ADN et dans leur réparation comme nous l'avons déjà vu avec DDB1. Parmi ces protéines, ATM (ATAXIA TELANGIECTASIA MUTATED) et ATR (ATM AND RAD3-RELATED) marquent les sites où se sont produits des doubles lésions de l'ADN en phosphorylant l'histone H2A. Ce processus active l'expression de gènes impliqués dans le cycle cellulaire tel que *WEE1* chez les plantes, un inhibiteur du cycle cellulaire. L'expression des gènes, *ATM*, *ATR* et *WEE1*, est induite chez des mutants *csn* suggérant que la voie de réponse aux lésions de l'ADN est activée chez ces mutants (Dohmann, et al. 2008a).

Les lésions de l'ADN provoquent des retards dans la progression du cycle cellulaire et ces retards sont facilement identifiables.

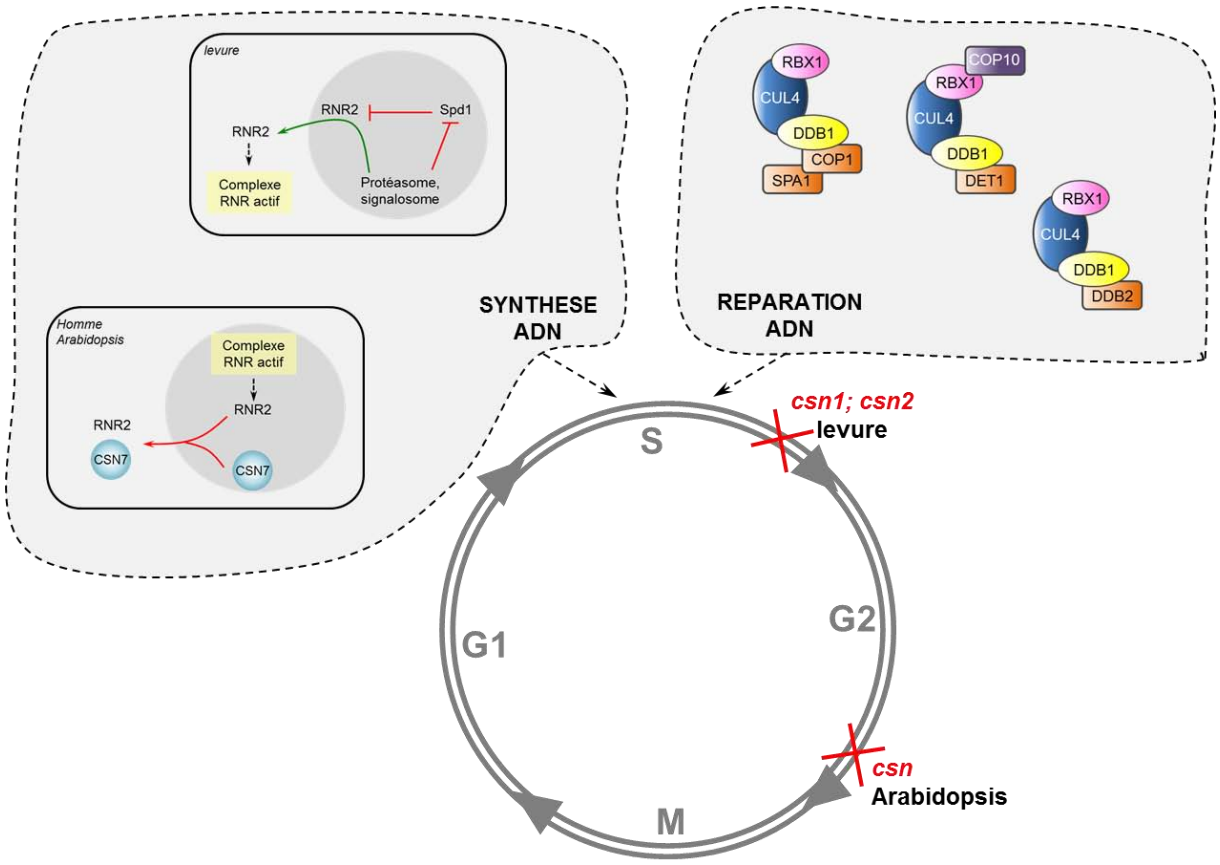


Figure 20: Impacts de la machinerie protéolytique sur la synthèse de l'ADN et dans la réparation des lésions ADN.

Selon l'organisme considéré, le signalosome va avoir des effets totalement opposés sur l'enzyme qui participe à la synthèse de nucléotides, le complexe RNR. Chez la levure, la machinerie protéolytique va participer à la dégradation de Spd1 qui inhibe la sous-unité RNR2. Chez l'homme et chez Arabidopsis, la sous-unité CSN7 exporte la sous-unité RNR2 dans le cytosol rendant le complexe RNR non fonctionnel.

Concernant la réparation des lésions de l'ADN, de multiples complexes CRL sont impliqués dont deux des complexes participant à la photomorphogenèse.

Les lésions de l'ADN se manifestent par un arrêt du cycle cellulaire caractéristique de certains mutants *csn*.

Ainsi, chez la levure *Schizosaccharomyces pombe*, les mutants *csn1* et *2* sont retardés dans leur progression durant la phase S, phase de synthèse de l'ADN. Chez Arabidopsis, les mutants *csn* présentent un retard dans la progression du cycle cellulaire durant la phase G2, phase au cours de laquelle le contenu en ADN est doublé et pendant laquelle la cellule croît, se préparant à donner deux cellules filles. La phase G2 fait l'objet de points de contrôle au cours desquels l'activation de ces mécanismes provoque le retard dans la progression du cycle cellulaire. Chez les mutants de levure, la protéine Spd1, répresseur de l'enzyme ribonucléotide réductase (RNR), n'est pas dégradée, ce qui empêche la synthèse de nucléotides durant la phase S. Un lien plus étroit a été établi entre la petite sous-unité du complexe RNR, RNR2, et CSN7. Chez la levure, la sous-unité RNR2 est retenue dans le noyau par la protéine Spd1 mais lorsque la cellule entre dans la phase S du cycle cellulaire ou lors de lésions de l'ADN, Spd1 est dégradée *via* la voie «protéasome-signalosome», laissant RNR2 quitter le noyau pour former un complexe RNR cytoplasmique actif (**figure 20**). Cependant, il n'a pas été identifié de protéine Spd1 dans d'autres organismes que la levure et il apparaît que la localisation du complexe RNR varie selon les organismes. En effet, chez l'homme et chez Arabidopsis, RNR2 est d'abord cytoplasmique puis nucléaire dans les cellules en division ou lors de lésions de l'ADN, ce qui suggère que le complexe RNR actif serait nucléaire. Il a été montré que l'extrémité C-terminale de la sous-unité CSN7, précédemment identifiée dans l'interaction avec CSN6, interagit avec la sous-unité RNR2 chez la levure et chez Arabidopsis. Dans des mutants *csn7* d'Arabidopsis, la protéine RNR2 est constitutivement nucléaire indiquant que la localisation subcellulaire de RNR2 est dépendante de CSN7 et, d'après les données précédemment évoquées, que CSN7 serait un régulateur négatif de l'activité du complexe RNR (**figure 20**). D'après cette hypothèse, chez les mutants *csn7*, l'activité du complexe RNR est augmentée, et donc ces mutants devraient avoir une forte synthèse de nucléotides menant à une augmentation de leur tolérance aux lésions de l'ADN. En effet, les plantules mutées pour le gène *CSN7* sont plus tolérantes à l'irradiation par des UV que des plantules sauvages (Halimi, et al. 2011). Comme dans l'étude de Dohmann et collaborateurs (2008), les mutants *csn7* montrent une activation constitutive des gènes impliqués dans la réparation de l'ADN suggérant que le complexe signalosome est un régulateur négatif de la réponse aux lésions de l'ADN médiée par le complexe RNR chez Arabidopsis.

Le signalosome, un régulateur transcriptionnel ?

Les diverses voies décrites tout au long de ce chapitre ont un point commun sur la nature des protéines ciblées par la machinerie de dégradation. En effet, beaucoup des protéines reconnues par les complexes CRL sont des régulateurs transcriptionnels ou même, des facteurs de transcription. Il n'est donc pas surprenant que les versions mutées des gènes

CSN entraînent de nombreux bouleversements au niveau du transcriptome d'un organisme même si cela se produit de manière indirecte. Cependant, la question qui émerge est de savoir si le signalosome possède une activité de régulateur transcriptionnel uniquement à travers son rôle au sein de la machinerie protéolytique ou si d'autres mécanismes sont impliqués. Plus précisément, est-ce que le signalosome peut réguler la transcription de manière directe? Plusieurs éléments ont démontré que le signalosome était capable de se fixer seul à l'ADN. En effet, chez l'homme, la partie N-terminale de la protéine CSN1 est capable d'aller dans le noyau et d'inhiber l'expression de certains gènes alors qu'elle s'associe de façon instable au complexe signalosome (Tsuge, et al. 2001). Lors de l'identification du complexe CRL «CUL4-RBX1-DDB1-DDB2» activé en cas de lésions de l'ADN, il a été montré que le signalosome associé au complexe CRL est localisé au niveau de la chromatine (Groisman, et al. 2003). D'autres études chez la Drosophile et dans les cellules humaines ont montré que les sous-unités du signalosome peuvent s'associer de manière stable à la chromatine (Chamovitz 2009). Chamovitz a récapitulé ces différents éléments et a souligné l'ambiguïté qui existe autour des sous-unités à domaine PCI. En effet, nous l'avons souligné précédemment, les sous-unités à domaine PCI possèdent à leur extrémité C-terminale, un domaine fortement homologue à des domaines identifiés dans la fixation à l'ADN. Or le signalosome possède six de ces motifs pouvant potentiellement être impliqués dans la fixation sur l'ADN.

Les diverses voies de signalisation auxquelles le signalosome appartient, soulignent l'importance de la participation de la machinerie protéolytique dans les mécanismes qui régissent la vie de la plante. Ce chapitre a décrit certaines de ces voies, les mieux caractérisées et les plus caractéristiques, mais il existe d'autres processus développementaux dans lesquels cette machinerie intervient. L'action du complexe signalosome dans les voies de réponse aux phytohormones et dans les mécanismes de division cellulaire n'a jamais été illustrée au sein d'une structure comme le méristème, hautement organisée, strictement et finement régulée, caractérisée par des divisions actives sous le contrôle des phytohormones.

IV Développement du méristème apical et implication des phytohormones.

La croissance en continu des plantes se réalise grâce à l'existence de cellules souches. D'une manière générale, les cellules souches sont connues pour leur capacité à renouveler leur propre pool et à générer les cellules différenciées. Pourtant, il est important de noter que la définition de cellules souches dans le monde animal et dans le monde végétal, n'est pas la même. Bien sûr, il existe des points communs, à savoir qu'elles présentent une localisation tissulaire spécifique et que le maintien de leur état indifférencié est possible grâce à des signaux provenant de cellules voisines. En revanche, alors qu'une cellule souche animale conservera un caractère pluripotent et aura pour rôle de remplacer des cellules hautement spécialisées à durée de vie limitée, les cellules souches végétales vont être aptes à initier la formation de nouveaux organes non présents au cours de l'embryogenèse ce qui fait d'elles des cellules souches totipotentes (Baurle and Laux 2003).

Les cellules souches végétales sont localisées dans des niches au sein de structures spécialisées nommées méristèmes présents aux extrémités apicale et racinaire de la plante (Singh and Bhalla 2006). Le méristème apical caulinaire (SAM, Shoot Apical Meristem) approvisionnera la partie aérienne de la plante en tige, feuilles, fleur, alors que le méristème racinaire (RAM, Root Apical Meristem) formera le système racinaire de la plante. Les processus cellulaires de division et d'élongation cellulaires vont donner lieu à l'initiation des organes sous la forme de primordia. Suite à cette initiation, des étapes de différenciation cellulaire vont achever la mise en place des organes qui vont acquérir une identité tissu-spécifique. La coordination entre les trois processus, prolifération, croissance et différenciation ainsi que l'intégration des signaux endogènes et environnementaux qui interviennent dans leur régulation, est primordiale pour un bon développement de la plante. Les structures méristématiques présentent une incroyable stabilité puisqu'elles instaurent un équilibre perpétuel entre différenciation cellulaire et production cellulaire et ce, pendant des années, voire des siècles, ce qui fait d'elles de véritables «fontaines de jouvence» (Baurle and Laux 2003). Cependant, les cellules souches ne font pas l'objet d'une prolifération anarchique, elles sont organisées et réparties dans des domaines distincts afin de suivre des schémas organisationnels bien spécifiques (Traas and Vernoux 2002).

Nous nous intéresserons ici de façon spécifique au développement du méristème apical, structure indéterminée qui évoluera en structure déterminée qu'est le méristème floral afin de préciser au maximum les réseaux génétiques et les facteurs endogènes et environnementaux intervenant dans son développement et dans sa spécification.

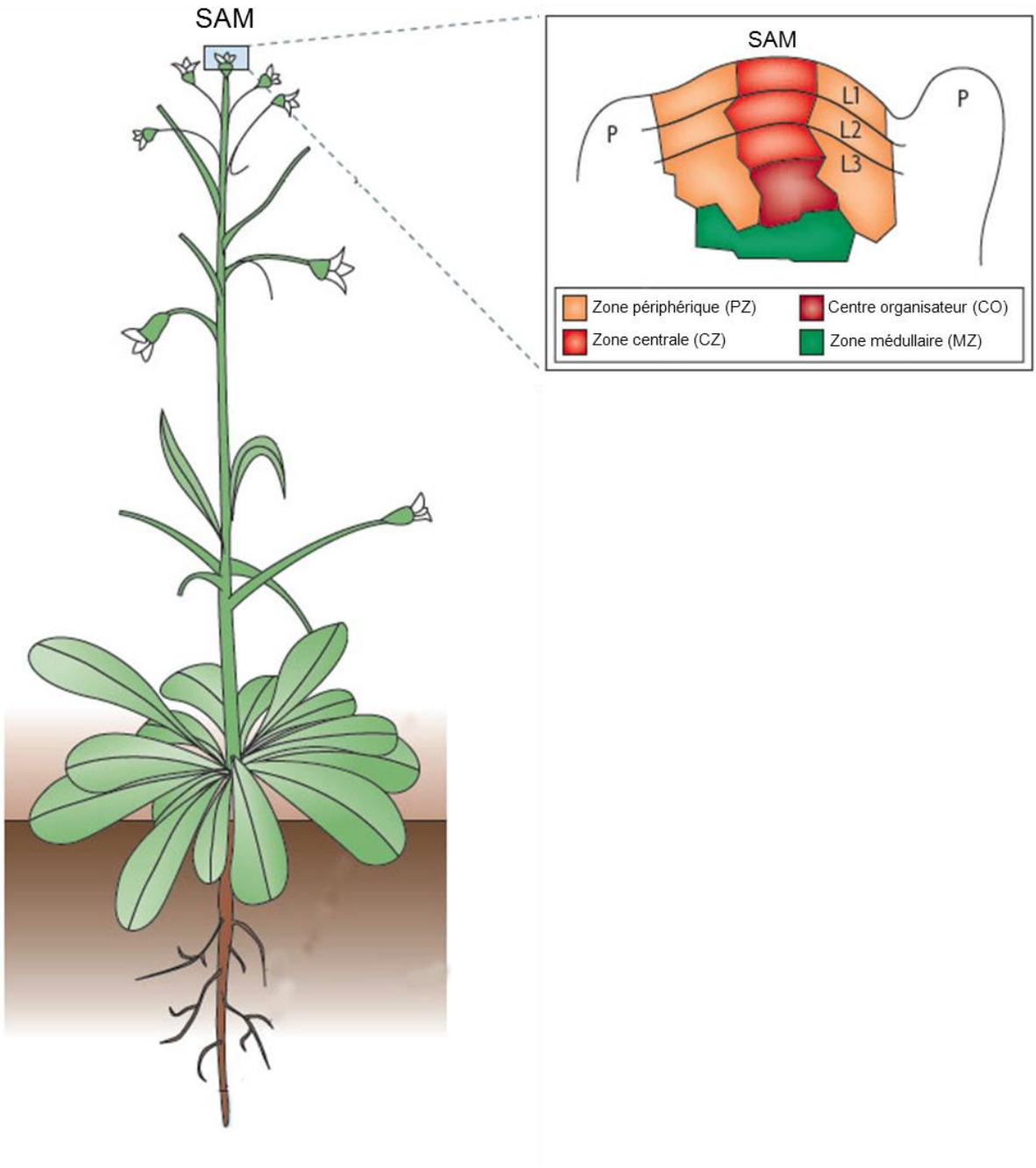


Figure 21: Organisation du méristème apical en couches cellulaires et zones chez *Arabidopsis thaliana* (d'après Wolters and Jürgens, 2009).

La subdivision du SAM en couches cellulaires dont le lignage a été déterminé a permis de montrer que la couche L1 va donner naissance aux épidermes des organes aériens, la couche L2 va participer entre autre à l'élaboration des tissus sporogènes alors que la couche L3 va notamment approvisionner les tissus vasculaires. En revanche, la subdivision en zone du SAM correspond à une approche fonctionnelle dynamique qui montre qu'à partir de la zone périphérique (PZ) vont se former les primordia d'organes (P) alors que la zone médullaire (MZ) contribuera à la constitution du centre de la tige. La zone centrale (CZ) permet la production de cellules souches qui conserve cette identité grâce au centre organisateur (CO) qui exprime le gène *WUS.*

1. Mise en place du méristème apical.

Le SAM se forme très précocement durant l'embryogenèse et son positionnement nécessite la définition d'une orientation dans le sens apico-basal et dans l'axe radial de l'embryon ainsi que la sectorisation de l'apex (Jürgens and Mayer 1994; Takeda and Aida 2011). Ainsi, le SAM émerge entre les deux primordia de cotylédons sous la forme d'un dôme qui sera positionné à l'extrémité apicale de l'embryon et au centre.

Il a été décrit deux principales architectures du SAM, la première se base sur des données cytologiques et correspond à une segmentation en couches cellulaires alors que la seconde s'appuie sur des concepts physiologiques qui découpent le méristème apical en zones (**figure 21**) (Carles and Fletcher 2003; Lyndon 1998).

La première architecture présentant une description anatomique sépare deux grandes zones, la *tunica*, structure de surface composée des couches L1 et L2 où les cellules se divisent suivant un plan anticlinal et le *corpus*, structure plus en profondeur, composé par la couche cellulaire L3 où les cellules se divisent sans plan préférentiel (**figure 21**). Ces différents niveaux cellulaires permettent d'obtenir un lignage cellulaire relativement strict. Ainsi, la L1 participe à l'élaboration des épidermes des organes aériens; la L2 contribue, entre autres, à la formation des tissus sporogènes alors que la L3 participe à la construction des tissus vasculaires de la tige et des tissus les plus internes des organes aériens. Cette notion de lignage cellulaire peut évoluer en fonction des situations. En effet, il a été montré que la contribution de chaque couche cellulaire à la formation des organes, bien que prévisible, est très variable selon les territoires de la feuille, par exemple. Il a été créé une plante chimère de troène où la couche cellulaire L1 était modifiée génétiquement pour être verte, la couche L2, blanche, et la couche L3, verte. Ainsi des petits territoires verts apparaissent occasionnellement sur les bords de la feuille correspondant à des divisions non plus anticlinales mais périclinales de la L1. Ces cellules issues de la L1 se retrouvent donc dans des tissus subépidermiques mais s'adaptent à leur nouvelle position et se différencient en cellules du mésophylle (Szymkowiak and Sussex 1996).

La seconde architecture se base plus sur une zonation en répondant à des propriétés physiologiques de chacune des zones définies. Ainsi les zones périphériques (PZ) et médullaire (MZ) constitueront les organes latéraux émergents et le centre de la tige respectivement. La zone CZ (Central Zone) contient la niche de cellules souches qui approvisionnent les différentes zones, notamment afin d'initier les primordia d'organes (**figure 21**). La vitesse de division des cellules qui composent ces différentes zones constitue une caractéristique fondamentale qui les différencie. En effet, la CZ est caractérisée par une faible activité mitotique où une cellule va donner naissance à deux cellules filles, l'une d'entre elles va rester dans cette zone dans un état indifférencié alors que la seconde va

glisser dans la zone périphérique dans laquelle elle va entamer une phase de prolifération intense. Les cellules filles ainsi produites, seront progressivement amenées au niveau de la zone de formation d'un primordium d'organe où elles pourront acquérir un statut de cellules différenciées.

Ainsi, le SAM se maintient en tant que structure stable, en dépit du flux de cellules qu'il produit et qui le traverse. Cette structuration dynamique suggère une coordination très stricte à travers un réseau de régulations génétiques capable de s'adapter en fonction de la position de la cellule dans l'espace méristématique. Il a été montré que ces processus se basent plus sur une communication intercellulaire que sur un destin préétabli des cellules dans un objectif de lignage cellulaire.

2. Maintenance et régulation de l'activité méristématique.

Contrôle génétique.

La continuité de l'activité méristématique suggère des liaisons finement régulées entre différents gènes.

Un des gènes majeurs dans l'initiation et le maintien de l'activité méristématique est le gène *WUSCHEL* (*WUS*). Ce gène code pour un facteur de transcription à homéodomaine de la famille des protéines WOX. La perte de fonction de ce gène entraîne une perte de la spécification des cellules souches et par conséquent un arrêt précoce de l'activité méristématique. Le territoire d'expression de ce gène est limité à quelques cellules de la L3 à la base de la CZ, et à la description des phénotypes des mutants, *WUS* a été défini comme ayant un rôle organisateur (CO) qui spécifie aux cellules qui l'expriment leur identité de cellules souches (**figure 21**) (Laux, et al. 1996). De plus, il apparaît que lorsque *WUS* est moins exprimé, non seulement, la zone CZ va se restreindre mais le nombre de divisions cellulaires dans les cellules filles venant de rejoindre la PZ va diminuer. Le phénomène inverse se produit si l'on augmente l'expression de *WUS*. Ces données suggèrent que WUS a, certes un rôle dans le maintien d'un pool restreint de cellules souches mais qu'il pourrait également participer à la régulation de la balance différenciation/indifférenciation que subissent les cellules en PZ (Yadav, et al. 2010). Ce gène central dans la régulation de l'activité méristématique va participer à un réseau génétique et va activer l'expression du gène *CLAVATA 3* (*CLV3*) au niveau des couches L1 et L2 au niveau de la CZ (**figure 22B**). Le gène *CLV3* est impliqué dans une boucle de régulation associant deux autres gènes *CLAVATA*, ayant pour objectif de limiter le territoire d'expression de *WUS*. En effet, les gènes *CLV1* et *CLV2* codent pour des protéines à domaine «leucine-rich repeat» ayant respectivement une activité de récepteur à activité kinase et de récepteur sans domaine intracellulaire et donc sans activité kinase.

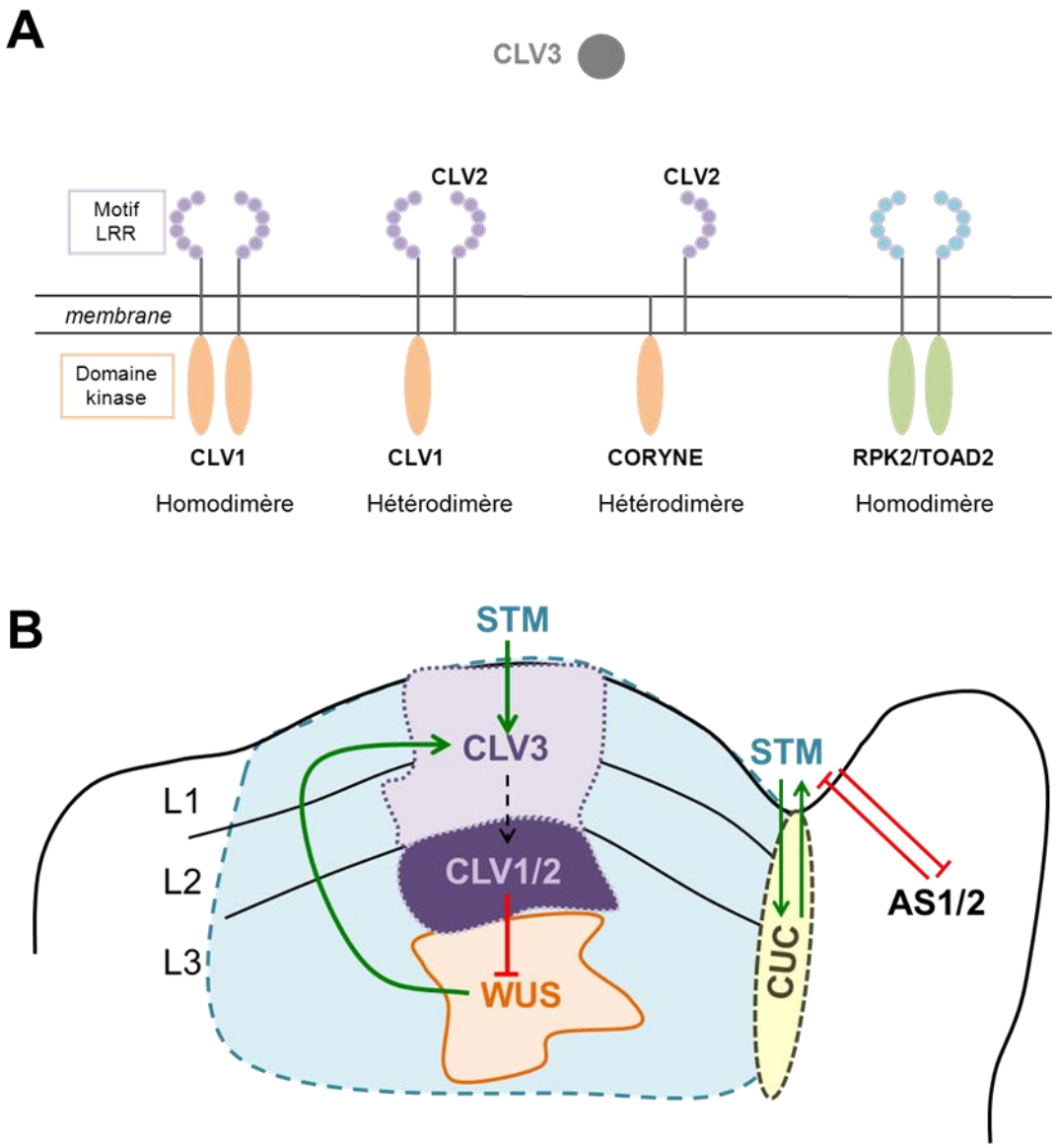


Figure 22: Description du système *CLAVATA* (Brand, et al. 2000, Rojo, et al. 2002, Muller, et al. 2008 et Kinoshita, et al. 2010) (A). Régulation génétique de l'activité méristématique d'après Traas and Vernoux, 2002 (B).

Le motif «leucine-rich repeat» (LRR) des protéines CLV1, CLV2 et RPK2/TOAD2 sert à la fixation du ligand CLAVATA3 alors que le domaine kinase des protéines CLV1, CORYNE, RPK2/TOAD2 va être actif dans la transduction du signal ayant pour rôle d'inhiber la transcription du gène *WUS*.
STM: *SHOOTMERISTEMLESS*, CLV: *CLAVATA*, WUS: *WUSCHEL*, CUC: *CUP-SHAPED COTYLEDON*, AS: *ASYMETRIC LEAVES*, RPK2/TOAD2: *TOADSTOOL2.*

Leur territoire d'expression correspond à la couche L3 au niveau de la CZ. Ainsi le modèle original proposé est que l'ARNm CLV3 codant un polypeptide sécrété de 96 acides aminés qui est traduit au niveau apical de la CZ, migre vers la partie basale de la CZ où il va se lier aux protéines CLV1 et CLV2 (**figure 22A**). Grâce à l'activité kinase intracellulaire de CLV1, une cascade de phosphorylation conduit à l'inhibition de l'expression de *WUS*. La principale caractéristique d'une mutation perte-de-fonction dans l'un des trois gènes *CLAVATA* est de permettre un élargissement du territoire d'expression de *WUS* et se traduit par la formation de méristèmes plus grands qui produisent des organes de taille plus importante et/ou en plus grande quantité (Brand, et al. 2000; Rojo, et al. 2002). CLV3 est donc l'élément majeur puisque le peptide est produit à partir des cellules souches afin de réprimer au niveau de celles-ci et des cellules voisines l'expression de *WUS*. Afin que cette répression n'atteigne pas le centre organisateur où *WUS* doit être correctement exprimé, CLV1 piège CLV3 dans le territoire adjacent, c'est-à-dire au niveau de la couche L3 dans la CZ. De nouveaux éléments sont apparus dans ce schéma de régulation précisant le mécanisme d'action de la protéine CLV3. Ainsi, ce ne sont pas les 96 acides aminés de CLV3 qui servent de ligand initiant la cascade de phosphorylation. En effet, Kondo et son équipe ont identifié par spectrométrie de masse un peptide de 12 acides aminés qui suffit à entraîner le phénotype correspondant aux mutants *clv,* ce qui signifie que la forme de 96 acides aminés correspond à un propeptide qui va être clivé pour former le peptide signal (Kondo, et al. 2006). Pour aller plus loin, l'équipe d'Ohyama en 2009 a identifié un peptide de 13 acides aminés qui a une modification post-traductionnelle de type glycosylation (probablement, un arabinose) qui semble être plus performant dans la complémentation de la mutation *clv3* que la forme non glycosylée (Ohyama, et al. 2009). L'isolement de ces peptides a permis de démontrer biochimiquement leur liaison à la protéine CLV1, avec une affinité plus importante pour la forme glycosylée. De plus, deux nouvelles protéines impliquées dans la réception du signal ont été découvertes. Le gène *CORYNE* code pour une protéine possédant un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire à activité kinase mais ne possédant pas de domaine extracellulaire pouvant fixer un ligand. Ainsi, il a été montré que CLV2 et CORYNE forment des hétérodimères à travers l'interaction de leurs domaines transmembranaires, le premier ayant le domaine «leucine-rich repeat» permettant de lier CLV3 et le second ayant le domaine à activité kinase permettant de transmettre le signal. Ces complexes hétérodimériques agissent en parallèle des homodimères de CLV1 (**figure 22A**) (Muller, et al. 2008). La protéine RPK2 ou TOADSTOOL2 (TOAD2) est un récepteur à activité kinase connue pour agir de façon redondante avec RPK1 afin de coordonner la mise en place du protoderme au stade globulaire tardif lors du développement embryonnaire. Il s'avère que RPK2 forme aussi des

homodimères afin de définir une troisième voie de signalisation en réponse à CLV3 indépendante des deux premières déjà identifiées (**figure 22 A**) (Kinoshita, et al. 2010).

La boucle de rétrocontrôle impliquant la famille des gènes *CLV* et le gène *WUS* représente un élément majeur dans la régulation de l'activité du méristème apical. Cependant, d'autres gènes assurent des fonctions importantes dans la mise en place et la maintenance du SAM.

Des facteurs de transcription à homéodomaine codés par les gènes de la famille KNOX (KNOtted-like homeoboX) participent à ces processus. Quatre gènes de cette famille sont exprimés dans l'ensemble du méristème apical, *KNAT1*, *KNAT2*, *KNAT6* et *STM* et fonctionnent de manière redondante. Le gène *STM* (*SHOOTMERISTEMLESS*) est le membre de la famille KNOX qui a été le plus étudié et le mieux caractérisé d'entre eux. En effet, la protéine codée par ce gène est localisée dans le méristème végétatif mais pas dans les primordia d'organes. De plus, un mutant *stm* n'est pas capable de mettre en place ou de maintenir un méristème apical et donc il ne peut pas mettre en place de nouveaux organes foliaires. Ainsi, *STM* est, lui aussi, essentiel pour maintenir un état indifférencié des cellules souches. Les gènes *ASYMETRIC LEAVES 1* et *2* (*AS1* et *2*) sont impliqués dans la formation des feuilles en agissant sur la mise en place des trois axes structuraux permettant de donner à la feuille sa forme. *AS1* code une protéine à domaine MYB alors qu'*AS2* code une protéine spécifique de plante avec un domaine LOB, ces deux protéines étant capables de s'associer. Le rôle de *STM* est d'empêcher les cellules souches de se différencier de manière trop précoce en contenant l'expression des deux gènes *AS1* et *AS2* dans les primordia d'organes (**figure 22B**). A l'inverse, les gènes *AS1* et *AS2* empêchent *STM* de venir s'exprimer dans les primordia afin d'assurer la perte de l'identité méristématique des cellules et l'acquisition de l'identité d'«organes» des cellules. La régulation de la position des frontières est déterminée de façon complexe notamment par l'intervention de gènes dits «cadastraux». Ainsi, les gènes *CUP SHAPED COTYLEDON* (*CUC*) appartiennent à la famille des facteurs de transcription NAC et activent l'expression de *STM* en marge de la CZ (**figure 22B**) (Aida, et al. 1999). Par des expériences d'analyse du transcriptome du méristème, il a été montré qu'après induction de l'expression de *STM*, il y avait une forte activation de l'expression de *CUC1* directement liée à la fixation de STM sur le promoteur de *CUC1* (Spinelli, et al. 2011). En laissant cette induction perdurer, il a été montré que *STM* stimulait aussi l'expression de *CUC2* et *CUC3* ainsi que l'expression d'un micro-ARN (miR164a) connu pour inhiber l'expression des gènes *CUC* permettant ainsi de générer une boucle de rétrocontrôle négatif qui va affiner le niveau d'expression de ces gènes. De plus, *STM* intervient également dans l'activation de l'expression de CLV3 au niveau de l'apex contribuant, avec *WUS,* à assurer un niveau suffisant de CLV3 (**figure 22B**).

En résumé, les gènes *WUS* et *STM* vont avoir des fonctions positives dans la prolifération cellulaire et le maintien de cette activité au sein du méristème alors que les gènes *CLV* vont, eux, avoir un rôle négatif dans cette activité régulant ainsi la taille du méristème. La liste des gènes intervenant dans la régulation génétique du SAM présentée dans les paragraphes précédents n'est pas exhaustive et le nombre des gènes impliqués dans cette régulation est important. Ces gènes forment un réseau régulant de manière précise cette importante machinerie mais on peut superposer à ce réseau génétique, l'action de molécules endogènes qui vont intervenir dans ce processus de régulation fine en combinaison avec les gènes décrits précédemment.

Régulation par des facteurs de croissance.

Les méristèmes étant les structures essentielles pour l'approvisionnement en cellules servant à la création des différents organes, les phytohormones jouent donc un rôle essentiel dans leur mise en place et dans leur maintenance. Les régulateurs de croissance peuvent avoir des effets indépendants, synergiques ou antagonistes. Nous allons voir ici l'action de certaines de ces phytohormones, ce qui ne représente en aucun cas la totalité du réseau mis en jeu. Parmi ces régulateurs de croissance ou phytohormones, la relation qu'entretiennent les cytokinines avec l'activité méristématique a fortement été étudiée.

❖ Les cytokinines.

L'enzyme LONELY GUY (LOG) qui possède une activité phosphoribohydrolase cytokinines-spécifique, participe à l'activation des cytokinines (**paragraphe I.1**). Cette enzyme, qui a été identifiée chez le riz, est exprimée spécifiquement au niveau du SAM suggérant une spécificité d'action des cytokinines dans le méristème apical (**figure 23A**) (Kurakawa, et al. 2007). Leibfried et son équipe (2005) ont montré que *WUS* réprime la transcription de gènes impliqués dans l'inhibition de la réponse aux cytokinines (Leibfried, et al. 2005). En effet, il a été montré que WUS se fixe directement sur le promoteur d'un des gènes *ARR* de type A, *ARR7* et permet ainsi d'augmenter la sensibilité aux cytokinines au niveau de la CZ. A l'inverse, une surexpression d'*ARR7* conduit à un phénotype semblable à celui du mutant *wus*. Plus récemment, la mise en place d'une boucle de rétrocontrôle positive entre la réponse aux cytokinines et WUS a été démontrée (Gordon, et al. 2009). En effet, il semble que ces hormones augmentent le niveau d'expression de *WUS*, celui-ci enlevant l'effet inhibiteur des ARR de type A va augmenter la réponse aux cytokinines, ceci de façon dépendante et indépendante des gènes *CLV* (**figure 23B**). Le niveau de régulation de cette boucle sera déterminé par les quantités endogènes de cytokinines. Il a ainsi été prédit que même si le domaine d'expression de *WUS* coïncide avec une zone concentrée en cytokinines, le gène *ARR5*, par exemple, serait inhibé uniquement lorsqu'il y aurait de fortes concentrations en phytohormones, ce qui implique un effet dose-dépendant dans ces

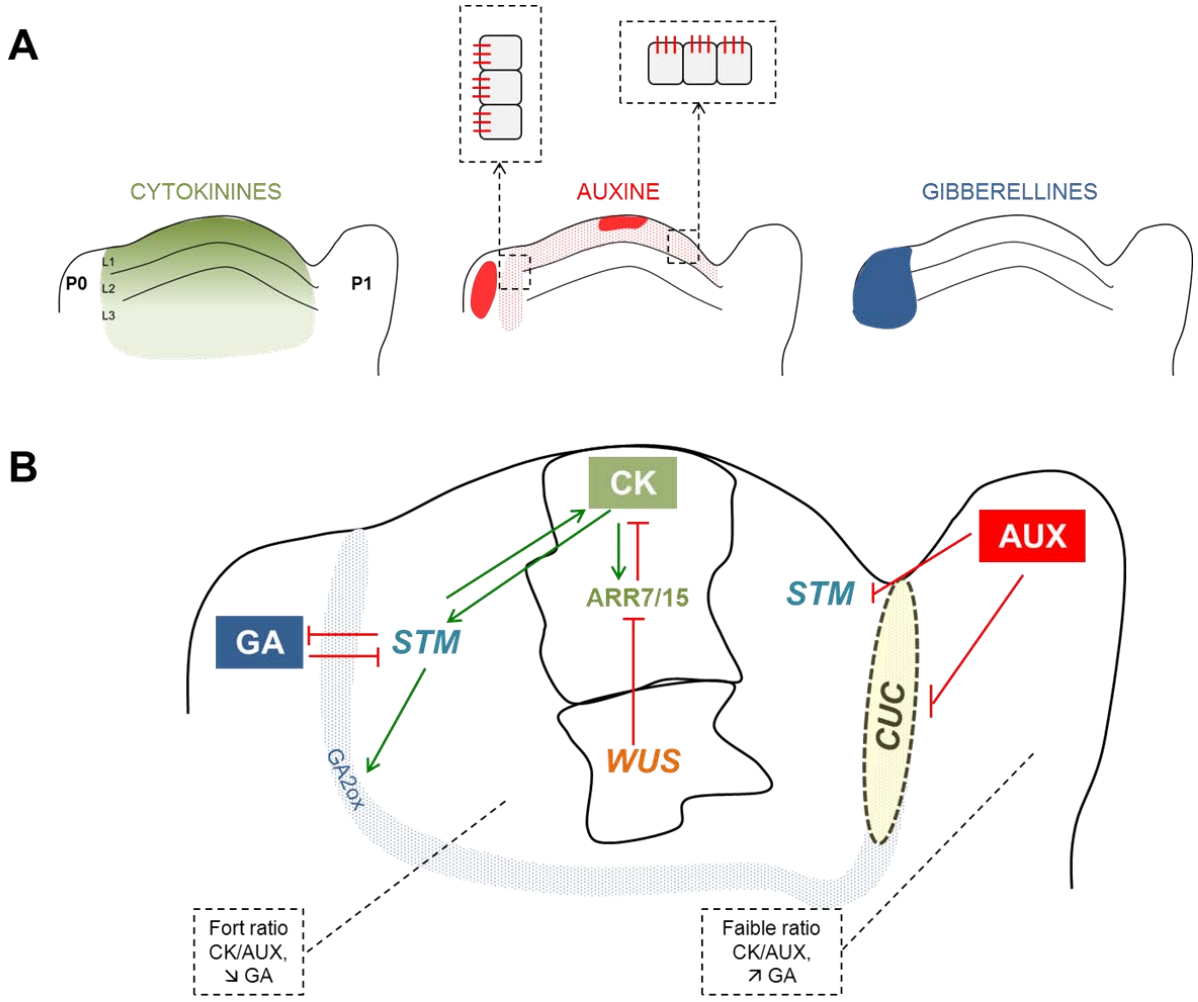


Figure 23: Distribution des principales phytohormones dans le SAM (A) et leur rôle sur les gènes impliqués dans l'activité méristématique (B) (d'après Shani, et al. 2006).

P1 désigne un primordium de feuille alors que P0 correspond à la région d'où va émerger le prochain primordium foliaire. Ainsi, alors que les cytokinines (CK) sont distribuées dans le méristème au niveau des cellules souches essentiellement, les gibbérellines (GA) et les auxines (AUX) sont localisées préférentiellement dans la zone P0. Concernant la distribution de l'auxine, les encadrés correspondent à la distribution cellulaire de la protéine PIN1, représentée en rouge, et permettant de concentrer les auxines dans les zones cibles.

Les protéines ARR7 et 15 sont des effecteurs négatifs de la réponse aux cytokinines et l'enzyme GA2ox est une enzyme de dégradation des gibbérellines.

mécanismes de régulation. Cependant, d'après une récente étude (Buechel, et al. 2010), malgré le fait que la transcription d'*ARR7* soit fortement activée par une forte concentration en cytokinines, la transcription du gène *WUS* augmente de façon beaucoup plus modérée. Ces données suggèrent que l'expression du gène *WUS*, bien que liée à la concentration en cytokinines, n'est affectée qu'indirectement par celle-ci et que d'autres mécanismes viennent compléter ce mécanisme de régulation fine. Concernant *CLV3*, il a été montré que l'extinction de deux *ARR* de type A (*ARR7* et *15*), partageant le même territoire d'expression que *CLV3,* entraînait une diminution drastique de l'expression de ce dernier alors que l'expression de *WUS* n'est que faiblement augmenté comme cela a déjà été souligné dans de précédents travaux (Buechel, et al. 2010). De plus, la diminution d'expression d'*ARR7* et *15* provoque une augmentation importante de la taille du méristème, ce qui suggère que ces deux ARR sont nécessaires à l'expression de *CLV3* et que le phénotype observé peut correspondre à une diminution de l'expression de *CLV3* (Zhao, et al. 2010).

Les gènes de la classe KNOX sont également étroitement liés à cette phytohormone. En effet, la surexpression de gènes *KNOX* induit l'augmentation de la concentration en cytokinines dans le méristème, peut-être par un effet transcriptionnel direct des protéines codées par ces gènes. De plus, l'ajout exogène de cytokinines ou l'expression d'une enzyme intervenant dans leurs biosynthèses conduit à une restauration du phénotype sauvage des mutants *stm*. L'ensemble de ces données indique que la fonction régulatrice des gènes *KNOX* sur l'activité méristématique est liée à leur fonction de régulateurs transcriptionnels sur les enzymes de la voie de biosynthèse de ces hormones (**figure 23B**) (Jasinski, et al. 2005). La surproduction de cytokinines qui se traduit par l'augmentation de la transcription des gènes *KNOX*, indique la présence d'une boucle de régulation qui pourrait être interconnectée avec la boucle reliant les cytokinines à WUS.

- **L'auxine.**

Dans la voie de signalisation de l'auxine intervenant dans la régulation de l'activité méristématique, la protéine PIN1 a une localisation bien particulière au niveau du SAM puisqu'elle est exprimée au niveau de la couche L1 et au niveau du système vasculaire des primordia d'organes (**figure 23A**). Sa localisation subcellulaire est également importante car elle n'est pas localisée de façon diffuse dans les cellules de la L1 mais positionnée de façon asymétrique, concentrée du côté apical de la cellule pointée vers l'apex. En revanche, dans les cellules adjacentes au point d'initiation des primordia d'organes, PIN1 est distribuée dans la membrane sur la face de la cellule orientée vers le point d'initiation d'un primordium avant de se retrouver au centre du primordium créant ainsi un flux d'auxine très localisé. Des études sur les mutants *pin* ont montré que l'auxine n'était pas juste un facteur permettant le développement de nouveaux organes mais qu'il participe à la mise en place, au niveau de

l'apex, d'un plan de construction qui détermine notamment la phyllotaxie des organes foliaires. Ainsi, à chaque émergence de primordium de feuille, celui-ci agira comme un puits où l'auxine s'accumulera en grande quantité laissant une concentration minimale dans le méristème (Reinhardt, et al. 2003). Ainsi, il a été montré qu'un double mutant *pin1 pid* (PINOID (PID) est un régulateur positif du transport polaire de l'auxine) montre une absence totale de symétrie bilatérale. En fait, il s'avère que chez ce double mutant, l'expression des gènes *STM* et *CUC* n'est plus restreinte spatialement et s'étend jusqu'aux primordia d'organes (**figure 23B**). La symétrie est restaurée si l'expression des gènes *STM* et *CUC* chez ce double mutant est inhibée suggérant que les deux gènes *PIN1* et *PID* sont nécessaires à l'établissement d'un profil de l'expression de ces gènes adéquat (Furutani, et al. 2004).

- **Les gibbérellines.**

Des études ont montré un lien étroit entre les gibbérellines et les gènes *KNOX* responsables de l'identité du SAM. En effet, une diminution de la biosynthèse des gibbérellines entraîne une augmentation de l'expression des gènes *KNOX* y compris hors de leur domaine d'expression, notamment, dans ce contexte, dans les primordia de feuilles. En augmentant la concentration en gibbérellines au niveau de l'apex des plantes, une diminution de l'expression des gènes *KNOX* dans les primordia et dans le SAM peut être observée. De plus, les facteurs de transcription KNOX sont capables d'inhiber l'expression de la GA20ox (**figure 23B**) (Hay, et al. 2002).

- **Interconnections entre les voies répondant à ces trois phytohormones.**

Des expériences utilisant des isotopes radioactifs *in vivo* ont permis de visualiser instantanément les contenus en auxine et cytokinines selon le stimulus apporté (Nordstrom, et al. 2004). Ainsi, la synthèse de cytokinines est fortement et rapidement inhibée par l'ajout d'auxine alors qu'une augmentation de la synthèse de cytokinines entraîne une diminution du pool d'auxine cellulaire mais beaucoup plus lente. Au niveau moléculaire, les travaux de Zhao et ses collaborateurs (2010) ont montré qu'un traitement des apex à l'auxine entraîne une diminution drastique des deux ARR de type A (ARR7 et 15) exprimés spécifiquement au niveau du SAM et effectivement, dans des mutants *yucca*, affectés dans la synthèse d'auxine, l'expression de ces gènes augmente. Les données précédentes qui montrent que l'auxine inhibe la synthèse de cytokinines suggèrent que ces résultats sont dus à une augmentation de la réponse aux cytokinines or ce n'est pas le cas. L'augmentation de l'expression des *ARR* de type A n'est pas due à une augmentation de la synthèse ou de la réponse aux cytokinines suggérant que cette augmentation est uniquement due au manque d'auxine. Or, la réponse transcriptionnelle de l'auxine implique les ARF et il apparaît qu'*ARR7* et *ARR15* sont surexprimés chez le mutant *arf5/monoptéros* (*mp*).

Le gène *MP* est exprimé en périphérie du SAM alors que les gènes *ARR7* et *ARR15* sont exprimés au niveau des cellules souches. Chez le mutant *mp*, les gènes *ARR7* et *ARR15* ont une zone d'expression étendue jusqu'à la zone périphérique. De façon intéressante, le promoteur du gène *ARR15* contient des éléments de réponse à l'auxine, motif «Aux-RE» sur lesquels se fixent les ARF. Il a pu être démontré que MP se fixe sur le promoteur du gène *ARR15*. Les deux ARR de type A, ARR7 et ARR15, intègrent les signaux provenant de l'auxine et des cytokinines afin de réaliser les interconnections entre ces phytohormones pour la régulation du réseau génétique nécessaire au fonctionnement du SAM.

Les données précédemment décrites suggèrent que les conditions «faible concentration en gibbérellines» et «forte concentration en cytokinines» sont toutes deux nécessaires pour avoir un développement correct du SAM et la balance entre ces deux voies de signalisation est contrôlée par les gènes *KNOX*, qui d'une part, activent les gènes de biosynthèse des cytokinines, et d'autre part, répriment ceux impliqués dans la biosynthèse des gibbérellines. Cependant, ce dernier point n'est pas nécessairement suffisant pour maintenir une concentration en gibbérellines faible dans le SAM puisque les gibbérellines sont des molécules diffusibles. En effet, il a été montré que les enzymes de dégradation des gibbérellines, notamment les GA2ox, sont exprimées à la base du méristème et aux frontières avec les primordia d'organes (**figure 23B**). Leur territoire d'expression est donc partiellement partagé avec celui des gènes *KNOX*. En induisant l'expression de *STM* et d'un gène de biosynthèse des cytokinines, l'expression de ces gènes est augmentée. Ces résultats montrent que non seulement les gènes *KNOX* provoquent la dégradation des gibbérellines au niveau du SAM mais également que les cytokinines participent à cette régulation (Jasinski, et al. 2005).

Ainsi, nous avons pu voir à travers ces différents exemples que les hormones étaient positionnées à un carrefour essentiel pour le fonctionnement du SAM. Les cytokinines sont impliquées dans le maintien d'une activité de prolifération et d'une identité de cellule souche, alors que les auxines et les gibbérellines, participent à la mise en place des organes et à la conservation des frontières entre le méristème et les primordia. Ces différentes molécules n'agissent pas seules mais au contraire, ont un rôle à travers des actions coordonnées. De ce fait, un fort ratio cytokinines/auxine et une faible concentration en gibbérellines va contribuer à l'entretien de l'activité méristématique alors qu'un faible ratio cytokinines/auxine accompagnée d'une forte accumulation de gibbérellines vont promouvoir les processus de différenciation menant à la mise en place d'organes. L'influence de ces hormones et de ce réseau génétique a été très largement étudiée au niveau des méristèmes végétatif et racinaire mais ce sont des éléments retrouvés dans d'autres structures tels que les méristèmes inflorescentiels conduisant à la production de méristèmes floraux.

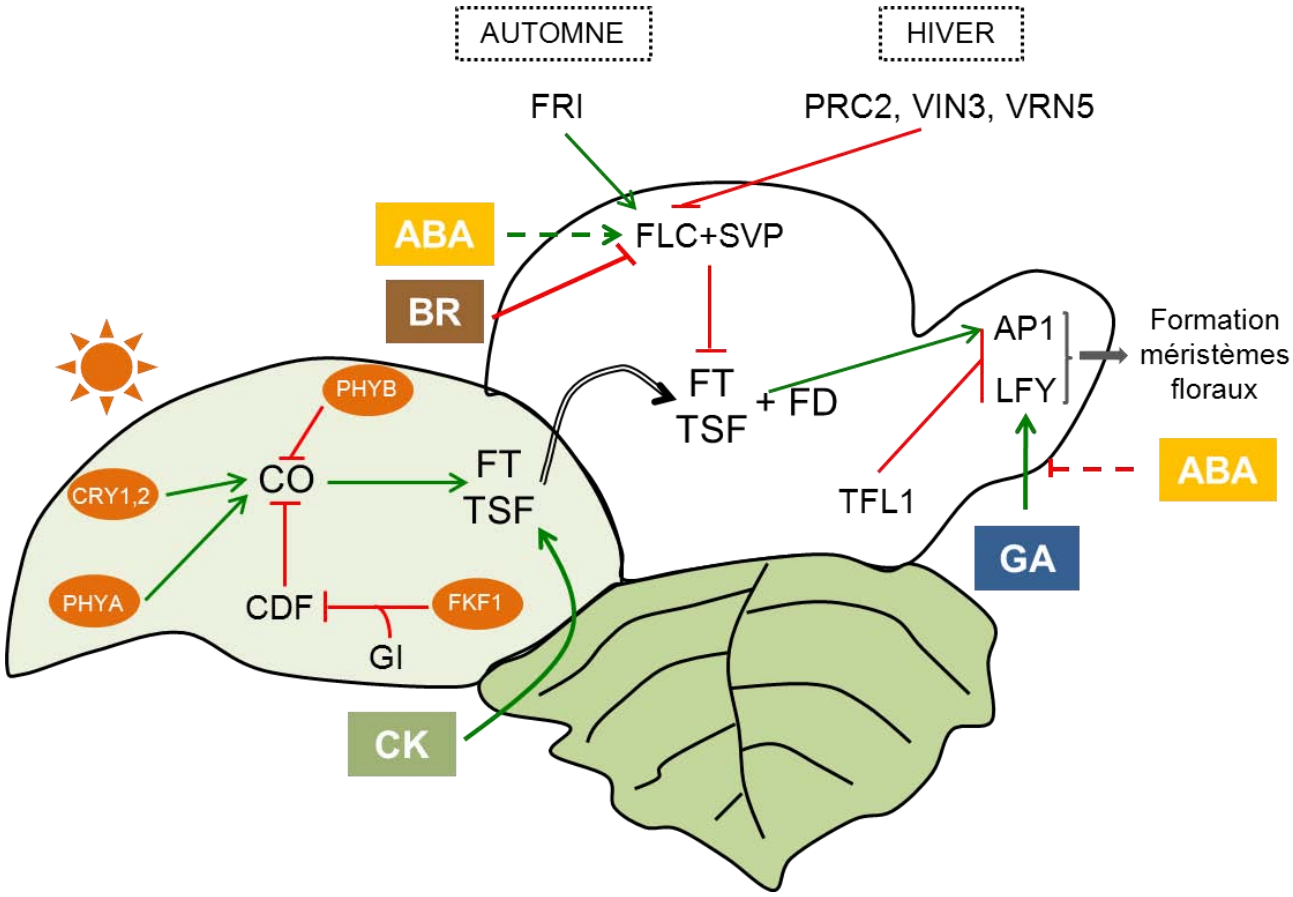


Figure 24: Les différentes voies participant à la transition florale (d'après Amasino, 2010).

Deux voies parmi les quatre décrites sont présentées ici, la voie de la photopériode activée au niveau des feuilles (les censeurs sont en orange) et la voie dépendante de la température activée directement au niveau du SAM. Les phytohormones cytokinines (CK), gibbérellines (GA) et brassinostéroïdes (BR) contribuent à la transition florale alors que l'acide abscissique (ABA) a un effet négatif sur la floraison.

3. Passage du méristème d'un statut indéterminé à un statut déterminé.

Le méristème végétatif va pouvoir évoluer au cours de la vie de la plante et en fonction des signaux environnementaux présents. Ainsi au cours de l'induction florale, le méristème végétatif va évoluer, changeant d'identité pour donner un méristème inflorescentiel. Celui-ci conserve une organisation et un fonctionnement similaire à ceux du méristème végétatif. Ainsi, les gènes *WUS* et *CLV* maintiennent le pool de cellules souches et une activité méristématique intense afin de permettre la production de méristèmes floraux en suivant un processus similaire à la production des feuilles par le méristème végétatif. Ce processus est maintenu tant que le méristème inflorescentiel garde son identité. Chez les mutants perte-de-fonction du gène *TERMINAL FLOWER 1* (*TFL1*) l'inhibition de l'expression de gènes identitaires du méristème floral, *LEAFY* (*LFY*) et *APETALA 1* (*AP1*) n'est plus maintenue et le méristème inflorescentiel perd son identité prenant une identité de méristème floral terminal. A l'inverse, les gènes *LFY* et *AP1* ont pour fonction d'inhiber l'expression du gène *TFL1* au sein du méristème floral afin de permettre à celui-ci d'acquérir son identité et son caractère déterminé (**figure 24**) (Irish 2010). Durant cette transition, le gène *LFY* est un acteur majeur dans l'acquisition de l'identité florale du méristème. Le gène *LFY* code pour un facteur de transcription exprimé très fortement dans les primordia de fleurs mais il est aussi exprimé dans les primordia de feuilles avant la transition florale. Ainsi, le niveau d'expression de *LFY* augmente avec l'âge de la plante jusqu'à atteindre un seuil à partir duquel le primordium émergeant du méristème inflorescentiel prend une identité de méristème floral.

Deux grandes voies mènent à l'induction florale. L'une est activée par des signaux environnementaux (changement de température, de quantité et de qualité de la lumière). L'autre est induite de façon intrinsèque à la plante.

La photopériode est un des éléments clé participant au processus de floraison chez Arabidopsis. Selon les espèces, il y a des plantes dites de «jour court» et des plantes dites de «jour long». Arabidopsis appartient à cette deuxième catégorie, elle fleurit plus rapidement si elle est exposée à de longues périodes lumineuses mais peut éventuellement fleurir en jour court. Trois gènes majeurs ont été montrés comme étant indispensables à la floraison induite par la photopériode. *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) code une petite protéine assimilée aux inhibiteurs des kinases RAF et qui a un rôle élémentaire dans l'induction florale. *CONSTANS* (*CO*) correspond à une protéine à doigt à zinc ayant une activité de facteur de transcription. *GIGANTEA* (*GI*) est également un facteur de transcription spécifique des plantes et possède un rôle dans l'horloge circadienne. CO est nécessaire pour l'induction de l'expression de *FT* dans les feuilles. En effet, *CO* est exprimé dans les cellules compagnes du phloème des feuilles. C'est donc à cet endroit que *FT* va être transcrit et traduit. La protéine est capable de migrer jusqu'au SAM (Corbesier, et al. 2007) et de

s'associer à FD pour activer les gènes de la floraison (**figure 24**) (Abe, et al. 2005; Wigge, et al. 2005). CO est le «censeur» de la lumière puisqu'il est finement régulé directement ou non par des photorécepteurs. Ainsi, les protéines CYCLING DOF FACTORS (CDF) réprime l'expression de *CO* en se fixant directement sur son promoteur. Or les CDF sont la cible du complexe E3 ubiquitine-ligase *via* une F-box, FKF1 (FLAVIN-BINDING, KELCH REPEAT, F-BOX PROTEIN 1) qui est un photorécepteur de la lumière bleue. De plus, GI interagit avec FKF1 augmentant sa stabilité afin de promouvoir la dégradation des CDF et donc l'expression de *CO* (**figure 24**) (Amasino 2010). D'autres photorécepteurs modulent l'expression de *CO*, ainsi, CRY1 et 2 (CRYPTOCHROME 1 et 2), PHYA (PHYTOCHROME A) en stabilisant la protéine CO alors que PHYB entraîne sa dégradation *via* l'activité de la protéine COP1 impliquée dans les mécanismes de dégradation liés au protéasome (Valverde, et al. 2004).

Les changements de température sont également impliqués dans le déclenchement de la floraison. La vernalisation est le processus par lequel une exposition à de faibles températures rend les plantes aptes à fleurir. Le but de ce processus est d'empêcher les plantes de fleurir dans des conditions inadaptées. Il existe donc dans les plantes un mécanisme permettant non seulement la perception de la température mais aussi de la durée de la période pendant laquelle est maintenue cette température. A l'inverse du signal lumineux qui est perçu au niveau des feuilles, le signal «température» est perçu directement au niveau du SAM. Un gène en particulier est impliqué dans la perception de la vernalisation, le gène *FRIGIDA* (*FRI*). En effet, selon les écotypes d'Arabidopsis, certains ont une floraison dépendante d'une exposition au froid et possèdent alors la protéine FRI entière alors que d'autres écotypes ont une version tronquée ou mutée de cette protéine et sont capables de fleurir rapidement sans exposition au froid. Un autre gène, *FLC* (*FLOWERING LOCUS C*) code une protéine à MADS-box impliquée dans la signalisation de la vernalisation. A l'automne, FRI entraîne une augmentation de l'expression de *FLC* qui va inhiber la floraison en se liant directement aux activateurs FT et FD (**figure 24**). Il a été montré que FLC pouvait interagir avec la protéine SVP (SHORT VEGETATIVE PHASE), elle-même capable de se lier aux protéines FD et FT. FRI favorise le recrutement d'un complexe protéique, «COMPASS-like», impliqué dans l'apposition de marques épigénétiques activatrices sur le locus *FLC* (Jiang, et al. 2009). Durant l'hiver, l'expression de *FLC* chute alors que celle de *FRI* reste stable, ce qui signifie que *FLC* n'est plus capable de percevoir le signal activateur de *FRI*, ce phénomène préparant le SAM à devenir un méristème inflorescentiel au printemps. Pour conserver la répression de *FLC*, c'est le complexe PRC2 (POLYCOMB REPRESSION COMPLEX 2) également impliqué dans les processus épigénétiques qui va intervenir. PRC2 est composé de différents types de protéines dont les enzymes

ENHANCER OF ZESTE (E(Z)) qui vont déposer des marques épigénétiques inhibitrices sur le locus *FLC*. Ces marques vont être maintenues par des protéines à homéodomaine, VERNALIZATION-INSENSITIVE 3 (VIN3) et VERNALIZATION 5 (VRN5) durant l'exposition au froid (**figure 24**) (Amasino 2010). Cependant, malgré une connaissance plutôt bien détaillée de la voie de transduction induite par le froid, le système censeur n'a toujours pas été découvert.

Enfin, il reste une voie impliquée dans l'induction florale qui s'active indépendamment de la présence de signaux extérieurs, la voie «autonome». Les gènes impliqués dans cette voie ont été identifiés car les mutants correspondants présentent un retard de floraison quelle que soit la condition lumineuse. Certains, parmi ces gènes, sont impliqués dans la répression de *FLC via* des processus épigénétiques. D'autres sont impliqués dans la répression de gènes à travers l'action de RNAi et dans l'expression de transposons grâce à la modification de leur profil de méthylation. En tous les cas, cette voie n'est pas linéaire et est composée de gènes participant à diverses voies décrites précédemment (Amasino 2010).

Les voies de signalisation qui viennent d'être décrites, bien que faisant intervenir des mécanismes différents, convergent vers l'activation des gènes *LFY* et *AP1*. L'existence de plusieurs voies de signalisation convergeant vers un nœud de régulation de la mise en place du méristème floral permet d'assurer la floraison lorsque l'une des voies est défaillante. Cette hypothèse semble confirmer par l'étude du double mutant *ft (fd) lfy* caractérisé par la formation de feuilles à la place des fleurs (Abe, et al. 2005).

Il a été montré que les gibbérellines ont un effet positif sur l'expression de *LFY* chez Arabidopsis (**figure 24**). En effet, l'activité du promoteur du gène *LFY* est diminuée chez un mutant affecté dans la biosynthèse des gibbérellines. Ce mutant présente un fort retard de floraison pouvant être comblé par l'expression constitutive de *LFY* (Blazquez, et al. 1998). Les gibbérellines activent la floraison y compris dans des conditions de lumière non inductrices. C'est le cas chez les mutants *gai* (GAI est une protéine appartenant à la famille des répresseurs DELLA) et *spindly* qui ont une réponse constitutive aux gibbérellines et qui fleurissent de manière précoce. En conditions non inductrices de floraison, l'activité du promoteur *LFY* augmente et ce, en fonction de la concentration en gibbérellines. Le promoteur *LFY* possède un élément de régulation en *cis* indépendant de l'élément de réponse à la photopériode. Les gibbérellines agissent sur un facteur de transcription MYB33 capable de se lier à l'élément *cis* présent sur le promoteur de *LF*Y (Davis 2009). Les gibbérellines sont essentielles à la floraison en condition de «jour court» mais leur contribution est moins importante en condition de «jour long». Les brassinostéroïdes sont une autre classe de phytohormone impliquée dans la transition florale. Le gène *BRI1* (*BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1*) code un récepteur aux brassinostéroïdes ayant une

activité kinase. Ce gène agit dans une voie indépendante des voies des gibbérellines, de la photopériode et de la vernalisation mais interagit avec la voie autonome. En effet, il agirait de manière conjointe avec des éléments impliqués dans les modifications épigénétiques du locus *FLC* (**figure 24**). En favorisant la répression de *FLC*, il participe à l'acquisition de la compétence du méristème végétatif à répondre aux signaux de floraison (Davis 2009). Les cytokinines ont une forte activité sur un homologue de *FT*, *TSF* (*TWIN SISTER OF FT*) (**figure 24**). De la même manière que FT, TSF est un agent mobile capable d'activer l'expression de gènes dans le méristème en interagissant avec FD pour réguler le gène *AP1* mais de manière indépendante à FT. Ainsi l'application exogène de cytokinines au niveau des racines entraîne une floraison en l'absence de tous les autres signaux inducteurs de celle-ci. Cet effet est spécifique puisqu'une augmentation des transcrits d'*AP1* est observée. Le traitement par les cytokinines active la transcription de *TSF* dans les feuilles. Ces données suggèrent qu'en fonction des conditions environnementales, un contrôle individuel des gènes *FT* et *TSF* permet de moduler la réponse menant à la floraison. En effet, en condition de «jour long», les deux gènes *FT* et *TSF* sont transcrits mais c'est uniquement la perte de fonction du gène *FT* qui conduit à un retard de floraison. Alors qu'en condition de «jour court», les cytokinines induisent l'expression de *TSF* et la floraison sans que le gène *FT* soit nécessaire (D'Aloia, et al. 2011). Enfin, une phytohormone connue pour son rôle inhibiteur dans la croissance des plantes, l'acide abscissique (ABA) a fait l'objet d'études controversées sur son rôle dans la floraison. En effet, des mutants déficients en ABA montrent une floraison précoce indiquant que l'ABA pourrait avoir un effet inhibiteur sur la floraison. En effet, le travail publié par Razem et ses collaborateurs (2006) montre que l'ABA pourrait retarder la floraison en favorisant l'expression de *FLC* (**figure 24**). Cependant, les travaux d'Achard et collaborateurs (2006) suggèrent que l'ABA aurait un rôle inhibiteur sur la floraison en régulant l'expression des protéines DELLA (Achard, et al. 2006; Razem, et al. 2006).

4. Développement du méristème floral.

Contrairement aux méristèmes végétatifs et inflorescentiels le méristème floral a un caractère déterminé caractérisé par une baisse progressive de l'expression des gènes méristématiques, par exemple le gène *WUS*, au profit des gènes responsables de l'identité des organes floraux. De plus, la distribution des pièces florales autour de l'axe de croissance ne suit pas le même plan d'organisation que les structures produites par les méristèmes végétatif ou inflorescentiel. Ainsi, chez *Arabidopsis thaliana*, les pièces florales sont organisées en quatre plans concentriques ou verticilles qui, du plus externe au plus interne, correspondent au calice formé des sépales, à la corolle formée des pétales, à l'androcée formée des étamines et au gynécée formé des carpelles fusionnés (**figure 25**).

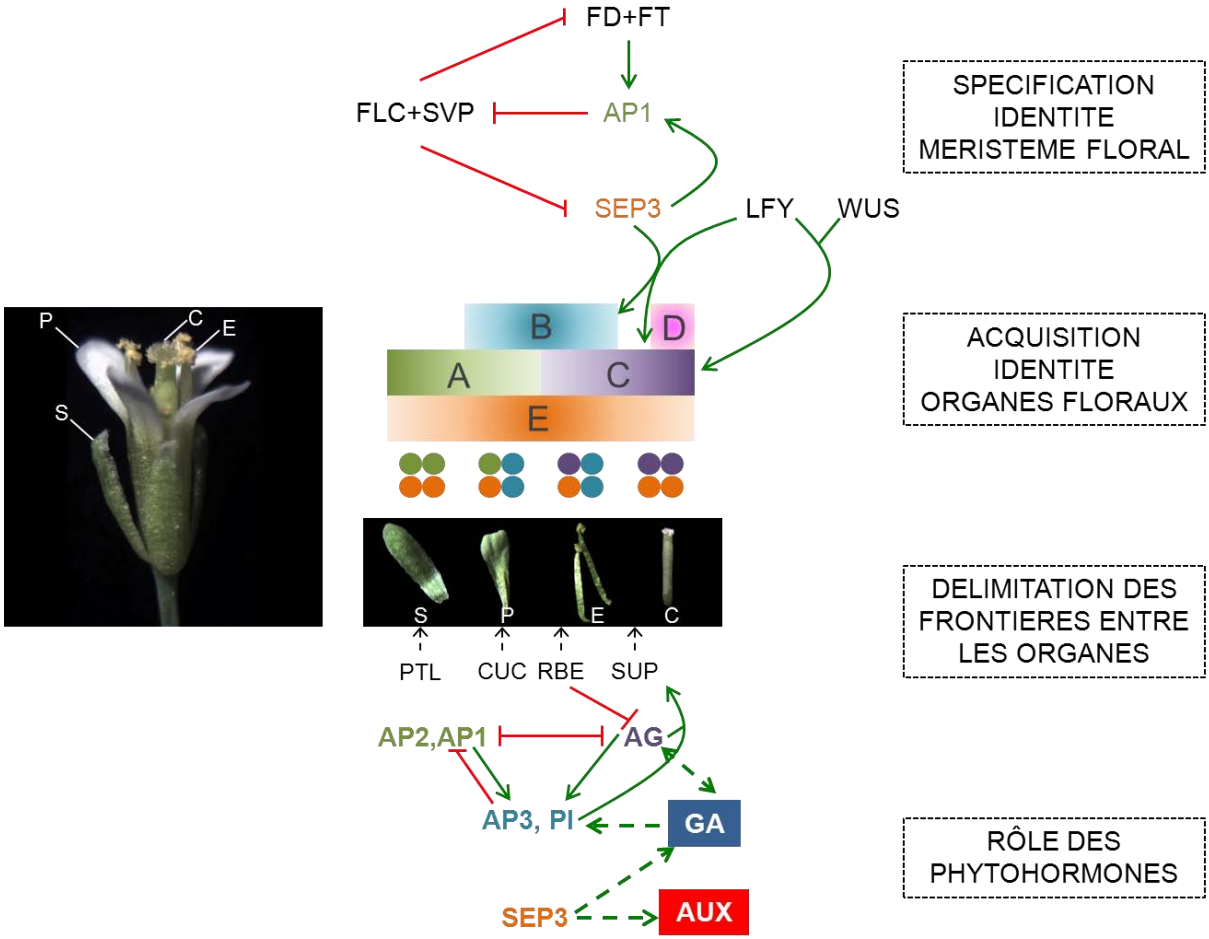


Figure 25: De l'établissement du méristème floral à la formation des organes floraux chez *Arabidopsis thaliana*.

Certains gènes identitaires des organes floraux, les gènes à MADS-box participent à l'acquisition de l'identité du méristème floral, c'est le cas d'*AP1* et *SEP3*. Les gènes de la classe A (*AP1, 2*) sont représentés en vert, ceux de la classe B (*AP3, PI*) en bleu, ceux de la classe C (*AG*) en violet et ceux de la classe E (*SEP*) en orange. Les protéines à MADS-box codées par les gènes correspondant s'organisent en hétérotétramères (modèle «quartet») afin de spécifier l'identité de chaque organe : sépale (S), pétale (P), étamine (E) et carpelle (C).

Les territoires d'expression des gènes identitaires sont strictement délimités. La frontière entre verticilles est aussi établie par les gènes RBE et SUP alors que les gènes PTL et CUC participent à l'individualisation respective des organes, sépales et pétales, au sein des verticilles correspondants.

L'appareil reproducteur est formé des deux derniers verticilles, les étamines, organes reproducteurs mâles portant le pollen et le pistil, composé des deux carpelles, organes reproducteurs femelles, renfermant les ovules. La mise en place de ces organes résulte de l'établissement d'un réseau génétique assez complexe. Ce réseau intègre notamment des gènes responsables de l'identité des organes floraux, gènes dits «identitaires» car lorsqu'ils subissent des mutations perte-de-fonction, l'identité de l'organe dont ils sont responsables est changée. L'étude de ces gènes a permis d'établir un modèle expliquant le contrôle génétique du développement floral, le modèle «ABC» (Weigel and Meyerowitz 1994). Plus récemment, la fonction D a été ajoutée au modèle venant le compléter pour expliquer la mise en place des ovules, dans ce que certains auteurs définissent comme le cinquième verticille (Favaro, et al. 2003). La fonction E est venue renforcer le modèle ABC au niveau fonctionnel comme indiqué dans le paragraphe suivant.

Contrôle génétique.

Récemment, Irish (2010) a recensé les éléments participant au modèle «ABC» du développement floral. Il existe quatre éléments responsables de l'identité des organes floraux agissant de façon combinatoire, en interaction physique, car la plupart des protéines participant à ce modèle sont des facteurs de transcription à MADS-box qui ont la capacité à former des hétérotétramères, définissant la notion de «quartet» (Theissen and Saedler 2001) dont la composition spécifiera l'identité de l'organe. Les protéines de la fonction A en interaction avec les protéines de la fonction E, APETALA 1 (AP1) et SEPALLATA (SEP) respectivement, sont responsables de l'identité des sépales dans le premier verticille. Les protéines de la fonction B, APETALA 3 (AP3) et PISTILLATA (PI) ont un rôle combiné avec les protéines de la fonction A et de la fonction E en participant à la définition de l'identité des pétales dans le deuxième verticille. La combinaison des protéines de la fonction B avec les protéines AGAMOUS (AG) de la fonction C et de la fonction E, est responsable de l'identité des étamines dans le troisième verticille. Enfin, l'identité des carpelles dans le quatrième verticille est spécifiée par un quartet composé des protéines de la fonction C et de la fonction E (**figure 25**).

Il est important de rappeler que la protéine AP1, avant d'avoir un rôle dans l'acquisition de l'identité des organes floraux, participe à la définition de l'identité du méristème floral. En effet, *AP1* est activé par le complexe FT/FD et par la protéine LFY au moment de la transition florale. A l'inverse, AP1 est capable d'inhiber SVP, protéine active au cours de la vernalisation qui inhibe le complexe FD/FT et qui inhibe aussi *SEP3*. Ainsi AP1 lève l'inhibition qui était exercée sur *SEP3*, celui-ci peut alors interagir avec LFY et activer l'expression des gènes identitaires (**figure 25**). L'exemple le plus marquant de cette double action est le gène *AGAMOUS*. En effet, un des principaux rôles de LFY parmi tous ceux

cités, est de réguler l'expression d'*AG* afin d'obtenir une balance précise entre la phase proliférative du méristème floral nécessaire durant les phases précoces, et la phase d'organogenèse qui aboutit à une fleur au caractère déterminé. LFY forme avec WUS un complexe capable de favoriser la transcription du gène *AG*. En retour, AG inhibe l'expression de *WUS* pour favoriser la terminaison florale. Cette boucle de régulation est un élément déterminant dans le contrôle de la terminaison du méristème floral, lui conférant son caractère déterminé.

L'action combinée des gènes du modèle «ABCDE» ne peut être efficace que s'ils sont exprimés dans le verticille où ils doivent agir. Il existe des interactions entre eux afin de définir leur profil d'expression spatial, temporel et tissu-spécifique. Ainsi, LFY active l'expression d'*AP1* partout dans le méristème floral, ce n'est que plus tard qu'AG va réprimer l'expression d'*AP1* dans le 3ème et le 4ème verticille. En revanche, pour restreindre le territoire d'expression d'*AG*, WUS ne suffit pas car lui-même est restreint à un très petit territoire au centre du méristème. Cependant, il apparaît que l'établissement du domaine d'expression d'*AG* dépend d'un complexe auquel participe AP1 avec LEUNIG (LUG) et SEUSS (SEU), corépresseurs transcriptionnels. Ce complexe a pour propriété de se fixer sur les séquences régulatrices d'*AG* dans les 1er et 2nd verticilles. Dans le cas de la fonction B, l'activation d'*AP3* résulte de plusieurs mécanismes de régulation. L'un de ces mécanismes impliquerait la dégradation protéolytique *via* la voie protéasome, d'inhibiteurs transcriptionnels fixés au promoteur du gène *AP3*. En effet, il existe une protéine à F-box, UFO (UNUSUAL FLORAL ORGANS), liée au complexe ubiquitine-ligase et capable de se lier à LFY en tant que co-facteur afin de réguler l'activité transcriptionnelle de LFY d'une manière dépendante de la machinerie protéolytique. Chae et ses collaborateurs suggèrent qu'UFO promeut la dégradation de protéines fixées sur le promoteur d'*AP3* pour laisser LFY s'y fixer (Chae, et al. 2008). Cette notion de co-facteur était déjà présente dans l'interaction SEP3/LFY où SEP3 joue le rôle de co-facteur pour activer l'expression d'*AP3*, *PI* et *AG*. De plus, AP3 et PI forment des hétérotétramères nécessaires au maintien de chacune de leur expression. Toutes ces données nous indiquent que les gènes identitaires eux-mêmes participent à l'établissement des territoires délimitant les organes et à leur maintien. Cependant, il existe des gènes dont les fonctions sont dédiées à la définition des «frontières».

Deux sortes de «frontières» peuvent être observées, celles entre les verticilles et celles entre les organes au sein de chaque verticille. Les cellules présentes dans ces régions sont caractérisées par des faibles taux de division. Plusieurs gènes dits «cadastraux» ont été caractérisés. Ainsi, le gène *SUPERMAN* (*SUP*) code une protéine à doigt à zinc C2H2 ayant potentiellement une activité de régulateur transcriptionnel négatif, exprimé entre les 3ème et 4ème verticilles (**figure 25**). AP3, PI et AG sont nécessaires pour l'expression de *SUP* dans

cette région où il va réprimer la prolifération cellulaire (Sakai, et al. 2000). Une autre protéine à doigt à zinc, analogue à SUP, RABBIT EARS (RBE), possède la même fonction entre les 2ème et 3ème verticilles en inhibant l'expression d'*AG* dans le 2ème verticille. Les gènes *CUC* qui possèdent ce rôle «cadastral» au sein du méristème végétatif sont également retrouvés au niveau du méristème floral. Ils sont impliqués dans l'individualisation des pétales et leur régulation par les miR164 est conservée. Ainsi, le gène *EARLY EXTRA PETALS 1* (*EEP1*) code le miR164c qui, bien qu'exprimé dans de nombreux tissus, est le seul de cette famille à être présent à la jonction des primordia de pétales (**figure 25**). Le mutant *eep1* possède un phénotype caractéristique avec des pétales surnuméraires montrant qu'une fine régulation des gènes *CUC* est importante pour conserver le nombre d'organes.

Implication des régulateurs de croissance.

Les régulateurs de croissance sont étroitement liés au développement du méristème floral.

Les gibbérellines sont des régulateurs importants du développement du méristème floral. En effet, le mutant *ga1-3* déficient dans la synthèse de gibbérellines, possède un phénotype particulier puisqu'il montre un retard de croissance de toutes les pièces florales, un développement avorté des étamines entraînant une stérilité mâle. Il est intéressant de noter que des mutations dans deux des protéines DELLA, RGA (Repressor of *GA1-3*) et RGL2 (RGA-Like 2), restaurent quasiment un phénotype sauvage chez le mutant *ga1-3*. Ces données indiquent qu'une signalisation correcte en réponse aux gibbérellines est indispensable au développement de la fleur et spécifiquement des étamines. De plus, il a été démontré que les gènes *AP3*, *PI* et *AG* sont activés par l'application exogène de gibbérellines chez les mutants *ga1-3* et à l'inverse, réprimés par l'induction de l'expression de *RGA* (**figure 25**).

Ainsi, les gibbérellines régulent le développement floral en induisant la dégradation des protéines inhibitrices DELLA, RGA et RGL2, levant l'inhibition que celles-ci exercent sur les gènes de la fonction B et C (Yu, et al. 2004). Par ailleurs, une étude globale des gènes induits par AG au cours du développement a révélé qu'AG active des gènes de biosynthèse des gibbérellines tel que le gène *GA4* montrant, là encore, la réciprocité de ces voies de régulation (Gomez-Mena, et al. 2005). Il a été réalisé une étude analogue avec la protéine SEP3 par immunoprécipitation de la chromatine et séquençage haut-débit. Cette étude a montré que SEP3, certainement avec d'autres facteurs de transcription à MADS-box, intègre et module différentes voies de signalisation liées aux hormones, en particulier l'auxine et les gibbérellines (**figure 25**). En effet, parmi les cibles identifiées sur lesquelles se fixent SEP3, il y a des gènes de réponse à l'auxine (les *ARF*) et leurs répresseurs, les *Aux/IAA,* ainsi qu'un gène impliqué dans le transport de l'auxine, *PID*. Ces gènes sont régulés de manière

positive au cours du développement du méristème floral d'une manière similaire à *SEP3*. De plus, il existe des analogies de phénotypes entre les mutants *sep* et les mutants impliqués dans le transport de l'auxine (*pin*, *pid*) et impliqués dans la signalisation (*arf3/ettin*) (Kaufmann, et al. 2009).

La territorialisation des organes fait également intervenir les régulateurs de croissance. Ainsi, le gène *PID*, déjà montré comme étant impliqué dans la restriction de l'expression des gènes *STM* et *CUC*, aurait un rôle dans l'expression du gène *PETAL LOSS* (*PTL*) lequel code un facteur de transcription «trihelix». Les transcrits du gène *PTL* sont exprimés à la jonction des primordia de sépales afin d'inhiber la prolifération cellulaire entre ces derniers pour que les sépales s'individualisent. *PID* est exprimé dans les primordia émergents de sépales mais pas à leur jonction et inhibe l'expression de *PTL* au sein de ces primordia générant un gradient d'auxine propice au développement des sépales. Chez le mutant *ptl*, les quatre sépales se positionnent néanmoins au bon endroit mais rencontrent des problèmes de fusion (Brewer, et al. 2004).

Programmes génétiques et régulation hormonale du développement des ovules.

La fonction D est responsable de l'identité des ovules. Le gynécée formé de deux carpelles fusionnés, est composé de trois structures qui, de la base à l'apex, correspondent respectivement à l'ovaire, au style et les stigmates portant les papilles stigmatiques sur lesquelles le pollen se dépose. Les gènes à MADS-box sont également des régulateurs génétiques clé responsables du développement de ces organes. Ainsi, les gènes *SEEDSTICK* (*STK*) et *SHATTERPROOF 1* et *2* (*SHP1* et *2*) qui appartiennent au même sous-groupe phylogénétique qu'*AG* sont, lorsqu'ils sont exprimés de façon ectopique, capables d'induire la formation d'ovules sur des sépales transformés en structures «carpelloïdes» (Favaro, et al. 2003). Les gènes de la fonction D chez Arabidopsis ont un rôle très précis dans le développement des ovaires, notamment dans la différenciation de la zone de déhiscence au niveau de la marge valvaire permettant l'ouverture de la silique lorsqu'elle atteint la maturité. Les protéines STK, SHP1/2 activent et agissent avec les facteurs de transcription bHLH (basic Helix Loop Helix) INDEHISCENT (IND) et ALCATRAZ (ALC). La restriction des territoires d'expression de ces gènes résulte d'interactions entre les gènes responsables de l'identité de chaque territoire. Ainsi, le gène *FRUITFULL* (*FUL*), exprimé dans la valve et *REPLUMLESS* (*RPL*) exprimé au niveau du *replum*, restreignent l'expression de *STK*, *SHP1/2*, *IND* et *ALC* au niveau de la marge valvaire au stade pendant lequel se forme la zone de déhiscence.

Les régulateurs de croissance jouent un rôle prépondérant dans la formation des territoires au niveau des carpelles. Deux gènes codant pour des protéines ayant un domaine RING impliqué dans la liaison du zinc, *STYLISH 1* et *2* (*STY1* et *2*) participent de manière

redondante au développement du style et du stigmate. Le double mutant *stylish1/2* montre des défauts phénotypiques au niveau de ces organes mais aussi des caractéristiques propres aux mutants affectés dans le transport de l'auxine ou dans sa biosynthèse. En effet, il a été montré que le double mutant *stylish1/2* est hypersensible à un inhibiteur du transport de l'auxine et que STY1 est impliqué dans la régulation du gène *YUCCA4* responsable de la synthèse d'auxine au niveau apical du gynécée (Sohlberg, et al. 2006). Un autre gène, *SPATULA* (*SPT*), qui code un facteur de transcription bHLH, est exprimé au niveau de la marge valvaire et du tissu de transmission au niveau du style participant ainsi à son développement. *SPT* est régulé par un effecteur de la voie auxinique. Un parallèle a été fait entre un facteur de réponse à l'auxine, la protéine ARF3/ETTIN (ETT) et SPT. En effet, un mutant *ett* ne possède pas de tissu valvaire mais ce phénotype est réversible chez le double mutant *spt/ett*. ETTIN semble réguler négativement *SPT* dans les régions abaxiales du gynécée au cours de son développement (Balanza, et al. 2006; Heisler, et al. 2001). Par ailleurs, des interactions entre les gènes *SPT* et *STY* sont supposées puisque les doubles mutants *spt/sty* montrent un effet épistatique de la mutation *spt* sur la mutation *sty.* L'ensemble de ces données suggèrent que ces trois gènes pourraient être impliqués dans une même voie de signalisation. Enfin, il existe un lien étroit entre *IND* et le transport de l'auxine *via* les gènes *PIN* et *PID*. En effet, les travaux de Sorefan et al. (2009) ont montré qu'une quantité minimale d'auxine est requise pour la spécification de la marge valvaire afin que la déhiscence du fruit se produise (Sorefan, et al. 2009). La localisation de PIN résulte de son état de phosphorylation, dépendant de l'activité de la kinase WAG2. Il a été montré qu'IND coordonne le transport de l'auxine dans la marge valvaire en inhibant *PID* et en induisant *WAG2* au niveau de cette zone, entraînant la relocalisation de PIN afin de générer un minima d'auxine au sein de la marge valvaire permettant le bon développement de ce tissu.

5. Terminaison florale.

Les méristèmes floraux sont des structures déterminées qui perdent leur capacité à maintenir un pool de cellules souches. Ils produisent un nombre précis d'organes floraux dont les derniers sont les carpelles. La mise en place des deux carpelles d'Arabidopsis va consommer les cellules souches restantes et la croissance va s'arrêter. Afin que ce phénomène se produise, il est essentiel d'inhiber l'expression de *WUS*, gène clé dans la maintenance méristématique.

Les gènes *CLV* ont un rôle prépondérant dans cette inhibition et ce, dès la mise en place du méristème végétatif. En effet, Schoof et son équipe (2000) ont comparé les phénotypes des mutants *wus* et *clv* au niveau des méristèmes. Au premier stade de développement, les méristèmes floraux des mutants *wus* sont identiques à ceux de la plante de type sauvage.

Il va y avoir formation des sépales et des pétales dans les deux premiers verticilles puis le méristème floral du mutant *wus* se termine par une étamine centrale sans formation d'organe femelle. A l'inverse, les mutants *clv1* et *clv3* ont des fleurs semblables à celles de la plante de type sauvage mais elles sont plus larges et produisent des organes en surnombre, notamment étamines et carpelles. Les auteurs proposent que la production de ces organes surnuméraires soit le résultat d'une expression ectopique de *WUS* au niveau du gynécée en l'absence du contrôle négatif exercé par les gènes *CLV* à la fin du développement floral (Schoof, et al. 2000).

Le gène *AG* possède un rôle majeur dans l'inhibition de *WUS*. En effet, les mutants *ag* sont caractérisés par leur indétermination résultant en une réitération multiple de verticilles de sépales et de pétales. L'expression d'*AG* est induite au stade 3 du développement du méristème floral *via* l'action combinée de WUS et LFY. Or l'inhibition de *WUS* ne survient qu'au stade 6 du développement lorsque les carpelles sont formés, ce qui représente un délai de deux jours entre les deux processus (Lenhard, et al. 2001; Lohmann, et al. 2001). Le contrôle négatif exercé par AG sur *WUS* n'est pas direct puisqu'au moins un gène a été identifié comme étant activé par AG et nécessaire pour la répression de *WUS*. Il s'agit du gène *KNUCKLES* (*KNU*) qui code pour une protéine à doigt à zinc C2H2 ayant potentiellement une activité transcriptionnelle négative. Ce gène est exprimé au bon endroit, au centre du méristème, et au bon moment, au stade 6 du développement floral (Payne, et al. 2004). Récemment, Sun et al. (2009) ont montré qu'AG se fixe sur le promoteur de *KNU*. Ce gène porte une marque épigénétique répressive qui diminue progressivement lorsque l'expression d'*AG* est induite, permettant au gène *KNU* de s'exprimer laissant un délai de réponse entre l'activation d'*AG* et l'inhibition de *WUS* (Sun, et al. 2009).

Trois gènes ont été identifiés comme ayant une activité de régulation temporelle de la terminaison florale. Le gène *CRABS CLAW* (*CRC*) est un gène de la famille YABBY exprimé spécifiquement dans les carpelles. Lorsqu'il est muté, les carpelles sont non seulement plus petits mais montrent un défaut de fusion au niveau de leur apex. En revanche, des doubles mutants *crc ag* et *crc spatula* montrent l'apparition de nouveaux organes au milieu des carpelles, ce qui montre que ce gène peut avoir un effet combiné dans la terminaison florale. C'est donc dans ce fond génétique de mutant *crc* que de nouveaux gènes potentiellement impliqués dans la terminaison florale ont été recherchés. Ainsi, les gènes *REBELOTE* (*RBL*), *SQUINT* (*SQN*) et *ULTRAPETALA 1* (*ULT1*) ont été isolés et analysés. *RBL* code une protéine de fonction inconnue, *SQN* code une cyclophiline ayant un rôle de type «heat shock» chez l'homme et *ULT1* code une petite protéine à domaine SAND, impliqué dans la liaison à l'ADN. Ces trois gènes n'ont donc rien en commun et agissent vraisemblablement dans des mécanismes indépendants pour contrôler la terminaison florale.

En effet les doubles mutants *crc rbl*, *crc sqn* et *crc ult1* montrent un défaut de terminaison florale en initiant, au centre du méristème floral, de nouveaux organes, principalement étamines et carpelles. Chez ces doubles mutants, l'expression des gènes *WUS* et *CLV* n'est pas altérée, en revanche, il apparaît que *SQN* et *ULT1* activent l'expression d'*AG* au niveau du 4ème verticille. Ces gènes sont certes impliqués dans des mécanismes distincts mais ils apparaissent comme ayant une action redondante dans le contrôle de la terminaison florale au vu des phénotypes des doubles mutants combinés de ces gènes. Dans les simples mutants de chacun de ces gènes, de faibles modifications phénotypiques sont observées mais lorsque ces mutations sont combinées entre elles ou avec les mutations des gènes *AG*, *SUP* et *CRC*, les phénotypes montrent une forte indétermination méristématique (Prunet, et al. 2008).

V Une nouvelle classe de gènes spécifiques du développement floral: les gènes ZF-HD ?

L'ensemble des organismes ont des protéines dotées d'un domaine de fixation à l'ADN appelé «homéodomaine». Ainsi, les plantes possèdent une centaine de gènes codant des protéines à homéodomaine organisées en diverses classes selon leurs homologies de séquences et surtout selon leurs rôles chez la plante. Certaines protéines à homéodomaine, déjà évoquées précédemment, ont un rôle primordial dans le développement de la plante. Ainsi, les gènes de la famille *KNOX* sont essentiels à la maintenance méristématique alors que la classe des gènes *WOX*, dont fait partie *WUS*, ont un rôle dans le développement de l'embryon et dans la maintenance des cellules souches (Tan and Irish 2006). Les protéines ZF-HD (Zinc Finger-Homeodomain) constituent une nouvelle classe de protéines à homéodomaine possédant également un motif «doigt à zinc». La majorité des membres de cette classe sont principalement exprimés dans la fleur. Nous aborderons plus loin la caractérisation d'un groupe de protéines ne possédant que le motif doigt à zinc, les protéines MIF (Mini zinc Finger).

1. Les protéines ZF-HD.

Les protéines ZF-HD ou ZHD n'ont pas été caractérisées chez Arabidopsis mais chez *Flaveria trinervia* et *Flaveria bidentis*, plantes à fleurs de la famille des Astéracées. En effet, chez ces plantes, quatre protéines ZHD ont été identifiées par leur capacité à se fixer sur la région promotrice du gène codant la phosphoénolpyruvate carboxylase C4. La caractérisation de ces quatre protéines a conduit à identifier leur homéodomaine et un motif très conservé en amont de l'homéodomaine correspondant à un motif doigt à zinc. Ce motif doigt à zinc semble impliqué dans des interactions protéine-protéine permettant l'homo- ou l'hétérodimérisation des protéines ZHD (Windhovel, et al. 2001). Il existe 14 gènes *ZHD* chez Arabidopsis, 17 gènes chez le peuplier et 11 gènes chez le riz.

Chez Arabidopsis, les protéines ZHD sont de petite taille (la plus grande séquence étant de 334 acides aminés) et aucun des gènes correspondants ne contient d'introns. L'homéodomaine chez les protéines ZHD possède quelques variations non répertoriées dans les homéodomaines décrits jusqu'ici. Ainsi, il existe une phénylalanine en position 49 connue pour avoir un rôle capital dans le repliement du domaine afin de stabiliser la structure hydrophobique qui se lie à l'ADN. Chez les protéines ZHD, cet acide aminé est remplacé par un résidu non polaire qui, lorsqu'il est muté en phénylalanine ou alanine, empêche l'association de la protéine ZHD sur l'ADN. Il existe donc des acides aminés spécifiques de l'homéodomaine des protéines ZHD qui confèrent des caractéristiques particulières lors de la fixation sur l'ADN. Les séquences sur lesquelles se fixent les protéines ZHD semblent posséder une séquence consensus de vingt nucléotides contenant le motif «ATTA».

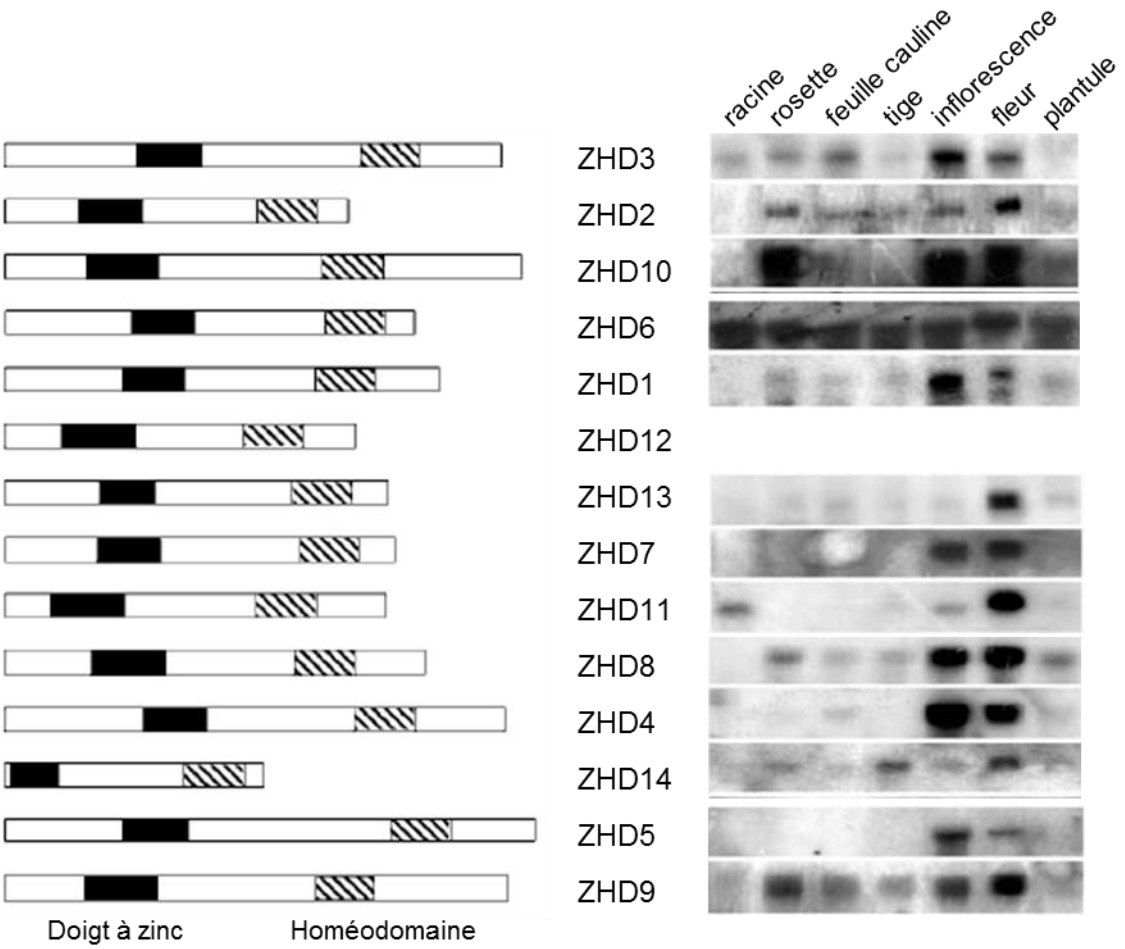


Figure 26: Organisation structurale des domaines des protéines ZHD et analyse de l'expression des gènes *ZHD* (d'après Tan, et al. 2006).

De façon intéressante, la majorité des protéines ZHD ne contiennent pas de domaine d'activation de la transcription suggérant que ces protéines nécessitent l'association avec d'autres facteurs pour avoir un rôle de régulateur transcriptionnel. L'association avec d'autres partenaires se produit sans doute grâce au domaine en amont de l'homéodomaine qui correspond à un motif doigt à zinc (**figure 26**). Ce motif contient huit acides aminés cystéine et histidine très conservés, qui sont organisés dans le motif suivant $\underline{C}X_3\underline{H}X_{11}\underline{C}X_{12\text{-}26}\underline{C}X_2\underline{C}X\underline{CH}X_3\underline{H}$ (les acides aminés conservés sont soulignés, le «X» désigne un acide aminé quelconque et le nombre en indice indique le nombre d'acides aminés). Ce domaine est suffisant pour la dimérisation des protéines ZHD. Les mutations des résidus cystéines inhibent cette interaction. La longueur du peptide séparant le premier motif «$CX_3HX_{11}C$» du second «CX_2CXCHX_3H» est très importante pour permettre la dimérisation des protéines ZHD (Tan and Irish 2006).

Les transcrits de treize des gènes *ZHD* ont été détectés de façon prédominante dans la fleur (**figure 26**). Ainsi, les gènes *ZHD5* et *ZHD7* sont détectés strictement dans la fleur alors que les autres gènes sont exprimés majoritairement dans la fleur mais ils peuvent aussi être exprimés plus faiblement dans d'autres tissus. Certains seront plus spécifiques de la fleur jeune, comme les gènes *ZHD1*, *3* et *4*, alors que d'autres seront plus exprimés dans la fleur âgée, *ZHD2*, *11* et *13*. Neuf lignées mutantes indépendantes de certains de ces gènes n'ont pas permis d'identifier de phénotype particulier soulignant le fait que ces gènes doivent fonctionner de manière redondante dans la fleur. Il apparaît que les protéines ZHD soient plus aptes à former des hétérodimères que des homodimères, exception faite de la protéine ZHD2 qui interagit fortement avec elle-même. La protéine ZHD11 possède un domaine d'activation de la transcription et est capable d'interagir potentiellement avec les autres protéines ZHD. Ainsi, la protéine ZHD11 peut servir de partenaire aux autres protéines ZHD, ZHD11 activant la transcription pendant que l'autre protéine ZHD confère la spécificité d'interaction avec l'ADN. Seule la protéine ZHD12 ne semble pas interagir avec les autres membres de sa famille mais l'expression du gène *ZHD12* n'a pu être détecté chez Arabidopsis suggérant l'hypothèse que le gène *ZHD12* soit un pseudogène (Tan and Irish 2006).

Quelques études ont démontré le rôle de certaines des protéines ZHD dans le développement de la plante. Chez le soja, les protéines ZHD1 et ZHD2 sont capables d'induire l'expression du gène codant l'isoforme 4 de la calmoduline afin de déclencher les réponses de défense de la plante contre l'attaque d'un pathogène (Park, et al. 2007). Chez Arabidopsis, deux études ont identifiées les rôles des protéines ZHD1 et ZHD5 dans la réponse à l'acide abscissique. En effet, la protéine ZHD1 se fixe sur le promoteur du gène *ERD1* (*EARLY RESPONSE TO DEHYDRATION STRESS 1*) afin d'induire l'expression du

gène *ERD1*. La protéine ZHD1 est capable d'interagir avec un autre facteur de transcription appartenant à la famille NAC, du nom d'un domaine très conservé à l'extrémité N-terminale de ces protéines. Ces deux protéines agissent conjointement dans l'expression du gène *ERD1*. Le gène *ERD1* est induit lors de phénomènes de sécheresse et le gène *ZHD1* est lui aussi induit par le stimulus sécheresse, mais aussi par le stress salin et l'acide abscissique. Ainsi, les plantes surexprimant le gène *ZHD1* et le gène codant le facteur de transcription NAC, montrent une tolérance accrue au stress de déshydratation (Tran, et al. 2007). Enfin, la protéine ZHD5 participe positivement à la germination et à la croissance de la racine primaire en agissant dans la signalisation conduisant dans la réponse à l'acide abscissique. En effet, le facteur de transcription ARF2, qui permet initialement l'expression des gènes de réponse à l'auxine, réprime la réponse à l'acide abscissique en inhibant la transcription du gène *ZHD5*. La production du facteur de transcription ARF2 est induite par l'acide abscissique. ARF2 va inhiber la transcription du gène *ZHD5* et par voie de conséquence, au moins partiellement, les processus de germination et de croissance racinaire (Wang, et al. 2011).

Au niveau phylogénétique, les gènes *ZHD* forment un groupe monophylétique distinct des autres classes de gènes codant des protéines à homéodomaine. Dans ce groupe que composent les gènes *ZHD*, il apparaît trois couples qui semblent issus d'une duplication de gènes et qui montrent une taille similaire du peptide «linker» entre l'homéodomaine et le motif doigt à zinc. En effet, il apparaît que de multiples duplications génétiques sont intervenues avant la séparation des groupes composant les Angiospermes. Cependant, l'association du motif doigt à zinc et de l'homéodomaine dans les protéines ZHD n'est apparue que chez les Gymnospermes et les Angiospermes soulignant le fait que ces protéines ont un ancêtre commun.

Plus récemment, il a été identifié une petite famille de protéines fortement apparentée aux protéines ZHD, les protéines MIF (Hu et Ma, 2006). Chez Arabidopsis, cette famille de protéines ne contient que trois membres nommés MIF1, MIF2 et MIF3. La caractéristique principale de ces protéines est qu'elles possèdent le motif doigt à zinc commun aux protéines ZHD, mais pas l'homéodomaine. Les protéines MIF des Gymnospermes forment un groupe monophylétique distinct du groupe des Angiospermes suggérant une duplication ayant eu lieu postérieurement à la séparation des Gymnospermes et des Angiospermes. Une analyse phylogénétique réalisée uniquement avec les séquences des motifs doigt à zinc, communs aux protéines MIF et ZHD, montre que les protéines MIF forment un clade à part du clade composé des protéines ZHD et suggèrent que les protéines MIF dérivent des protéines ZHD par perte de l'homéodomaine (Hu, et al. 2008).

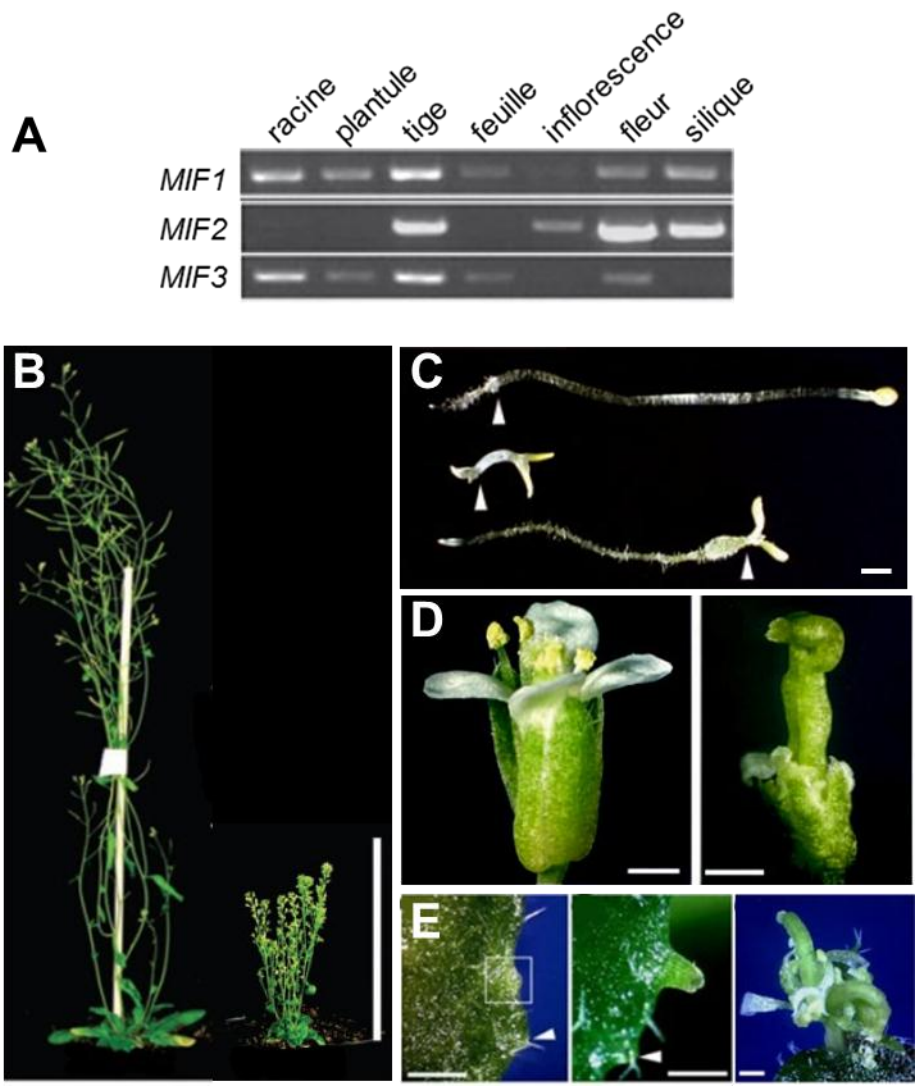


Figure 27: Expression spatiale des gènes MIF (A) et phénotypes des plantes surexprimant le gène *MIF1* (B à E) (d'après Hu and Ma, 2006, Hu, et al. 2011).

(B) Phénotype de plants d'*Arabidopsis thaliana* âgées de 8 semaines, plante de type sauvage à gauche et plante 35S::*MIF1* à droite (échelle 10 cm).

(C) Phénotype des plantules âgées de 5 jours ayant été cultivées à l'obscurité: plantule de type sauvage en haut, mutant *det1* au milieu et plantule 35S::*MIF1* en bas (échelle 1mm). La flèche indique la jonction entre la racine et l'hypocotyle.

(D) Phénotypes des fleurs de type sauvage (à gauche) et des fleurs des plantes 35S::*MIF1* (à droite) (échelle 0,5mm).

(E) Phénotypes des plantes 35S::*MIF1* et 35S::*MIF3* ayant des méristèmes ectopiques dans les dentelures des feuilles (échelle 0,5mm).

2. Les protéines MIF.

Tout comme les gènes *ZHD*, les gènes *MIF* ne contiennent pas d'introns. En revanche, à l'inverse des gènes *ZHD*, les gènes *MIF* présentent un profil d'expression caractéristique pour chacun d'entre eux. Ainsi, les gènes *MIF1* et *MIF3* sont fortement exprimés dans les tissus de la racine et de la tige alors que le gène *MIF2* est spécifique de la fleur et de la silique (**figure 27A**). Les gènes *MIF1* et *MIF3* sont très homologues car ils semblent être issus d'une duplication de gène très récente. Ces protéines sont petites, environ 100 acides aminés et ressemblent fortement à l'extrémité N-terminale des protéines ZHD dans la séquence du motif doigt à zinc composé de cinq cystéines et trois histidines organisées d'après le même arrangement décrit précédemment.

Les gènes MIF1 et MIF3.

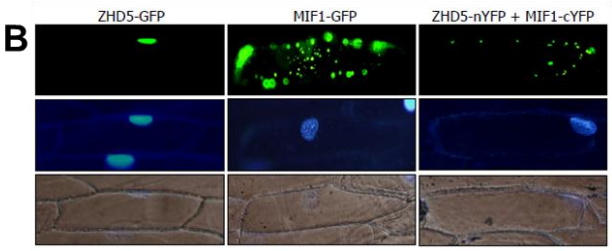
La première étude visant à caractériser le rôle fonctionnel de ces gènes s'est intéressée au gène *MIF1*. Il n'a pas été possible de caractériser des plantes sous-exprimant le gène *MIF1* car elles ne présentaient pas de phénotype visible suggérant une possible complémentation de la fonction de *MIF1* par le gène *MIF3*, exprimé dans les mêmes tissus, et la perte-de-fonction pour le gène *MIF1* semble être létale. En revanche, des plantes surexprimant le gène *MIF1* présentent de nombreux défauts phénotypiques au cours du développement végétatif et reproductif. Les lignées surexprimant le gène *MIF1* présentent une gradation dans la sévérité des phénotypes mais nous nous attarderons sur les phénotypes les plus sévères. Les plantes surexprimant le gène *MIF1* montrent une perte de la dominance apicale caractérisée par un phénotype buissonnant et un nanisme prononcé (**figure 27B**). Les feuilles de la rosette sont très foncées et déformées, présentant une épinastie prononcée. La croissance de la plante est extrêmement ralentie et la floraison est retardée par rapport à des conditions normales, de quelques jours à plusieurs mois. Les fleurs de ces plantes sont majoritairement stériles présentant une diminution de la taille de certains organes, tels que les sépales qui peuvent présenter des fusions et un développement de structures apparentées à des ovules au niveau de la marge. Les pétales et les étamines sont eux aussi très petits alors que le pistil semble croître de façon normale exposant les papilles stigmatiques de façon précoce. Cependant, le gynécée peut parfois être déformé ou courbé (**figure 27D**). D'une manière générale, le gène *MIF1* inhibe la croissance de la plante y compris la croissance de la fleur en découplant cependant la croissance du pistil par rapport aux autres organes floraux et entraîne une modification partielle des sépales en carpelles. Au niveau cellulaire, le gène *MIF1* inhibe l'élongation et l'expansion. Les plantules surexprimant le gène *MIF1* présentent des défauts de développement liés aux signaux lumineux et hormonaux. En effet, ces plantules ne présentent pas de skotomorphogèse (**figure 27C**) et deviennent insensibles aux

phytohormones auxine et gibbérellines alors qu'elles sont hypersensibles à la présence d'acide abscissique. Ces défauts dans la réponse aux phytohormones sont visibles au niveau des phénotypes ainsi qu'au niveau de l'expression des gènes de réponse à ces phytohormones. Ainsi, les gènes de réponse à l'auxine et aux gibbérellines sont sous-exprimés alors que les gènes de réponse à l'acide abscissique sont fortement induits (Hu and Ma 2006).

Une étude plus récente a montré que la surexpression des gènes *MIF* chez Arabidopsis, inhibe le caractère déterminé de l'organe dans lequel ils s'expriment. D'une manière générale, la surexpression des gènes *MIF2* et *MIF3* chez Arabidopsis, entraîne l'apparition de phénotypes similaires à ceux observés pour le gène *MIF1* suggérant que les mêmes cibles peuvent être indifféremment affectées par les protéines MIF. En revanche, alors que la surexpression du gène *MIF1* entraîne des altérations phénotypiques graduelles en fonction du niveau de surexpression du transgène, la surexpression du gène *MIF2* entraîne des défauts phénotypiques classés comme «modérés» et la surexpression du gène *MIF3* provoque 90% de phénotypes dit sévères. Ceci est certainement dû à la différence fonctionnelle du gène *MIF2* par rapport aux gènes *MIF1* et *MIF3* issus d'une duplication de gènes. Cependant, la surexpression des gènes *MIF1* et *MIF3* provoquent l'apparition d'un phénotype particulier correspondant à la formation de méristèmes ectopiques au niveau des espaces générés par la dentelure foliaire sur les feuilles de rosette (**figure 27E**). Ces méristèmes apparaissent uniquement pour les plantes présentant un phénotype sévère et sur des feuilles de rosette matures, ce qui suggère qu'une certaine compétence des cellules est requise pour la génération de ces nouveaux méristèmes. Une feuille de rosette contient quatre à cinq dentelures sur un côté, ce qui devrait entraîner la formation de dix méristèmes ectopiques par feuille d'Arabidopsis or un maximum de quatre méristèmes ectopiques peut être observé par feuille, un à dix par plante. Le premier méristème apparait lorsque la première inflorescence commence à produire des fleurs. Dans les cas les plus extrêmes, les méristèmes ectopiques produisent quelques feuilles caulinaires et éventuellement un axe inflorescentiel de taille très réduite qui fleurit si la feuille n'est pas entrée en sénescence à ce moment-là. Les fleurs ainsi produites présentent les mêmes défauts phénotypiques que les fleurs produites au niveau de l'axe inflorescentiel principal. En revanche, les méristèmes ectopiques produits par la surexpression du gène *MIF3* ne produisent jamais de fleurs. Ces méristèmes possèdent certaines caractéristiques du méristème apical à savoir l'expression du gène *STM* au niveau de la protrusion donnant naissance au méristème ectopique puis au centre du méristème ectopique mais pas dans les autres régions de la feuille. De plus, il apparaît que les réponses aux auxines et gibbérellines soient perturbées dans les plantes surexprimant le gène *MIF3* comme cela avait déjà été souligné lors de la surexpression du

A

	MIF1	MIF2	MIF3
ZHD1	++	++	-
ZHD2	+	-	-
ZHD3	-	+++	+++
ZHD4	-	-	-
ZHD5	+++	+++	+++
ZHD6	++	+	++
ZHD7	+++	+	+++
ZHD8	+++	+++	+++
ZHD9	-	-	+++
ZHD10	++	+++	+++
ZHD11	-	-	-
ZHD12	-	-	-
ZHD13	+++	+++	+++
ZHD14	-	-	-



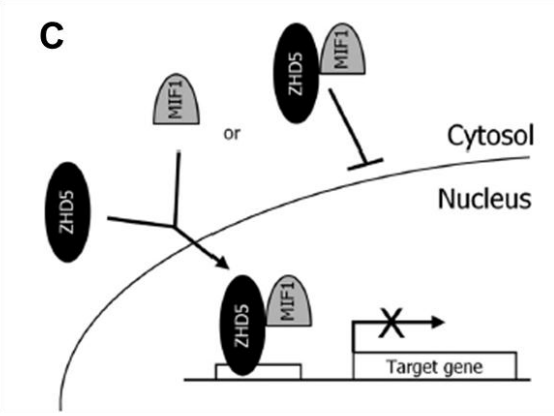


Figure 28: Interactions entre les protéines MIF et les protéines ZHD (a) et cas spécifique de l'interaction MIF1-ZHD5 (b et c) (d'après Hong, et al. 2011).

(*a*) Tableau récapitulant les interactions en double hybride ciblé entre les 14 protéines ZHD et les trois protéines MIF. -: pas d'interaction, + à +++: interaction de plus en plus importante.

(b) Localisation subcellulaire des protéines ZHD5-GFP (colonne de gauche), MIF1-GFP (colonne du milieu) et localisation du complexe ZHD5-MIF1 en BiFC (colonne de droite) dans des cellules d'épiderme d'oignon. Ligne du haut: visualisation de la GFP, ligne du milieu: visualisation du DAPI, marqueur de l'ADN (noyau) et ligne du bas: visualisation des cellules en lumière transmise.

(c) Schéma bilan de la régulation de MIF1 sur ZHD5: MIF1 inhibe ZHD5 soit en l'empêchant de se fixer sur les promoteurs des gènes pour lesquels ZHD5 participe à la régulation ou en séquestrant ZHD5 dans le cytosol.

gène *MIF1*. En effet, les gibbérellines restreignent l'expression des gènes *KNOX* tels que le gène *STM* au niveau du méristème apical. Ainsi, l'application exogène de gibbérellines sur les plantes surexprimant le gène *MIF1* inhibe la formation des méristèmes ectopiques. De plus, la réponse au signal auxinique est fortement réduite chez ces plantes. Ces éléments suggèrent que les régions crées par les dentelures foliaires sont des zones quiescentes capables de retourner à une croissance indéterminée. Ainsi, les gènes *MIF1* et *MIF3* sont des activateurs potentiels de la formation des méristèmes et bouleversent la signalisation hormonale (Hu, et al. 2011). Ce rôle probable des gènes *MIF* dans l'activité méristématique peut résulter de l'interaction des protéines MIF avec les protéines ZHD.

En effet, il a été montré que la protéine MIF1 est capable d'interagir avec le facteur de transcription ZHD5 chez Arabidopsis (Hong, et al. 2011). La protéine ZHD5 est impliquée dans la régulation de l'architecture florale et dans le développement de la feuille. D'une manière générale, d'après une expérience de double hybride, les trois protéines MIF interagissent avec les protéines ZHD mais avec certaines spécificités. Certaines protéines ZHD ne montrent pas de préférence tel que le facteur de transcription ZHD5 qui interagit fortement avec les trois protéines MIF alors que d'autres ne montrent aucune interaction avec les protéines MIF (ZHD4, 11, 12 et 14) (**figure 28A**). Les auteurs de cette étude ont choisi le couple protéique MIF1-ZHD5 et ont montré que ces deux protéines, au-delà de leur interaction sont capables, de s'homodimériser *via* le motif doigt à zinc. L'effet de cette interaction entre les protéines MIF1 et ZHD5 est double (**figure 28C**). Premièrement, MIF1 empêche en partie la fixation de la protéine ZHD5 sur la séquence consensus «ATTA», et réduit fortement l'activité transcriptionnelle de ZHD5, certainement en inhibant l'hétérodimérisation de ZHD5 avec un facteur de transcription. Le second mode d'inhibition de MIF1 sur ZHD5 passe par la séquestration de la protéine ZHD5 en dehors du noyau où doit agir cette protéine (**figure 28B**). Enfin, l'inhibition de la protéine MIF1 sur la protéine ZHD5 a été vérifiée *in planta*. En effet, à l'inverse des plantes surexprimant le gène *MIF1*, les plantes qui surexpriment le gène *ZHD5* montrent une croissance accélérée avec des feuilles plus larges. Les plantes surexprimant les gènes *MIF1* et *ZHD5* ont été croisées et présentent dans l'ensemble des phénotypes ressemblants à ceux d'une plante de type sauvage. Il est important de noter que l'expression des deux gènes *MIF1* et *ZHD5* ne semble pas être modifiée dans ces plantes, excluant la possibilité d'une régulation transcriptionnelle entre ces deux gènes (Hong, et al. 2011).

Le gène MIF2.

Le rôle du gène *MIF2* a été étudié chez la tomate par l'équipe «Organogenèse du Fruit et Endoréduplication (OrFE)» de l'UMR 1332 dans laquelle j'ai effectué ma thèse. L'orthologue du gène *MIF2* chez la tomate se nomme *IMA* pour *INHIBITOR OF MERISTEM ACTIVITY*

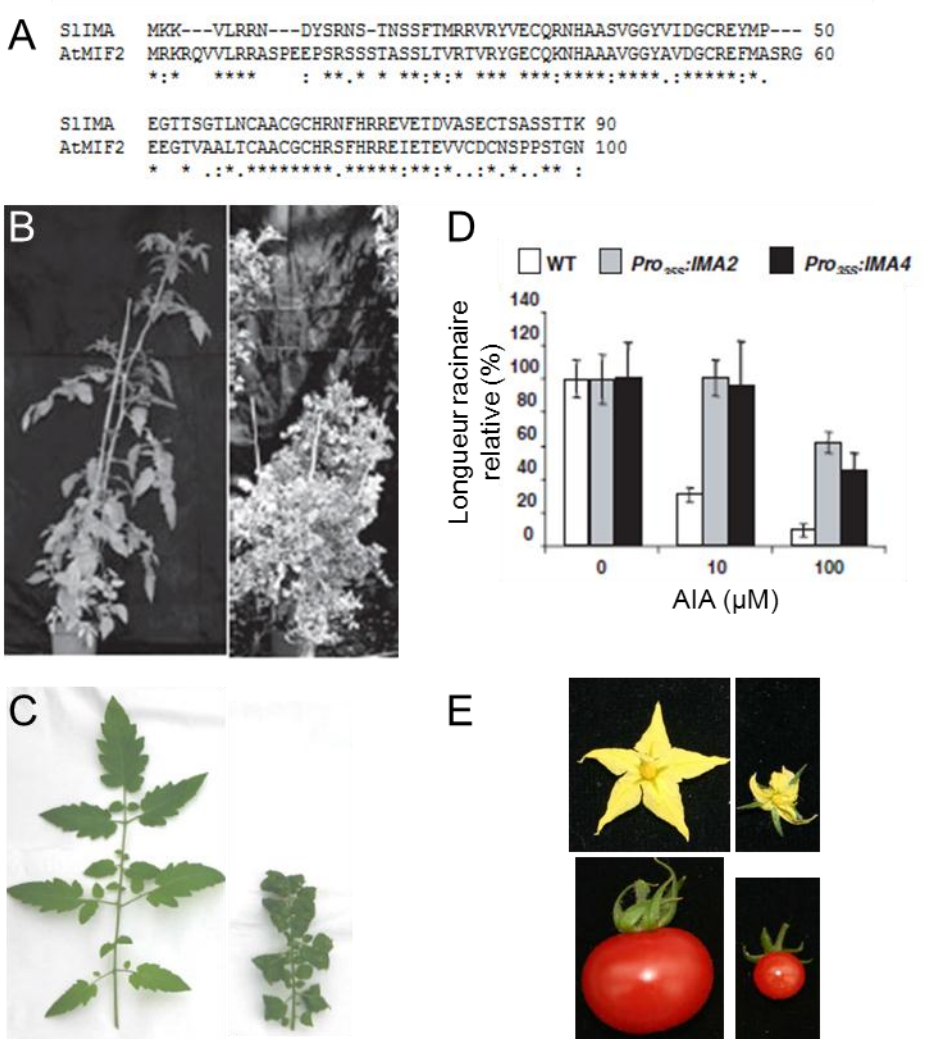


Figure 29: Alignement des séquences protéiques IMA et MIF2 (A) et phénotypes des plantes surexprimant le gène *IMA* (B-E).

L'alignement des séquences des protéines IMA de tomate et MIF2 d'Arabidopsis est représenté en A (CLUSTALW2).

Phénotypes des plantes IMA^{OE} au niveau de la plante adulte (B), de la feuille (C) et des fleurs et fruits (E). La plante de type sauvage est à gauche et les plantes IMA^{OE} à droite (Sicard, et al. 2008).

L'effet de l'auxine sur la croissance racinaire est représenté en (D), les plantes $IMA^{OE}2$ ont un phénotype modéré dû à une moins forte expression du transgène. Les plantes $IMA^{OE}4$ ont des modifications phénotypiques sévères et sont aussi illustrées en B, C et E (Sicard, et al. 2008).

(Sicard, et al. 2008). La fonction d'IMA caractérisée *in planta* montre qu'il agit comme un répresseur de l'expression du gène *SlWUS* et qu'il inhibe la prolifération cellulaire durant la terminaison florale. Chez la tomate, il existe deux protéines de la famille MIF, IMA qui partage 62% d'identité de séquence avec la protéine MIF2 d'*Arabidopsis thaliana* (**figure 29A**) et une protéine apparentée à MIF1 qui partage 57% d'identité de séquence avec les protéines MIF1 et MIF3.

Les transcrits du gène *IMA,* comme ceux du gène *MIF2* d'*Arabidopsis thaliana*, s'accumulent dans la fleur et durant les phases précoces de développement du fruit, plus précisément durant la phase dite de «divisions cellulaires». Au niveau de la fleur, le gène *IMA* s'exprime principalement dans des zones où les processus de division sont très actifs, notamment dans les primordia de pétales, au centre du primordium de carpelles et au niveau des zones apicales des sépales et des pétales en croissance et tout particulièrement, au niveau de chaque primordium d'ovule. De la même manière que pour les plantes surexprimant le gène *MIF1*, les plantes surexprimant le gène *IMA* présentent une taille réduite accompagnée d'une perte de la dominance apicale (**figure 29B**). Les feuilles sont plus foncées et présentent une épinastie prononcée (**figure 29C**). Les plantules présentent une insensibilité à l'auxine et aux cytokinines au niveau de la croissance racinaire (**figure 29D**). Les fleurs et les fruits sont de taille réduite et les fruits produisent moins de graines suggérant une faible fertilité (**figure 29E**). Cependant, le gynécée est plus large que le gynécée sauvage et présente un nombre plus important d'ovules. En revanche, des plantes ayant une construction anti-sens ou RNAi ciblant le gène *IMA*, ne présentent pas de phénotypes au niveau végétatif mais montrent des gynécées plus larges dont les stigmates ne sont pas accessibles au pollen porté par les étamines de ces plantes limitant la pollinisation. Ces plantes perte-de-fonction pour le gène *IMA* peuvent avoir, au lieu des deux carpelles habituellement présents chez la plante de type sauvage, trois à neuf carpelles fusionnés. Au niveau cellulaire, les plantes surexprimant le gène *IMA* présentent un nombre réduit de cellules et à l'inverse, les plantes sous-exprimant le gène *IMA* présentent une augmentation du nombre de cellules, ce qui suggère qu'IMA est un inhibiteur de la division cellulaire. La formation de nouveaux carpelles dans les plantes sous-exprimant le gène *IMA* suggère que l'arrêt de l'activité méristématique ne s'est pas produit normalement. En effet, chez ces plantes, le gène *SlWUS,* orthologue du gène d'*Arabidopsis thaliana*, est exprimé bien plus longtemps au cours du développement du gynécée que chez les plantes de type sauvage alors que les transcrits du gène *SlWUS* sont indétectables au niveau du méristème floral des plantes surexprimant le gène *IMA*. En fait, IMA va inhiber l'expression du gène *SlWUS* afin de promouvoir l'arrêt de la prolifération cellulaire et le développement des ovules achevant le développement de la fleur (Sicard, et al. 2008a; Sicard, et al. 2008b).

Ainsi, cette dernière étude ouvre des perspectives encourageantes pour expliquer le mécanisme d'action des protéines MIF qui semblent avoir un rôle prépondérant dans l'activité du méristème végétatif et du méristème floral. Ces premiers éléments soulignent un potentiel rôle intégrateur de ces protéines dans la signalisation hormonale modulant ainsi, le développement de la plante à différents niveaux. Cependant, les mécanismes permettant d'expliquer ce rôle restent sont encore très largement inconnus.

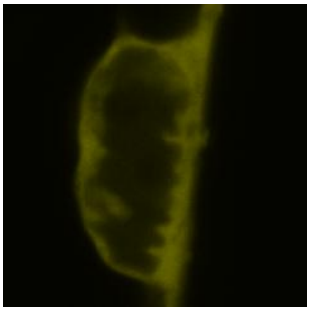
VI Présentation du travail de thèse.

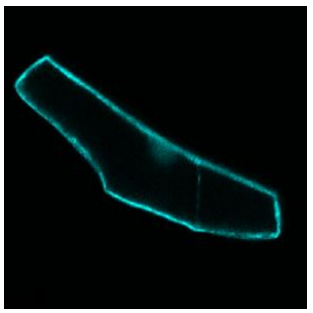
L'UMR 1332 «Biologie du Fruit et Pathologie» et tout particulièrement l'équipe OrFE vise à acquérir une meilleure connaissance des mécanismes physiologiques qui interviennent au cours du développement du fruit de tomate (*Solanum lycopersicum*). Le programme de développement précoce du fruit se déroule schématiquement en trois phases successives. La phase I conduit à la maturation de l'ovaire et à la "décision" de former un fruit (nouaison) ou d'avorter. La phase II se traduit principalement par une activité mitotique intense au niveau de tous les tissus de l'ovaire. La phase III est essentiellement caractérisée par une expansion cellulaire et par une augmentation considérable du volume du fruit, aboutissant à un fruit apte à s'engager dans les processus de la maturation (**figure 46, chapitre Matériels et Méthodes**). Ainsi, l'élaboration de caractères primordiaux pour la qualité du fruit (comme sa taille, sa masse et sa composition en métabolites primaires et secondaires) se détermine précocement au cours du développement. Une des stratégies mise en place par l'équipe OrFE a été d'identifier des gènes exprimés au cours des phases précoces du développement du fruit et notamment au cours des phases de division cellulaire. Parmi ces gènes, le gène *IMA*, qui vient d'être décrit, appartient à la famille des protéines MIF. Son rôle au sein du développement de la fleur et du fruit est caractérisé et consiste à stopper le programme de prolifération au profit de la différenciation cellulaire qui va permettre de parachever le développement de la fleur (Sicard 2007). Cependant, le fait que la protéine IMA possède un motif doigt à zinc, spécifique d'interactions protéine-protéine, a conduit à s'interroger sur l'identité de ses partenaires protéiques et sur son mode d'action au niveau moléculaire.

Le travail présenté dans ce manuscrit est divisé en deux grandes parties. La première vise à déterminer les caractéristiques moléculaires de l'interaction entre IMA et la protéine CSN5 décrite dans le **paragraphe II**, les conséquences de cette interaction et son rôle moléculaire dans l'intégration du signal auxinique. La seconde partie de ce travail tente de mettre en lumière les conséquences physiologiques de cette interaction par l'étude de plantes *Arabidopsis thaliana* surexprimant l'orthologue du gène *IMA*, le gène *MIF2*.

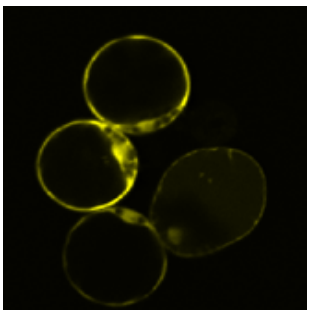
Enfin, nous aborderons l'implication des protéines ZHD en détaillant des données préliminaires montrant que la protéine MIF2 est capable d'interagir avec la protéine ZHD5 et qu'il peut y avoir une régulation transcriptionnelle entre les protéines ZHD et la protéine MIF2. L'ensemble de ces données permettent de proposer des perspectives et des axes de recherche à développer pour essayer de comprendre le rôle de la protéine IMA/MIF2 en interaction avec la machinerie protéolytique *via* la protéine CSN5 et/ou avec les facteurs de transcription ZHD dans le développement de la fleur et du fruit.

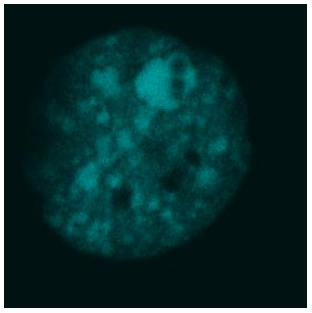






RESULTATS, DISCUSSION







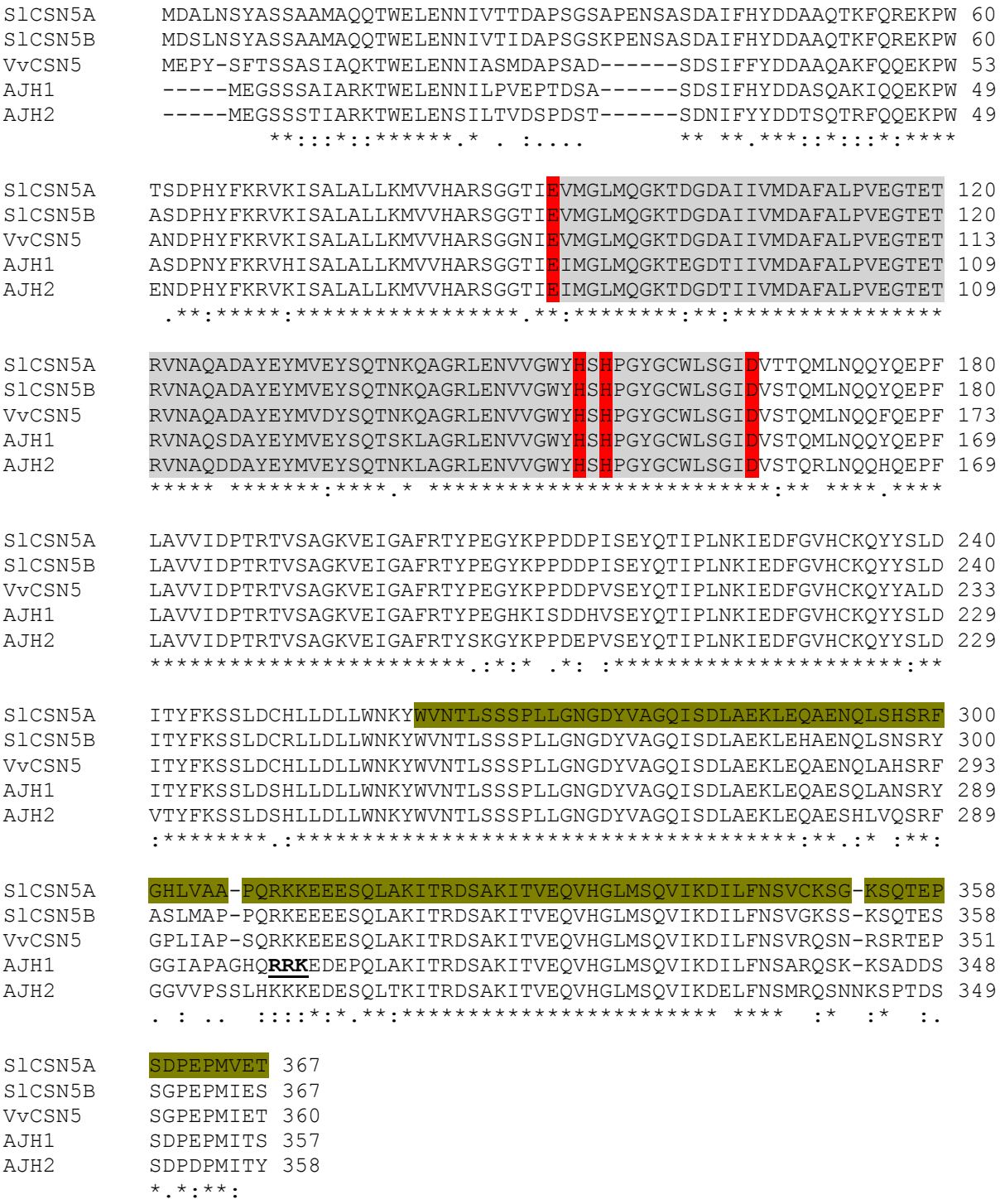


Figure 30: Alignement des séquences peptidiques des sous-unités 5 du signalosome de tomate (SlCSN5A et B), de vigne (VvCSN5) et d'Arabidopsis (AJH1 et 2).

Les séquences ont été alignées à l'aide du logiciel ClustalW2. Le motif peptidique conférant l'activité enzymatique est représenté en *gris* et les acides aminés essentiels à la fixation de l'atome de zinc sont surlignés en *rouge*. Le domaine surligné en *vert* dans la séquence SlCSN5A est la région manquante dans trois des clones identifiés lors du criblage de la seconde banque d'ADNc de jeunes fruits. Les trois acides aminés soulignés dans la séquence AJH1 constituent un site de localisation nucléaire (NLS) potentiel (NucPred, Stockholm Bioinformatics Center).

RESULTATS et DISCUSSION

I Caractérisation moléculaire de l'interaction entre les protéines IMA/MIF2 et CSN5.

1. Découverte de l'interaction entre les protéines IMA et SlCSN5A chez la tomate.

La caractéristique structurale des protéines MIF leur permet d'être classées parmi les protéines à «doigt à zinc» mais contrairement aux protéines ZHD, elles ne possèdent pas l'homéodomaine qui permet l'interaction à l'ADN. Ainsi, les protéines MIF grâce au motif «doigt à zinc» interagissent avec des protéines cibles. Pour identifier ces dernières, nous avons effectué une recherche sans *a priori* de partenaires protéiques en utilisant la technique de double hybride. Deux expériences indépendantes avec deux banques d'ADNc issues de jeunes fruits de tomate en division ont permis de cribler respectivement 2.10^5 et 10^6 clones. Le premier criblage a permis d'identifier deux clones qui interagissent avec IMA, et qui correspondent à la même séquence possédant 82% d'identité avec le gène *AJH1*/*CSN5A* (Arabidopsis JAB homolog 1/COP9-signalosome subunit 5A) et avec le gène *AJH2*/*CSN5B* d'Arabidopsis (Kwok, et al. 1998). Parmi les clones identifiés issus du second criblage, cinq clones correspondent à cette même séquence. Deux de ces cinq clones ont une longueur de 1104 nucléotides du codon ATG au codon STOP et cette séquence traduite est composée de 367 acides aminés homologues à 83% avec la séquence protéique AJH1 et 82% avec AJH2. Cette séquence sera nommée tout au long de ce chapitre SlCSN5A (*Solanum lycopersicum* CSN5A). Plus récemment, le séquençage du génome de la tomate a permis d'identifier une deuxième séquence correspondant à la protéine CSN5 (SlCSN5B) et qui possède aussi 83% d'homologie de séquence avec AJH1 et 81% avec AJH2 (77% et 79% respectivement avec les séquences nucléotidiques). La différence fonctionnelle des deux copies de la sous-unité 5 du signalosome chez Arabidopsis a pu être mise en évidence mais, chez la tomate, il semble difficile de distinguer quelle sous-unité s'apparente le plus à la protéine AJH1 ou à la protéine AJH2.

Il est important de noter que les deux protéines SlCSN5A et SlCSN5B possèdent le domaine enzymatique JAMM ou MPN+ (en gris, **figure 30**) avec une très forte conservation des acides aminés responsables de la fixation de l'atome de zinc (en rouge, **figure 30**). Parmi les cinq clones identifiés lors du second criblage, trois d'entre eux possèdent une séquence partielle de SlCSN5A à laquelle il manque 107 acides aminés à l'extrémité C-terminale (en vert, **figure 30**) soulignant le fait que ces acides aminés ne sont pas essentiels à l'interaction entre les protéines IMA et SlCSN5A.

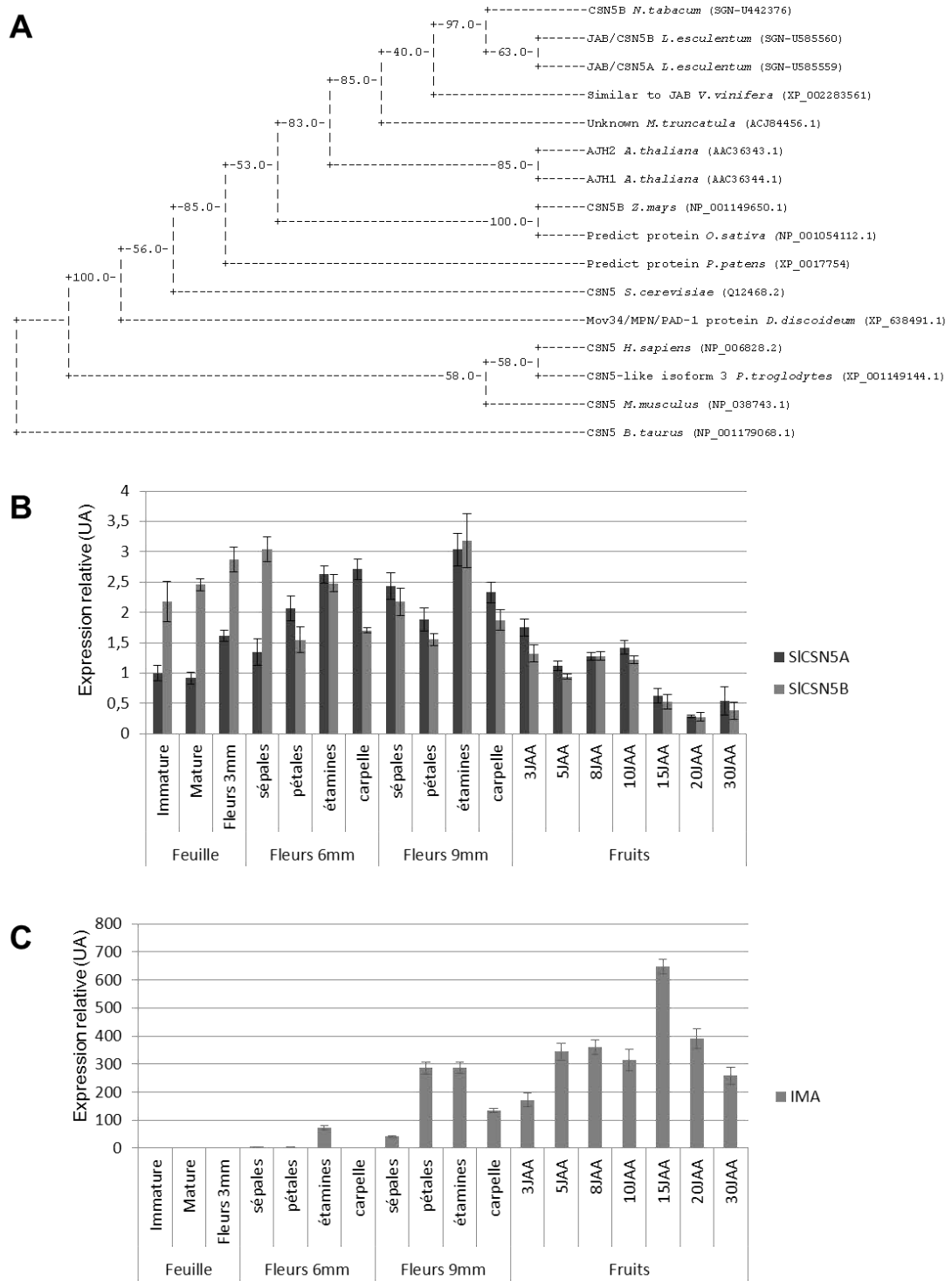


Figure 31: Arbre phylogénétique des séquences protéiques des sous-unités CSN5 chez les Eucaryotes (A) et expression tissulaire des gènes de tomate SlCSN5A, SlCSN5B (B) et IMA (C).

(A) *N.tabacum*: tabac; *L.esculentum*: tomate; *V.vinifera*: vigne; *M.truncatula*: luzerne; *Z.mays*: maïs; *O.sativa*: riz; *P.patens*: mousse; *S.cerevisiae*: levure; *D.discoideum*: amibe; *H.sapiens*: homme; *P.troglodytes*: chimpanzé; *M.musculus*: souris; *B.taurus*: bovin.

(B) *et* (C) Pour les fleurs, les longueurs de 3, 6 et 9 mm représentent la longueur de la fleur le long de l'axe longitudinal sans le pédicelle. Pour les fruits, l'abréviation JAA précédée d'un chiffre désigne le nombre de jours après anthèse (assimilée à la pollinisation) et permet de situer les différentes phases de développement du fruit: de 3 à 8 JAA, les fruits sont majoritairement dans des phases de division cellulaire alors qu'à partir de 10 JAA, les processus d'expansion cellulaire sont prépondérants.

Comme évoqué dans le chapitre de l'introduction, le signalosome est très conservé chez les Eucaryotes. En effet, les individus unicellulaires (levure, amibe) jusqu'aux individus tels que l'homme présentent des protéines apparentées à CSN5 ou caractérisées comme étant CSN5. Au sein du règne végétal, une grande variété d'espèces possède une à deux copies de la sous-unité CSN5, les mousses, les monocotylédones (riz, maïs) et les dicotylédones (*Arabidopsis thaliana*, luzerne) parmi lesquelles des plantes cultivées (**figure 31A**).

L'expression des deux gènes *SlCSN5A* et *SlCSN5B* a été étudiée dans différents tissus de la tomate ainsi que le gène *IMA* dont l'expression avait déjà été caractérisée (Sicard, et al. 2008b). Les données d'expression ont été obtenues par PCR en temps réel (**figure 31B**). L'expression du gène *SlCSN5A* dans la feuille immature a été utilisée comme référence (valeur d'expression relative fixée à 1). Ainsi, peu de différences apparaissent entre l'expression des gènes *SlCSN5A* et *SlCSN5B*. L'expression du gène *SlCSN5A* paraît être plus spécifique des tissus floraux avec une expression plus importante au niveau des pièces florales reproductives (étamines et carpelles). Le gène *SlCSN5B* semble être spécifiquement exprimé dans les parties végétatives et les jeunes fleurs et de façon importante dans les étamines des fleurs à 9 mm. Au cours du développement du fruit, l'expression des deux gènes *SlCSN5A* et *SlCSN5B* diminue mais reste plus importante au cours des stades de développement dans lesquels la division cellulaire est prépondérante (3 à 10 jours après anthèse (JAA)). Les profils d'expression tissulaire des gènes *SlCSN5A* et *SlCSN5B* ne permet pas de définir un territoire d'expression préférentiel qui pourrait leur conférer une fonction tissu-spécifique. Leur expression paraît relativement ubiquitaire, ce qui est concordant avec la fonction essentielle du signalosome dans la cellule.

Comme cela a déjà été décrit auparavant (Sicard, et al. 2008b), le gène *IMA* est exprimé dans les inflorescences, les fleurs et les fruits. La **figure 31C** montre que le gène *IMA* est fortement exprimé dans les étamines et les carpelles de la fleur à 9 mm. Au cours des précédents travaux réalisés sur la caractérisation fonctionnelle du gène *IMA*, il a été montré que la protéine AG est capable de se fixer directement sur le promoteur du gène *IMA* afin d'activer son expression (Sicard 2007). Ainsi, l'expression du gène *IMA* dans les étamines et les carpelles des fleurs à 9 mm, territoires d'expression du gène *AGAMOUS*, serait induite par la protéine AGAMOUS (**chapitre IV.4**). Par ailleurs, le niveau d'expression du gène *IMA* est très important dans le fruit et est régulier durant les stades de développement gouvernés majoritairement par des processus de division cellulaire jusqu'à atteindre un maximum à 15 JAA.

Les gènes *SlCSN5A* et *IMA* partagent des territoires d'expression commun et ce grâce au large spectre d'expression tissulaire du gène *SlCSN5A*.

Ces données corrèlent avec une interaction *in vivo* entre ces deux protéines. L'interaction entre les protéines IMA et SlCSN5A a été confirmée par deux techniques *in vitro* et *in cellulo* et les résultats sont présentés dans l'**article 1** ci-après.

2. Article 1: The Mini Zinc Finger protein MIF2 is involved in auxin signaling *via* the regulation of COP9-signalosome activity.

The Mini Zinc Finger protein MIF2 is involved in auxin signaling *via* the regulation of COP9-signalosome activity.

Major category: Biological Sciences Minor category: Plant Biology

Authors: **Julie Leblond-Castaing[a], Adrien Sicard[b], Jérome Verdier[a,1], Frederic Delmas[a], Frédéric Gévaudant[a], Michael Lenhard[b], Christian Chevalier[c] and Michel Hernould[a,2].**

Author affiliations:

[a]Université de Bordeaux, Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Unité Mixte de Recherche 1332 Biologie du Fruit et Pathologie, BP 81, F-33883 Villenave d'Ornon Cedex, France.

[b]Institut für Biochemie und Biologie, Universität Potsdam, Karl-Liebknecht-Strasse 24-25, Haus 26, 14476 Potsdam-Golm, Germany.

[c]Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Université de Bordeaux, Unité Mixte de Recherche 1332 Biologie du Fruit et Pathologie, BP 81, F-33883 Villenave d'Ornon Cedex, France.

Author contributions: JL-C, AS, JV, FD, FG, ML, MH and CC

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

Data deposition: The sequences reported in this paper have been deposited in the GenBank database [accession nos. NM_001247402.1 (*SlCSN5A*); NM_001247260.1 (*SlIMA*); AY098733 (*SlAGAMOUS*); At1g22920.1 (*AtCSN5A*); At3g28917 (*AtMIF2*); At1g04250 (*AtAXR3/IAA17*); At4g02570 (*AtCUL1*)].

[1] Present address: The Samuel Roberts Noble Foundation 2510 Sam Noble Parkway Ardmore, OK 73401

[2] To whom correspondence should be addressed: Michel Hernould,

UMR 1332 Biologie du Fruit et Pathologie, INRA Centre de Recherche de Bordeaux-Aquitaine, BP 81, F-33883 Villenave d'Ornon Cedex, France

Tel: (33)557122692 Fax: (33)557122541

E-mail: hernould@bordeaux.inra.fr.

Abstract

In eukaryotes, the COP9-signalosome (CSN) protein complex regulates several developmental processes by integrating exogenous and endogenous signals at the nuclear level. CSN modulates the cullin RING-type E3 ubiquitin ligases (CRLs) which tag protein targets for their degradation via the ubiquitin proteasome 26S pathway.The signaling pathways involving CSN has been extensively explored in plants. However, the proper regulation of the COP9-signalosome remains to be elucidated. We here demonstrated that the Mini Zinc Finger protein IMA/MIF2, which is involved in the regulation of multihormonal pathways during plant development, is able to interact with the subunit 5 (CSN5) of the CSN complex. CSN5 harbours the unique endoprotease activity of the CSN complex necessary for the regulation of the CRL activity. The characterization of the CSN5/MIF2 interaction demonstrates an adapter/cargo role for the MIF proteins which inhibit CSN activity through the nuclear externalization of the CSN5. Interestingly, we show that this extranuclear localization of the CSN5/MIF2 complex is reversible in the presence of both auxin and AXR3/IAA17, a transcriptional inhibitor of the auxin response genes. AXR3/IAA17 is a target of the ubiquitin-dependent 26S proteasome degradation. Together, these results suggest that MIF2 proteins regulate multihormonal pathways by modulating signalosome activity.

Introduction

A multifunctional protein complex, called the COP9 signalosome (CSN), plays a key conserved role in the integration of endogenous and exogenous signals to regulate growth in Eukaryotes (Schwechheimer 2004). The 450 kDa CSN complex is composed of 8 subunits that are paralogous to each of the components of the 26S proteasome lid. Based on the homology between CSN and the 26S proteasome, it has been proposed that CSN is involved in the regulation of ubiquitin-dependent proteolytic processes (Wei and Deng 1999). CSN interacts with SCF (Skp1–cullin1–F-box protein) -type E3 ubiquitin ligases that recognize protein substrates for subsequent degradation and recruit E2 ubiquitin-conjugating enzymes (Schwechheimer, et al. 2002). CSN mediates the deconjugation of an ubiquitin-like peptide called NEDD8/RUB1 covalently linked to the CULLIN subunit of the SCF complex. The CSN subunit 5 (CSN5) is responsible for the CULLIN NEDD8/RUB1 deconjugation, called deneddylation (Cope, et al. 2002). As a result CULLIN deneddylation promotes the release of ubiquitinylated substrates from SCF and allows their degradation by the 26S proteasome (Serino and Deng 2003).

First identified as a repressor of photomorphogenic seedling development (Chamovitz, et al. 1996), CSN has been shown to be involved in root and floral development, in response to pathogens, and importantly in the response to hormones such as GA

(McGinnis, et al. 2003), jasmonic acid and auxin (for a review see (Dreher and Callis 2007)). The auxin signaling pathway has now been well characterized (Calderon-Villalobos, et al. 2010). In the presence of auxin, the auxin receptor F-box protein TIR1 participates in the recruitment of Aux/IAA transcriptional repressors to the SCF^{TIR1} complex. The interaction between TIR1 and Aux/IAA proteins, as well as the interaction of TIR1 with the SCF complex, leads to the ubiquitinylation of Aux/IAA repressors and their subsequent degradation to mediate the auxin response. CSN plays an essential role in this process by the deneddylation of the SCF^{TIR1}-associated Cul1 subunit. This step is necessary for disassembly of the SCF complex and the release of the ubiquitinylated Aux/IAA. There is ample evidence that CSN is a pleiotropic regulator of protein neddylation, ubiquitination and degradation, but data concerning CSN regulation remain scarce whatever the considered biological model.

Recently a new family of proteins harboring a zinc finger of the $CX_3HX_{11}CX_{12-26}CX_2CXCHX_3H$ type (Windhovel, et al. 2001) has been characterized in Arabidopsis and tomato (Hong, et al. 2011; Hu and Ma 2006; Sicard, et al. 2008a). These proteins have been named MIni Zinc Finger (MIF) proteins as they display a very short size (< 100 amino acids). MIF1 as a representative member of this protein family in Arabidopsis was shown to be involved in multiple hormonal pathways during plant development (Hu and Ma 2006). In tomato, the *INHIBITOR OF MERISTEM ACTIVITY* (*IMA*) gene encodes a MIF protein that is orthologous to Arabidopsis MIF2 (Sicard, et al. 2008b). IMA represses the expression of *SlWUSCHEL* (*SlWUS*), and consequently, key regulators of the floral genetic program. We have shown that IMA participates to ovule promotion from placenta tissue and that IMA loss-of-function plants exhibit meristematic tissue in place of nucellus. Thus, IMA prevents the meristematic genetic programs to overlay the nucellus genetic program. In addition IMA inhibits cell proliferation during floral termination by regulating a multiple hormonal signaling pathways (Sicard, et al. 2008b). Recently, Hong *et al.* (Hong, et al. 2011) demonstrated that MIF proteins interact with transcription factors of the Zinc Finger-HomeoDomain (ZHD) family (Windhovel, et al. 2001), implicating MIF proteins in gene regulatory pathways of yet unknown functions.

In this report, we have further characterized the function of MIF2. We identified the CSN5 subunit as a strong interactor of MIF2, and showed that this interaction results in the exclusion of CSN5 from the nucleus, thus regulating negatively the CSN activity. The extra-nuclear CSN5 sequestration by MIF2 could be abolished in the presence of auxin and AXR3/IAA17, thus establishing a link between auxin signaling and the adapter function of the MIF2 protein.

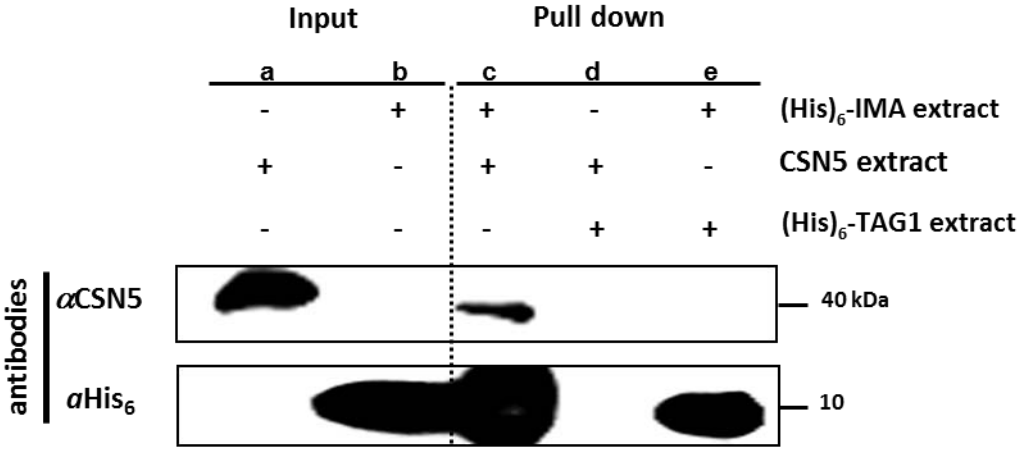


Fig.1. IMA/MIF$_2$ protein interacts *in vitro* with the subunit 5 of the COP9-signalosome complex.

Antibodies directed against CSN5 (*α*CSN5) and His$_6$ tag (αHis$_6$) detect proteins of approximately 40 kDa (*lane a*) and 10 kDa (*lane b*), respectively. Pull-down assay using His-tag purification of the IMA protein in presence of the CSN5 protein extract leads to the detection of both protein (*lane c*) whereas CSN5 protein is unable to interact with His-tagged TAG1 protein used as negative control (*lane d*). Also, His-tagged IMA protein does not interact with His-tagged TAG1 (*lane e*).

Results

IMA/MIF2 Interacts with the CSN5 Subunit. Zinc finger proteins that belong to the MIF family exhibit a zinc finger motif but no DNA binding homeodomain suggesting that their function is linked to protein-protein interaction (**Fig. S1A**). This hypothesis was confirmed by Hong et al. who demonstrated by targeted yeast two-hybrid experiments the interaction of *A. thaliana* MIF proteins with ZHD transcription factors (Hong, et al. 2011). To identify putative targets of IMA/MIF2, we used a yeast two-hybrid screen (**Fig S1B**). The tomato IMA/MIF2 protein was used as bait in fusion with the Gal4 DNA-binding domain to screen among 10^6 clones from a tomato young-fruit cDNA library constructed with the Gal4 activation-domain vector. Among the forty six IMA interacting clones that were sequenced, five encoded the SlCSN5 subunit fused in frame with the activation domain. In three clones, the sequence corresponding to the 100 last C-terminal amino-acids of the SlCSN5 protein was missing suggesting that the interaction of IMA with CSN5 requires the N-terminal part of the SlCSN5 subunit which contains the catalytic domain. Next we ascertained the interaction between IMA and CSN5 proteins by performing *in vitro* pull-down assays (**Fig. 1**). We confirmed the interaction for Arabidopsis orthologous counterparts of IMA and SlCSN5, respectively MIF2 and AJH1, by using a targeted two-hybrid experiment and Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) assays (**Fig. 3D**).

The Arabidopsis MIF2 protein inhibits CSN function in planta. We introduced the *MIF2* gene under the control of the constitutive *35S* promoter into *Arabidopsis thaliana*. Among the different transgenic *A. thaliana* plants that showed various level of *MIF2* overexpression (**Fig. S2**), we selected those that exhibited the strongest phenotypes (**Fig. 2A**). The 35S::*MIF2* overexpressors showed dwarfism, loss of apical dominance and a global reduction of organ size (**Fig. 2A and 2B**). These phenotypes were also observed in transgenic tomato plants that over-expressed the *IMA* gene (Sicard, et al. 2008b). These features are typical of the *csn5a1* knock-out and *csn5a2* knock-down mutants in *Arabidopsis thaliana* (Gusmaroli, et al. 2007). Therefore, we wanted to test whether the dominant phenotype of the transgenic *MIF2* overexpressor plants could be attributed to an impairment of CSN function. The neddylation status of CULLIN1 (CUL1) in Arabidopsis wild-type plants, in the *csn5a1* homozygous mutant and in *MIF2* overexpressor plants was analyzed by immunoblotting of total protein extracts (**Fig. 2C**). As already described by Dohmann *et al*. and Gusmaroli *et al.,* the *csn5a1* homozygous mutant accumulated the neddylated form of CUL1 when compared to wild-type plants (Dohmann, et al. 2005; Gusmaroli, et al. 2007).

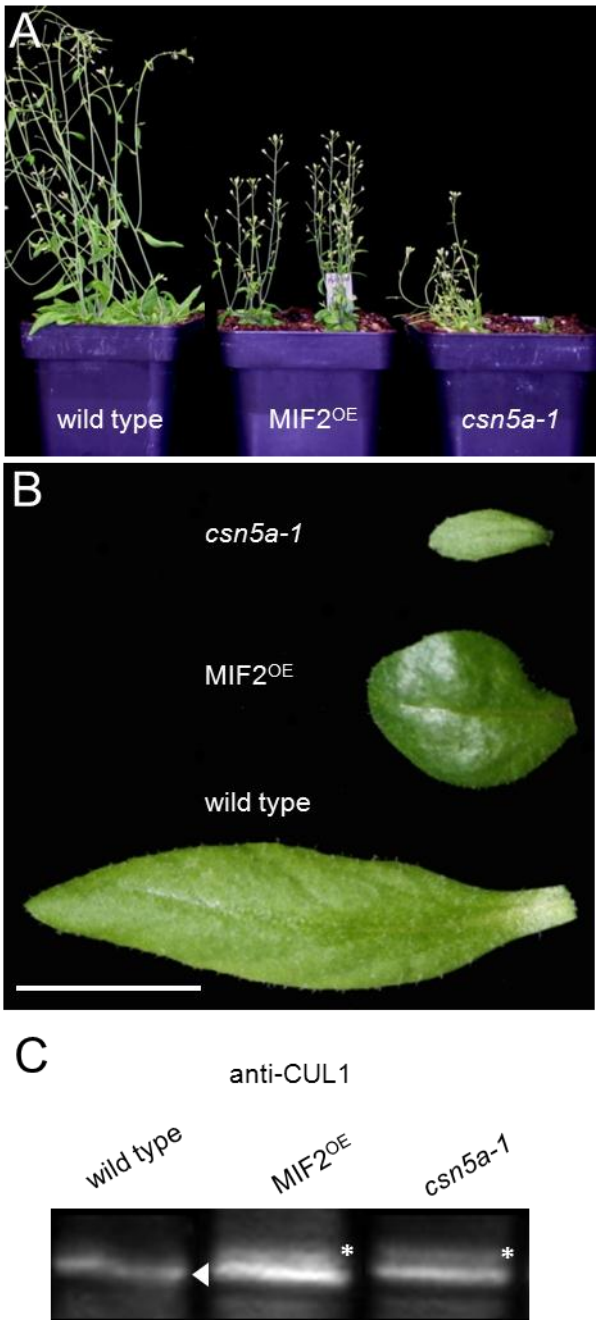


Fig.2. MIF2 protein inhibits partially CSN5 function *in planta*.

(*A*) Phenotype of 4-week-old plants of wild-type, *MIF2* overexpressor and *csn5a-1* mutant as indicated.

(*B*) Phenotype of rosette leaves of wild-type, *MIF2* overexpressor and *csn5a-1* mutant.

(*C*) Immunoblot of protein extracts derived from 7-days-old seedlings as indicated probed with anti-CUL1. Arrowhead in wild type extract mark the position of deneddylated cullins (81 kDa) and asterisks mark the apparition of neddylaled cullins (90 kDa) in MIF2^{OE} as in *csn5a-1* mutants.

[Scale bars, 1 cm (*B*)].

A similar behavior was observed for protein extracts from 35S::*MIF2* overexpressing plants, indicating that the phenotype of *MIF2* gain-of-function plants is related to the inhibition of the deneddylation function of CSN, most likely through the physical interaction of MIF2 with CSN5.

The Arabidopsis MIF2 functions as a CSN5 adapter protein. Next we hypothesized that the impairment of CSN function via the interaction of MIF2 with CSN5 could result from a decreased stability of the CSN5 protein. We thus detected the amount of CSN5 subunit in total protein extracts from WT, *csn5a1* and *csn5a2* homozygous mutants and 35S::MIF2 gain-of-function plants using immunoblotting experiments (**Fig. 3A**). The amount of CSN5 in WT and 35S::MIF2 protein extracts was similar whereas that in the *csn5a1* and *csn5a2* protein extracts was highly decreased. This suggests that the inhibition of CSN activity was not due to degradation of CSN5 mediated by MIF2. Thus, we investigated whether a modification in the availability of CSN5 could be triggered by IMA/MIF2. This was monitored by analyzing the sub-cellular localizations of CSN5A and MIF2 proteins alone or in combination, using BiFC experiments in onion epidermal cells. CSN5A and MIF2 fused to YFP were both localized within the nucleus (**Fig. 3B, 3C and S3**), and CSN5-YFP was also present in the cytoplasm (**Fig. 3C and S3**). Interestingly, the BiFC signal associated to the CSN5A/MIF2 interaction was mainly detected in the cytoplasm (**Fig. 3D**), suggesting that the CSN5A/MIF2 protein-protein complex was excluded from the nucleus. These results were confirmed whatever the source of proteins (tomato or Arabidopsis CSN5 and IMA or MIF2) using onion epidermal cells, as well as in tomato mesophyll protoplasts (at least for tomato SlCSN5A and IMA) (**Fig. S3**).

AXR3/IAA17 induces CSN5A/MIF2 nuclear relocalization under auxin stimuli. As previously described, the Arabidopsis MIF1 and MIF2 and the tomato IMA proteins are involved in several hormone response pathways (Hu and Ma 2006; Sicard, et al. 2008b). Several transcriptional repressors of hormonal responses are degraded via the ubiquitin/26S proteasome-mediated proteolysis path after hormone induction. To determine whether IMA/MIF2 was involved in the regulation of the hormonal response through the interaction with CSN5A, we investigated the fate of the MIF2 protein after an auxin treatment. As shown in **Fig. 4A**, after auxin treatment the fluorescent signal corresponding to MIF2-YFP fusion protein was often associated to nuclear protein bodies (NPBs) whereas the nuclear distribution of MIF2 appears largely uniform in the absence of auxin (**Fig. 3B**). The signal associated to AXR3/IAA17-CFP, a member of the Aux/IAA family, was detected in nuclear spots that are smaller than NBPs, whatever the auxin regime (**Fig. 4B**).

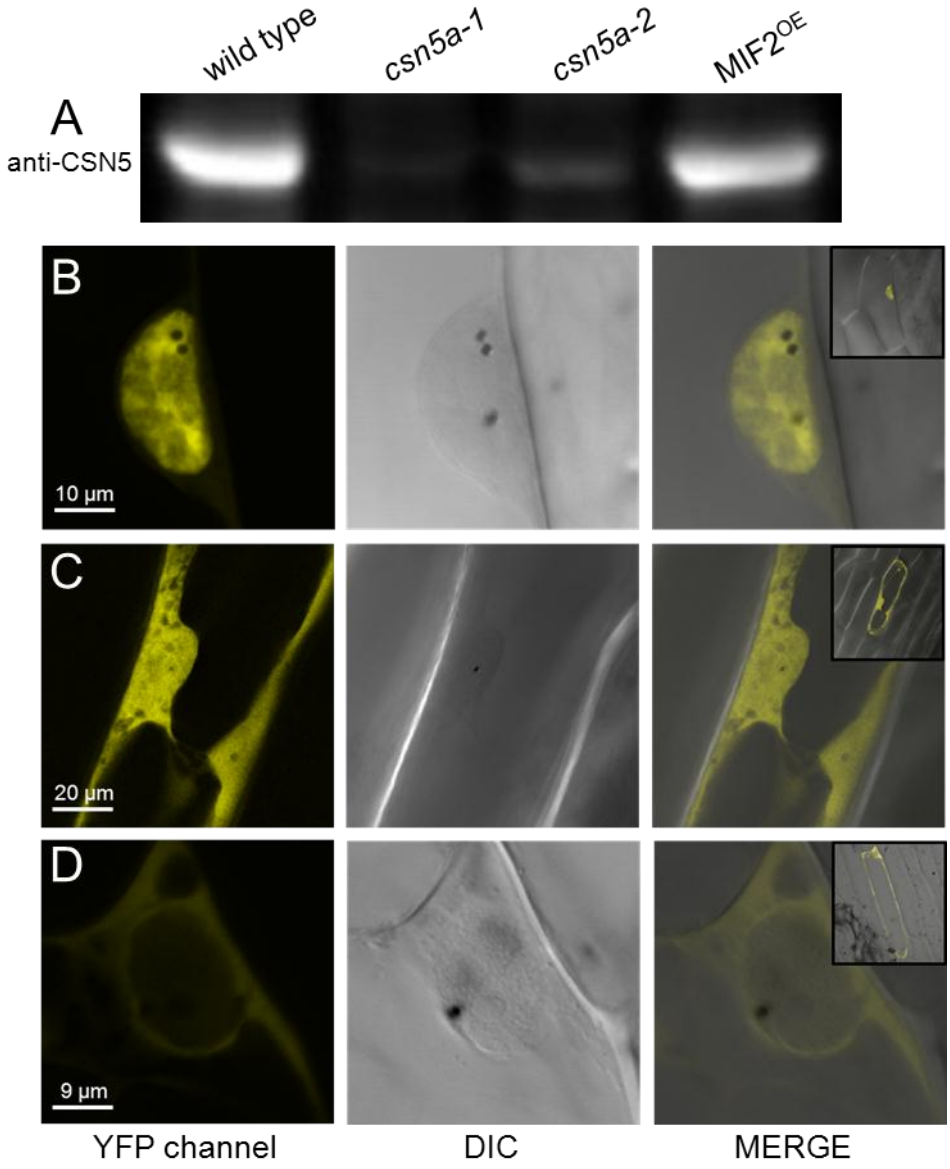


Fig.3. IMA/MIF2 proteins modulate CSN5A localization.

(*A*) Immunoblot of protein extracts derived from 7-days-old seedlings as indicated probed with anti-CSN5. The CSN5 protein cannot be detected in *csn5a-1* mutant because these are knock-out mutants but it can be faintly visible in knock-down *csn5a-2* mutants. On the other hand, no differences appear between wild type and $MIF2^{OE}$ profiles.

(*B*) IMA/MIF2-YFP localization in onion epidermal cell.

(*C*) CSN5A-YFP localization in onion epidermal cell.

(*D*) IMA/MIF2 and CSN5A interact in BiFC assays in onion epidermal cell and this interaction leads to the complex relocalizing to the cytoplasm.

The presence of MIF2 in NPBs was not linked to its degradation since its stability was unaffected (**Fig S4**) whereas AXR3/IAA17 is degraded as already described (Tao, et al. 2005). In the presence of auxin, AXR3/IAA17-CFP colocalized with the CSN5A subunit (**Fig.4C**) and with the SCF complex CUL1 subunit (**Fig.4D**) in the NPBs. AXR3/IAA17-CFP always colocalized with MIF2-YFP in NPBs after an auxin stimulus (**Fig. 4E**). Interestingly, the MIF2/CSN5A complex was localized in NPBs with AXR3/IAA17-CFP under auxin stimulus (**Fig 4F**) whereas this complex showed a predominant cytoplasmic localization in the absence of auxin (**Fig. 3D**). A truncated version of CSN5A, CSN5AΔ76-YFP where the catalytic JAMM domain (E^{80} to D^{155}) was removed but not the nuclear localization signal (NLS) showed a strict cytoplasmic localization (**Fig S5**). BiFC signal was undetectable when we tested *in cellulo* the interaction between MIF2 and CSN5AΔ76.

DISCUSSION

MIF proteins have been first discovered in Arabidopsis, and their role in many physiological processes have been uncovered by the characterization of *MIF* overexpressor plants (Hu, et al. 2011; Hu and Ma 2006). In Arabidopsis, this family comprises three distinct genes (*MIF1* to *MIF3*) whose expression patterns overlap partially. So far, in tomato only two *MIF* genes have been identified, a close homolog to *MIF1* and *IMA* (initially called *LeMIF1* and *LeMIF2* respectively by Hu and Ma, 2006) which display specific and different patterns of expression, *LeMIF1* being strongly expressed in stems and *IMA/MIF2* in reproductive organs (Sicard, et al. 2008b). However, the molecular mechanism of MIF action in plants has not been yet elucidated.

MIF2 protein and signalosome complex regulates auxin response.

IMA/MIF2 is strongly expressed in tomato fruit in a specific spatial and temporal pattern during flower and fruit development (Sicard, et al. 2008b). Knock-down of *IMA* induced loss of floral meristem termination leading to an increased number of carpel. *IMA/MIF2* overexpressing plants produced smaller flowers and fruits (Hu, et al. 2011; Sicard, et al. 2008b). This ectopic overexpression also induced pleiotropic effects such as reduced plant growth and loss of apical dominance (**Fig. 2A**) indicating that IMA/MIF2 could be active and functional in other territories than those where it is normally expressed. These phenotypes are strikingly similar to what was described for Arabidopsis *MIF1* and *MIF3* overexpressors (Hu, et al. 2011; Hu and Ma 2006). Whatever the identity of the *MIF* gene overexpressed, *MIF* gain-of-function plants display phenotypes indicative of an impairment in multihormonal signalling pathways including the auxin response (Hu, et al. 2011).

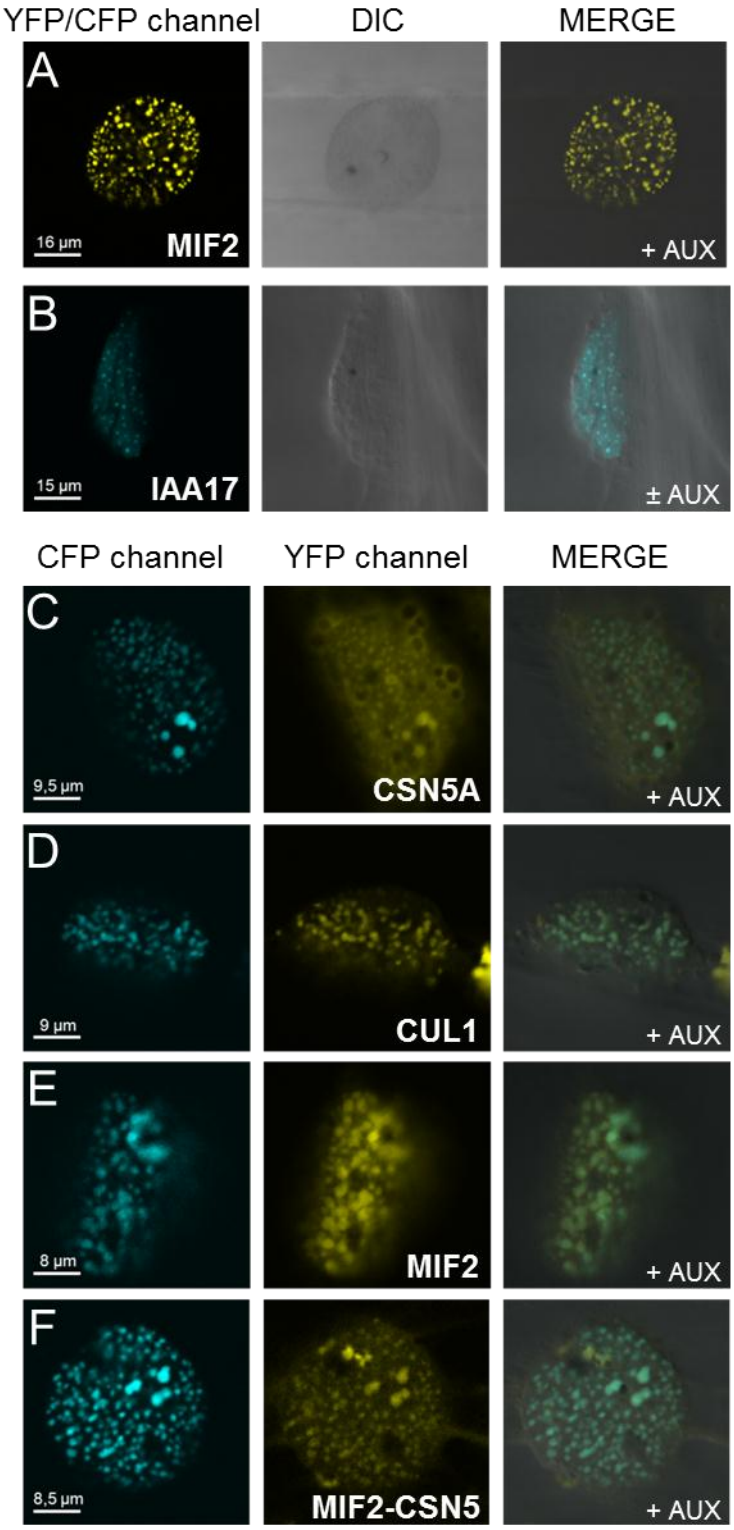


Fig.4. MIF2 proteins function as CSN5 adapter protein.

(*A*) IMA/MIF2-YFP localization in onion epidermal cell after auxin treatment. (*B*) IAA17-CFP localization in onion epidermal cell.

(*C to E*) Colocalization between IAA17-CFP and AJH1-YFP (*C*), CUL1-YFP (*D*) and MIF2-YFP (*E*). Nucleus spot correspond to active proteolytic sites or nuclear protein bodies (NPBs). (*F*) Colocalization between IAA17-CFP and MIF2/AJH1 complex (BiFC). While fluorescent signal of MIF2/AJH1 complex shows a cytoplasmic signal, in colocalization with IAA17-CFP, the MIF2/AJH1 complex colocalizes in NPBs.

The COP9-signalosome is a complex that integrates endogenous or environmental signals to activate appropriate signaling pathways. The contribution of the COP9-signalosome in the regulation of hormonal signaling pathways has been extensively recorded notably its positive role in auxin and GA signaling through degradation of transcriptional repressors (for a review see (Dreher and Callis 2007)) as well as its putative negative regulatory function in ABA signaling (Lopez-Molina, et al. 2003). Thus, *csn* mutants in Arabidopsis, including *csn5* mutants, display pleiotropic developmental defects such as a bushy phenotype originating from the loss of apical dominance and an alteration in sensitivity to auxin signals (Dohmann, et al. 2005).

In this study, we demonstrated a strong protein-protein interaction between IMA/MIF2 protein and signalosome subunit 5 (CSN5) using yeast two-hybrid screening experiments (**Fig. S1**) and confirmatory *in vitro* pull-down assays (**Fig. 1**) suggesting that MIF2 protein and signalosome complex could act in the same pathway to regulate auxin response.

MIF2 regulates CSN activity to modulate auxin response.

MIF2 protein interacts with CSN5 to inhibit its deneddylation activity (**Fig. 2C**). To identify how the interaction of MIF2 and CSN5 inhibits the activity of the signalosome, we followed the CSN5 protein stability in MIF2 overexpressor plants. MIF2 overexpression does not affect the overall CSN5 presence (**Fig. 3A**). However, MIF2 protein acts on the CSN5 subcellular localization leading to the retention of CSN5 within cytoplasm (**Fig. 3D**). The signalosome is a nuclear complex that regulates SCF ubiquitine-ligase function to allow the ubiquitination of the target proteins, including transcriptional repressors (for review see (Hotton and Callis 2008)). For example during the response to auxin signaling, the Aux/IAAs nucleoplasmic transcriptional repressors, are localized into proteolytically active nuclear protein bodies (NPBs), into which components of the SCF^{TIR1}, COP9 signalosome, and 26S proteasome are also recruited (Tao, et al. 2005) leading to their degradation. Interestingly, MIF2 protein in interaction with CSN5 does not impair the localization of CSN5 in these NPBs in the presence of a member of Aux/IAA family and auxin signal (**Fig. 4F**). This suggests an additional level of MIF2 regulation on CSN5 activity. In addition, we demonstrate that the catalytic domain is necessary for the nuclear localization of CSN5 (**Fig. S5B**) and its interaction with MIF2. These date lead us to hypothesize that IMA/MIF2 inhibits the signalosome activity via the interaction within the catalytic domain of the CSN5 subunit.

Our data suggest that IMA/MIF2 ensures a specific and appropriate response to auxin stimuli through its interaction to CSN5 subunit as an adaptor protein. Previous analyses of gene expression in the course of tomato fruit development (Sicard, et al. 2008b) indicated that the expression of the *IMA* gene starts concomitantly to the end of the first wave of auxin

accumulation within the fruit tissue at the transition between the division (phase II) and the expansion phase (phase III) (Gillaspy, et al. 1993). Interestingly, analyses of *IMA* and *MIF2* promoter sequences by SIGNALSCAN of the PLACE database identified one and two putative Auxin Response Elements (AuxRE), respectively (**Fig. S6A**). Indeed, when leaves of transgenic tomato plants carrying the complete *IMA* promoter fused to the GUS reporter sequence were treated with IAA treatment and assayed for *GUS* expression, the *IMA* promoter was induced by IAA in a dose-dependent manner (**Fig. S6B**). Hence, MIF2 is involved in auxin response through its action on signalosome activity but auxin is able to activate *MIF2* gene expression. Moreover, MIF2 modulates the CSN5 localization according to auxin stimulus. Thus, the MIF2 protein, signalosome complex and auxin signaling are intrinsically linked but the timing of these events remains unknown.

IMA/MIF2 controls multihormonal pathways to regulate plant growth.

Growth regulators exert a tight control on the meristem structure, the meristem dormancy or activity, and the resulting formation of organ primordia. Plant hormones notably auxin, cytokinin and gibberellins ensure the maintenance of cell division activity (Yanai, et al. 2005), while ABA plays a key role in meristem dormancy (Shimizu-Sato and Mori 2001). Most of these hormonal effects on meristem activity find their origin in the transcriptional control of key cell cycle regulators (Stals and Inze 2001; Wang, et al. 1998).

The observed phenotypes in *IMA/MIF2* overexpressing tomato lines and Arabidopsis *MIF1*, *MIF2* and *MIF3* overexpressors are quite similar and correspond to phenotypes of known hormone-deficient and insensitive mutants. The functional analysis of *IMA/MIF2 in planta* showed that these MIF proteins act as repressors of the meristem organizing gene *SlWUSCHEL* and control the number of carpels during floral development. Molecular analyses of C-, D- and E-type MADS box gene expression in *IMA* overexpressing lines revealed that it participates in the floral meristem termination by activating D-type gene expression (Sicard, et al. 2008b). In addition, we provided evidences that *IMA/MIF2* inhibits cell proliferation during floral termination.

The observed effects of *IMA/MIF2* overexpression on cell division that lead to a general decreased number of cells further support the notion of a CSN inhibitory control, since the COP9-signalosome through the specific deneddylation activity of the CSN5 subunit (**Fig.2C**) regulates the progression within the cell cycle in eukaryotes including plants (Doronkin, et al. 2003; Yamamoto, et al. 2003; Yang, et al. 2002). From the literature it is suggested that IMA/MIF2 could constitute an on/off switch for growth by regulating multiple hormonal responses and cell cycle in plant (Hong, et al. 2011; Hu and Ma 2006; Sicard, et al. 2008a).

In conclusion, our data provided important insight into MIF2 function in plants during floral development. Together with the previous data, we propose a functional model for IMA/MIF2 function in the integration of hormonal and growth signals to control floral meristem termination. In early stage of floral meristem development, *IMA* is not expressed and thus absent; CSN is functional, turns on the ability of the cell to respond to signals promoting cell division and meristem activity, and thus restricts responses to signals inhibiting cell division and plant growth. Following sepal and carpel initiation, the *IMA* expression is activated by an auxin signal. It would then interact with CSN through subunit 5 (CSN5) and inhibit its function by modulating the CSN5 subunit localization and turn off the cell's ability to respond to signals that induce growth and meristem. Cells would then be able to respond to growth inhibitory signals which could activate D-type genes in order to participate in the repression of *SlWUS* gene. Interestingly, the results obtained by Hong et al. concerning the interaction of MIF proteins with ZHD proteins provided new insights concerning the balance of regulations that MIF proteins exert during plant development (Hong, et al. 2011). In the same manner as the CSN5 protein is maintained out of the nucleus by MIF2 protein, MIF1 is able to modulate the ZHD transcription factor localization resulting in the sequestration of ZHD5 out of the nucleus. We can hypothesize that a competition can exist between the formation of MIF2/CSN5 complexes and MIF2/ZHD complexes, that is underlined the complexity of MIF2 action in plant development processes. Interactions of the MIF1 and MIF3 proteins with the CSN5 protein should be tested to conclude on a more generalized function of MIF proteins as regulators of the signalosome activity.

Materials and Methods

Plant Material and Growth Conditions. The wild-type *Arabidopsis thaliana* plants used in this study is the Columbia-0 ecotype. The CSN5 T-DNA insertion lines SALK_063436 (*csn5a-1*) and SALK_027705 (*csn5a-2*) were obtained from the Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC, Nottingham University) and were already described (Dohmann, et al. 2005; Gusmaroli, et al. 2007). Homozygous plants were obtained by PCR screening by using the primers: CSN5AFW1, (5-ATGGAAGGTTCCTCGTCAG–3); and CSN5AREV1, (5-TCACGATGTAATCATGGGCT-3) for the amplification of full *CSN5A* gene and CSN5AFW1 and LBb1 (5- CAGCGTGGACCGCTTGCTGCAACTCTCTCA -3) for the amplification of T-DNA. Transgenic Arabidopsis plants overexpressing *MIF2* under the constitutive CaMV 35S promoter were obtained after floral dipping transformation as described (Clough and Bent 1998). Arabidopsis seedlings were surface-sterilized, cold-treated at 4°C for 4 days, and then germinated on solid Murashige and Skoog (MS) culture medium (Murashige and Skoog 1962) supplemented with 1% sucrose and kanamycin for the MIF2 overexpressors. Promoter::GUS tomato plants were obtained after transformation (Cortina and Culianez-

Macia 2004) with pCAMBIA 1381 plasmid derivatives carrying either the IMA or the CaMV35S promoters fused to the GUS reporter gene. Auxin treatments were done by cultivating leaves on solid MS medium containing Indole Acetic Acid (IAA) in indicated concentrations.

Two-hybrid assay. Yeast strains (MAV203) were transformed using the Proquest™ two-hybrid system for GATEWAY® technology according to the manufacturer's instruction (Invitrogen). After transformation, interactions were revealed by evaluation of growth of the co-transformed yeast on SD-LTH medium supplemented with a variable amount of 3-amino1,2,4-triazol (3-AT) (20–80 mM).

Protein production and extraction, Immunoblot analyses and Pulldown assay. His_6 fusion proteins were produced with pET His-tag systems (Novagen) and purified with "His-bind resin" (Novagen) according to the manufacturer's specifications. Pulldown assay were performed using 300 µg of His_6-IMA or His_6-SlAGAMOUS protein mixed with 300 µg of SlCSN5A protein and incubated overnight at 4°C. Twenty microliters of His-bind resin are added and proteins are purified according to the manufacturer's indications.

Seven-days-old seedlings were grounded in extraction buffer and extracted proteins are used for western blots as described in (Dohmann, et al. 2008b). The following antibodies were used: anti-CSN5 (Enzo® Life Sciences), anti-His_6 (Quiagen®) and anti-CUL1, produced from rabbit immunization program (Eurogentec) with two antigenic peptides (MERKTIDLEQGWDYM and KRILEGLNEPAFDSE).

Protein subcellular localization, colocalization and BiFC assays. Gateway® vectors are used for the fusion with YFP and CFP protein in N- or in C-terminal part of interest proteins. For BiFC experiment, plasmids were kindly provided by Tsuyoshi Nagakawa (Shimane University, Japan). Transient expression assays were performed using homologous system, namely leaf protoplasts from tomato, and onion epidermal cells as a heterologous system.

Protoplasts were prepared from 7-d-old leaves from tomato plants and transformed using polyethylene glycol (PEG) according to Di Sansebastiano et al. (Di Sansebastiano, et al. 1998). To perform biolistic transformations, onion epidermis were placed on Murashige and Skoog (MS) basal medium in Petri dishes. For subsequent bombardment, 25µL of 1.6 µm gold particles (250 mg/mL) were used. Five µL plasmid DNA (1 µg/µL), 25 µl of 2,5 M CaCl2, 10 µl of 0,1 M spermidine were added to gold particles. Pelleted gold particles were washed with consecutively 70% and 100% ethanol and resuspended in 30 µl of 100% ethanol before loaded on macrocarriers (8 µl of gold particle suspension per macrocarrier) for transformation with the particle delivery system using a rupture disc of 1100 psi (7.58 MPa)

(PDS-1000He; BioRad). The distance between macrocarrier and the tissue was 6 cm. After gene delivery, epidermal onion tissues were incubated overnight on MS basal medium at room temperature in the dark, before analysis. Each transformation assay was performed in triplicate and each experiment was replicated at least twice.

Microscopy techniques and imaging. Images for protein subcellular localization were obtained by using the TCS SP2 AOBS confocal scanning microscope from Leica (Gennevilliers, France). CFP was excited using an argon laser at 458 nm and emissions were collected from 465 to 500 nm; YFP was excited by an argon laser at 514 nm and the emission collected from 525 to 600 nm. All images were processed using Leica Confocal Software and ImageJ software.

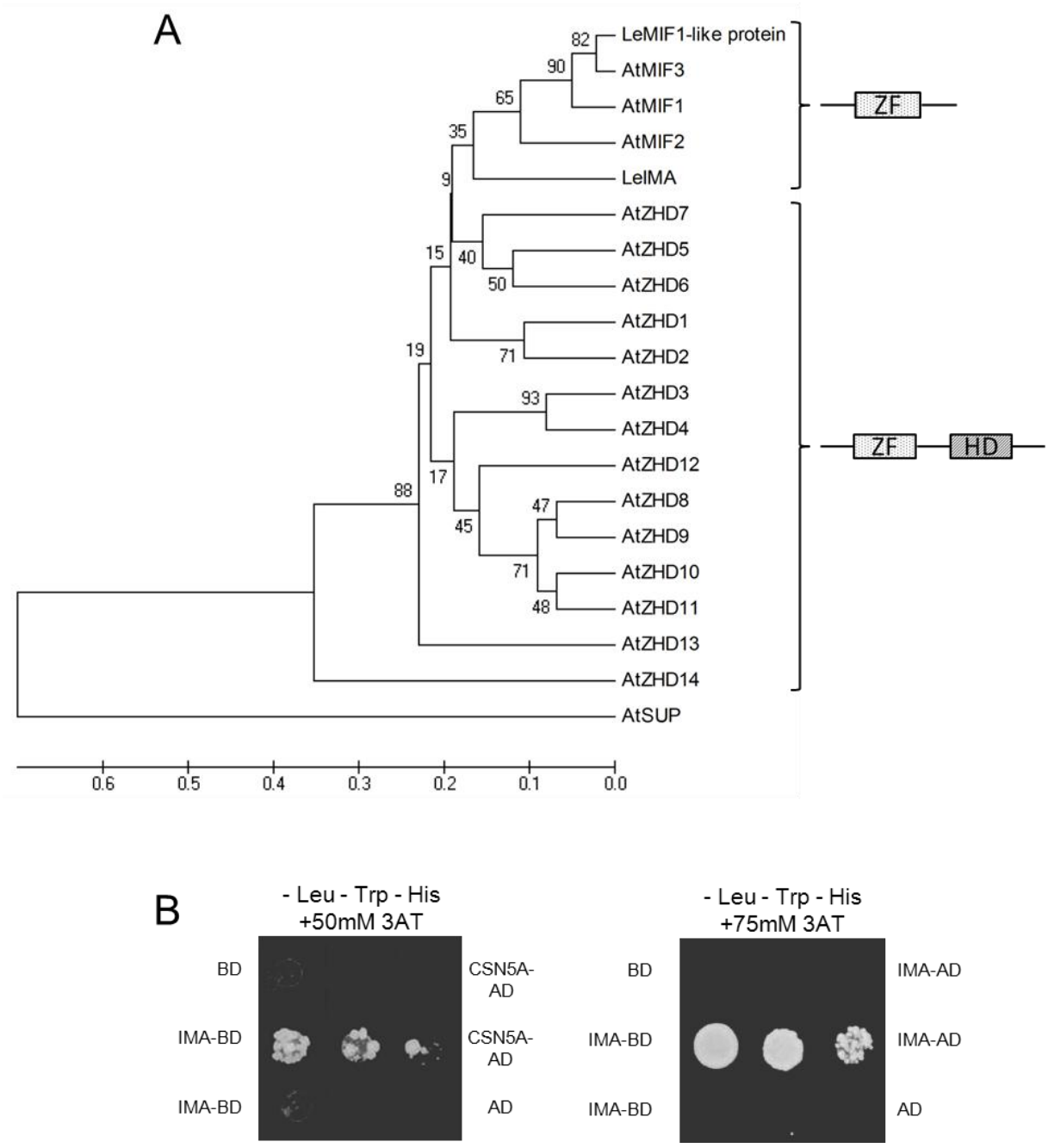


Fig.S1. IMA protein interacts with CSN5, a very well conserve protein in Eukaryots.

(*A*) Phylogenetic relationship of 19 Arabidopsis (At) MIF and ZHD proteins and Tomato (Le) MIF proteins and primary protein structures: ZF: zinc finger, HD: homeodomain. UGPMA tree (Sneath and Sokal, 1973) was built for Arabidopsis and Tomato deduced protein sequences aligned with ClustalW. Bootstrap values from 5000 replications were used to assess the robustness of the tree. Genetic distances are shown at the given scale. Phylogenetic analyses were conducted in MEGA4 (Tamura et al., 2007). AtSUP protein is included as outgroup.

(*B*) Yeast two-hybrid assays: the Tomato protein IMA and CSN5A are complementing histidine deficiency (left panel) and IMA also interact with itself (right panel).

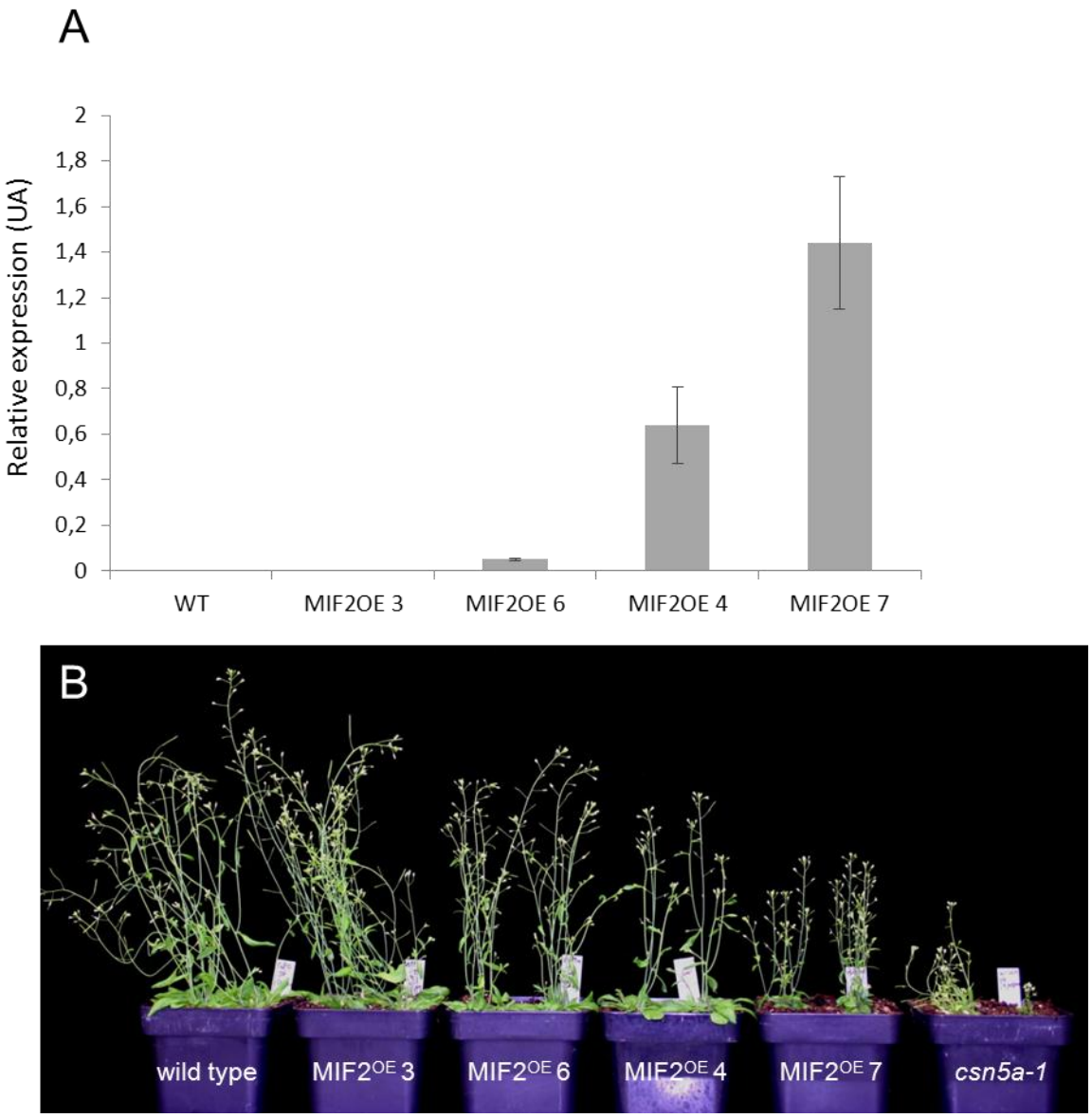


Fig.S2. Characterization of *MIF2* overexpressor plants.

(*A*) Relative abundance of MIF2 mRNA from transgenic construct. *MIF2* expression was normalized with expression of EF1α and tubuline genes. (*B*) Phenotypes of 4-week-old plants that express different levels of the *MIF2* gene and show a gradation of phenotypes.

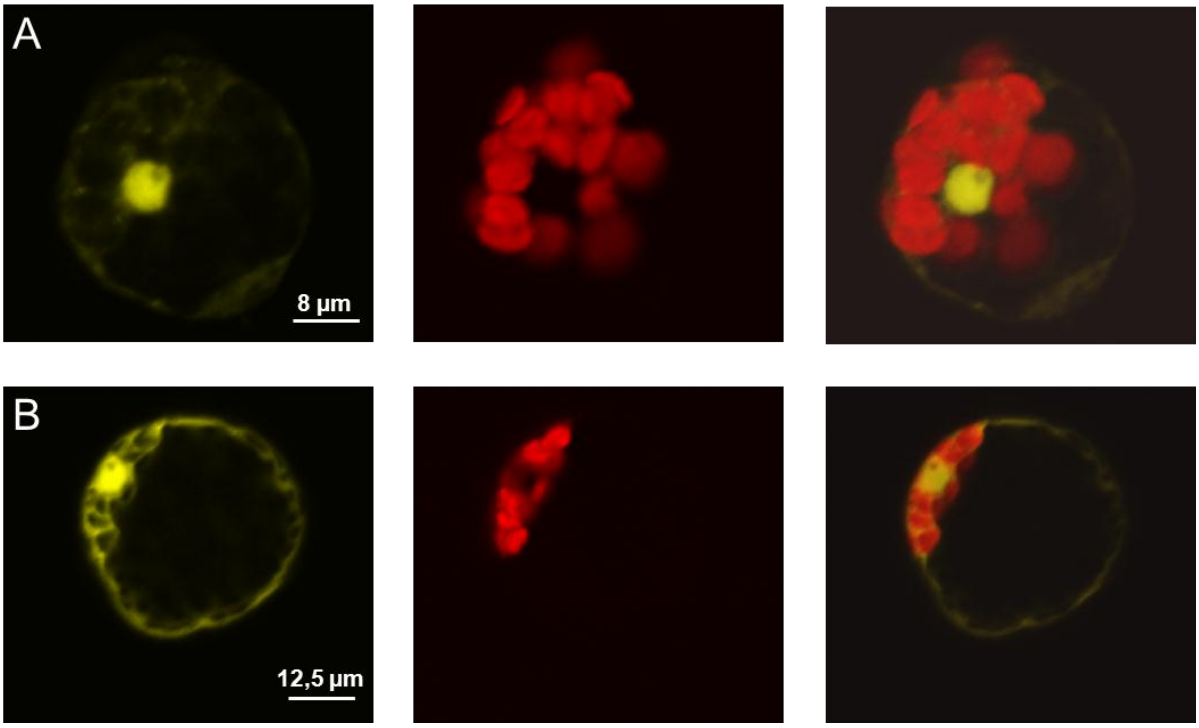


Fig.S3. Subcellular localization of fusion proteins IMA–YFP (*A*) and SlCSN5A-YFP (*B*) proteins in tomato mesophyll protoplasts.

Left panel correspond to YFP channel, middle panel to the chlorophyll autofluorescence and right panel to merge.

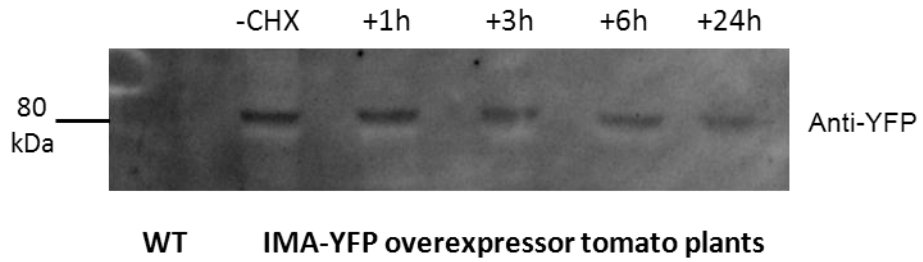


Fig.S4. IMA protein stability.

Immunoblot of protein extracts derived from 7-days-old tomato seedlings probed with anti-YFP (Invitrogen™). IMA-YFP fusion protein represents 36 kDa; however, as shown in fig. S1, IMA interacts strongly with itself allowing only the detection of IMA-YFP dimer.

Before extraction, seedlings were treated with 50 µM of cycloheximide (CHX) at indicated times to impair *de novo* production of proteins.

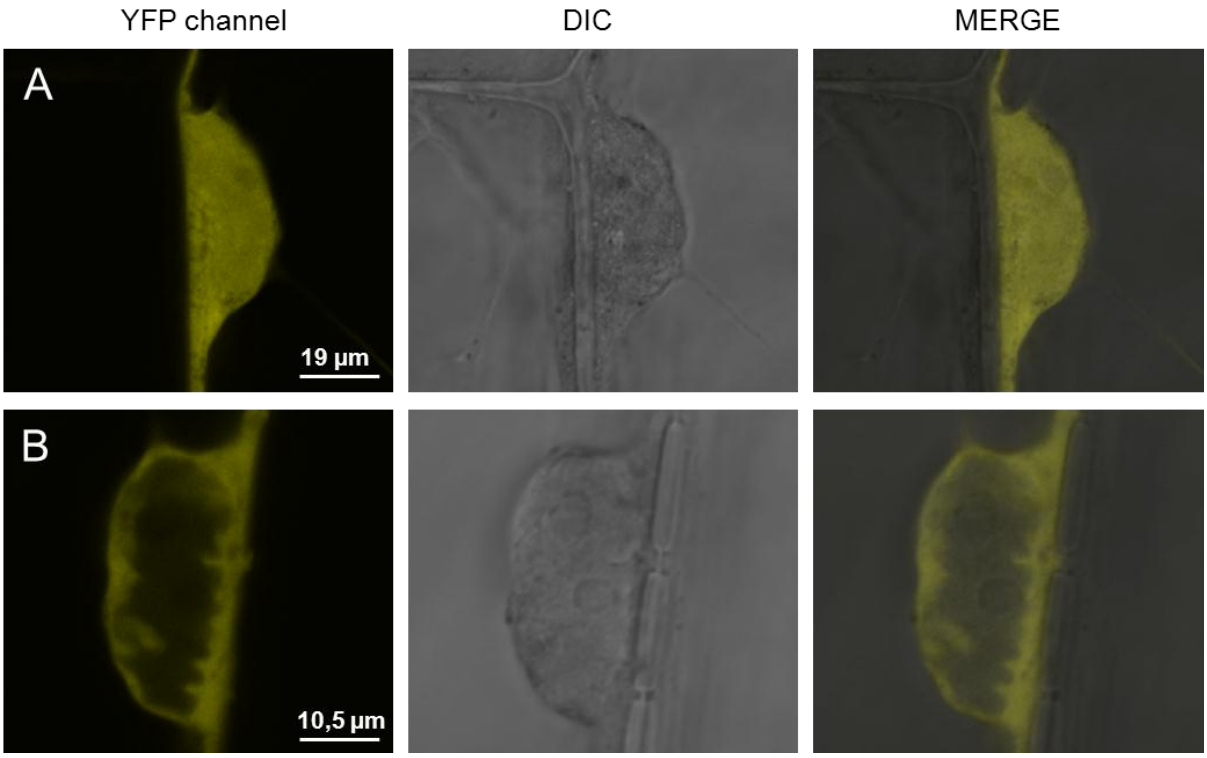


Fig.S5. AJH1 and AJH1∆76 fusion protein localization.

(*A*) AJH1-YFP localization in onion epidermal cell shows a fluorescent signal both in the nucleus and in the cytoplasm. (*B*) Fluorescent signal of AJH1∆76–YFP in onion epidermal cell is excluded from the nucleus.

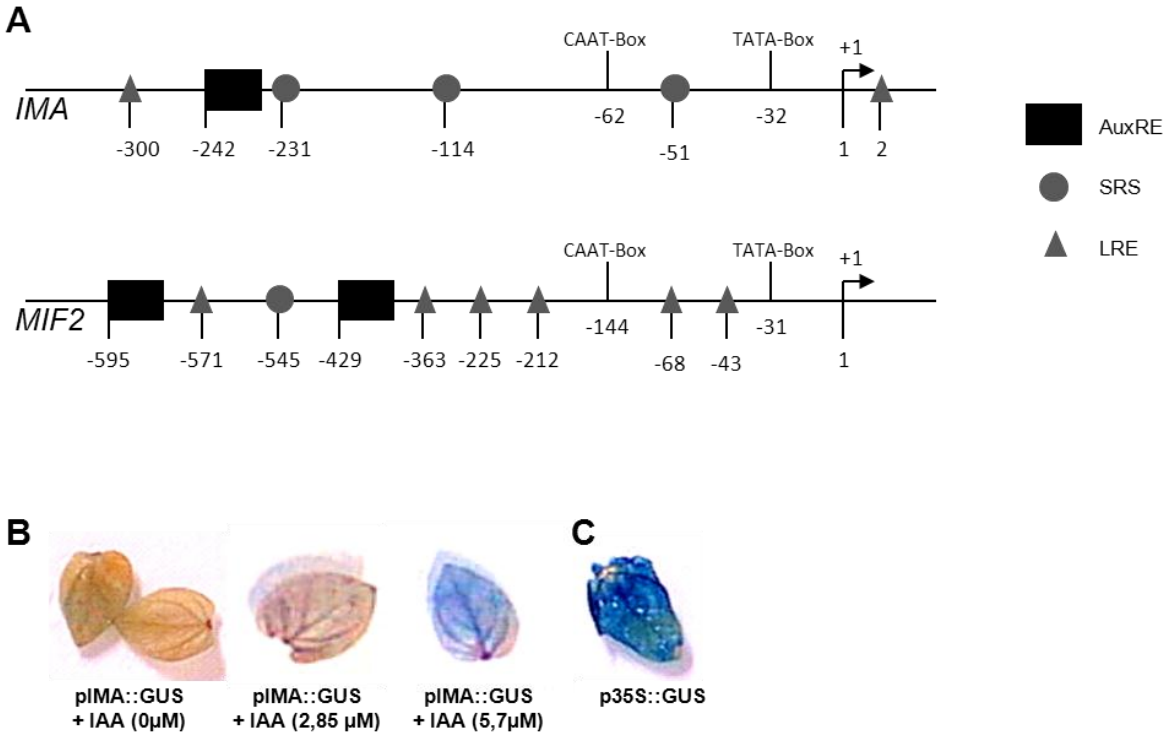


Fig.S6. IMA expression is induced by auxin teatment.

(A) In silico analysis of tomato *IMA* and Arabidopsis *MIF2* promoter sequence shows Auxin Response Element (AuxRE), Sugar Response Sequence (SRS) and Light-Responsive Element (LRE) (SIGNALSCAN, PLACE database).

(*B*) Auxin induction of the IMA promoter is dose-dependent.

(*C*) p35S::GUS , positive control for GUS staining.

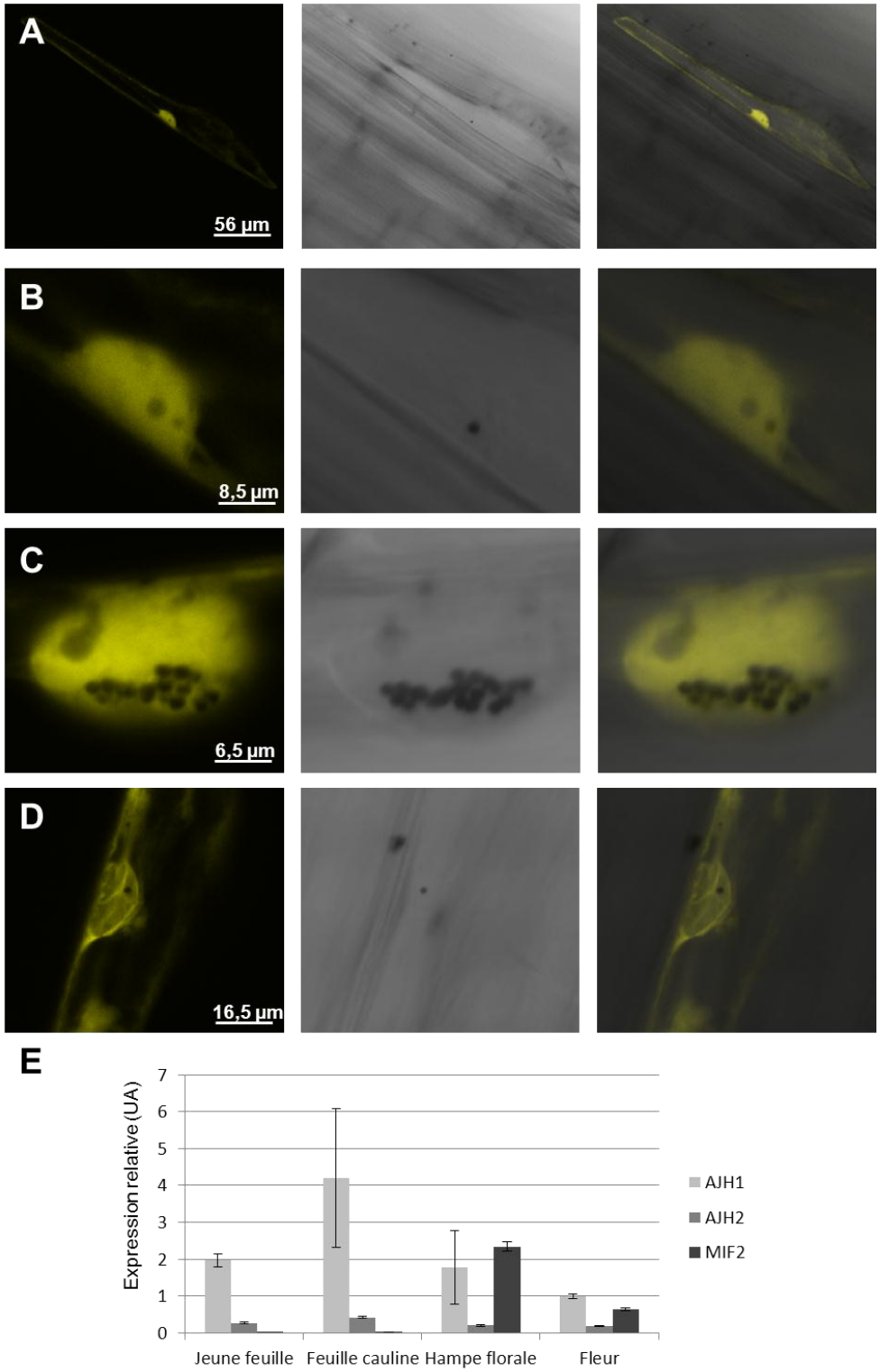


Figure 32: Localisation subcellulaire des protéines AJH1-YFP (A et B), MIF2-YFP (C) et du complexe AJH1/MIF2 (D) dans des cellules d'hypocotyles de moutarde et expression tissulaire des gènes *AJH1*, *AJH2* et *MIF2* chez Arabidopsis (E).

Les hypocotyles de moutarde sont transformés par biolistique comme les épidermes d'oignon (points denses aux électrons dans les noyaux correspondant aux billes d'or servant à la transformation). La colonne de gauche correspond aux acquisitions du signal YFP, la colonne du milieu correspond aux acquisitions en lumière transmise et à droite, la superposition des deux premières images.

L'expression des gènes *AJH1*, *AJH2* et *MIF2* est rapportée à l'expression du gène *AJH1* dans la fleur (valeur référence égale à 1). La jeune feuille est prélevée de la rosette.

3. Interaction des protéines d'Arabidopsis MIF2 et AJH1.

Dans ce premier article, les données obtenues avec les protéines de tomate, IMA et SlCSN5A, et les protéines d'Arabidopsis, MIF2 et AJH1 ont donné des résultats similaires. En effet, après avoir découvert l'interaction entre les protéines IMA et SlCSN5A chez la tomate, nous avons confirmé que cette interaction est conservée avec les protéines orthologues d'Arabidopsis, MIF2 et AJH1. L'interaction des protéines MIF2 et AJH1 a été vérifiée par BiFC dans le système hétérologue d'épiderme d'oignon et *in vivo* dans des cellules d'hypocotyles de moutarde en donnant des résultats identiques. La moutarde présente l'intérêt d'appartenir à la famille des Brassicacées comme *Arabidopsis thaliana*. Elle est supposée subir des processus physiologiques «orthologues» à ceux d'Arabidopsis. Ce sont les localisations subcellulaires obtenues avec les hypocotyles de moutarde qui sont présentées dans la **figure 32**. La protéine AJH1-YFP est localisée, comme chez la tomate, à la fois dans le noyau et dans le cytoplasme (**figure 32A et B**) alors que la protéine MIF2-YFP est principalement localisée dans le noyau (**figure 32C**). Cependant, alors que la protéine MIF2-YFP peut se trouver naturellement dans des sous-structures nucléaires apparentées à des clastosomes dans l'épiderme d'oignon, ce phénomène ne se produit pas dans l'hypocotyle de moutarde. Lorsque les hypocotyles de moutarde sont co-transformés avec les protéines MIF2 et AJH1 fusionnées chacune à une portion de la protéine YFP, la localisation du complexe MIF2/AJH1 dans le cytoplasme suppose un export hors du noyau ou, au contraire, un défaut d'import du complexe MIF2/AJH1 dans le noyau (**figure 32D**) confirmant ainsi les résultats présentés dans l'**article 1**.

Concernant l'expression tissulaire des gènes *AJH1* et *AJH2* chez Arabidopsis, il existe clairement une différence de profil d'expression selon les tissus (**figure 32E**). Alors que le gène *AJH2* est exprimé en faible quantité quel que soit le tissu sans différence de profil d'expression, le gène *AJH1* est plus exprimé que le gène *AJH2*, notamment dans la feuille cauline. Ces résultats sont à rapprocher de la différence fonctionnelle qui existe entre les deux copies de la sous-unité CSN5 chez Arabidopsis (**paragraphe II.1 et III.1, chapitre introduction**). Comme pour la tomate, l'expression des gènes *AJH1* et *AJH2* reste ubiquitaire, ce qui montre la nécessité d'avoir une expression des gènes codant la sous-unité CSN5 dans tous les tissus de la plante. Concernant le gène *MIF2*, il n'y a pas d'expression du gène dans les parties végétatives de la plante (jeune feuille de rosette et feuille cauline) et une forte expression du gène dans la hampe florale et dans la fleur comme cela avait déjà été montré par Hu et Ma (2006) (**figure 27a, chapitre introduction**). Ainsi les gènes *AJH1* et *MIF2* sont tous deux exprimés fortement dans la hampe florale et dans la fleur suggérant que l'interaction entre les protéines AJH1 et MIF2 peut s'effectuer dans ces territoires *in vivo*.

4. Conséquence de l'interaction entre les protéines CSN5 et IMA/MIF2.

L'interaction des protéines CSN5/IMA-MIF2 a soulevé de nombreuses questions sur ses effets, d'abord d'un point de vue mécanistique puis d'un point de vue physiologique. En effet, comme nous l'avons vu au cours du chapitre introduction, le signalosome est un complexe impliqué dans de nombreux processus physiologiques mais son action est dépendante d'une série d'évènements biochimiques visant à un assemblage correct pour permettre à la sous-unité catalytique, CSN5, d'être active. Lors de la découverte de l'interaction SlCSN5A/IMA, les plantes d'Arabidopsis mutées pour le gène *CSN5A* (*csn5a*) et les plantes de tomate surexprimant le gène *IMA* (IMA^{OE}) présentaient des phénotypes relativement bien caractérisés. De manière intéressante, des points communs sont apparus entre les phénotypes des plantes *csn5a* et IMA^{OE} à savoir une réduction de la taille de la plante et un phénotype buissonnant dû à la perte de la dominance apicale. La dominance apicale chez la plante est établie principalement par l'action de l'auxine or il a été démontrée chez les plantes *csn5a* d'Arabidopsis et chez les plantes IMA^{OE} de tomate une insensibilité aux effets de l'auxine (Gusmaroli, et al. 2004; Sicard, et al. 2008b). Nous nous sommes donc orientés sur le fait que la protéine IMA pouvait exercer un effet inhibiteur sur l'activité du signalosome, et particulièrement dans les voies de réponse à l'auxine dans lesquelles celui-ci est fortement impliqué. Pour tous les avantages que présentent le modèle d'étude *Arabidopsis thaliana*, la plupart des résultats qui vont être décrits dès à présent ont été obtenus avec du matériel provenant de plantes *Arabidopsis thaliana*.

La protéine MIF2 inhibe l'activité de déneddylation liée à la sous-unité 5 du signalosome.

Lorsqu'un des gènes codant une des sous-unités du signalosome est muté, l'assemblage du complexe est bloqué empêchant l'activité enzymatique nécessaire à la déneddylation des sous-unités cullines des complexes SCF ubiquitine-ligase. L'accumulation des cullines neddylées chez ces mutants est un fait corrélé à l'inhibition de l'activité du signalosome et est utilisé classiquement comme marqueur d'un défaut du fonctionnement du signalosome (Dohmann, et al. 2005 et 2008b; Gusmaroli, et al. 2004 et 2007; Stuttmann, et al. 2009). Les modifications post-traductionnelles des cullines est observable par immunodétection grâce à l'utilisation des anticorps dirigés contre la culline 1 décrits dans le **chapitre Matériel et Méthodes**. La séparation par migration entre les protéines neddylées (de plus haut poids moléculaire) et les cullines déneddylées n'est pas aisée puisque seulement 8 kDa de différence permet de les distinguer. Cependant une immunodétection réalisée sur des extraits protéiques de plantules d'Arabidopsis indique que, de façon similaire aux plantules *csn5a1*, les plantules $MIF2^{OE}$ accumulent des cullines neddylées (**figure 2C, article 1**). Dans une situation telle que chez la plante sauvage, le cycle de neddylation/déneddylation des

cullines est rapide et extrêmement régulé car l'accumulation de cullines neddylées est propice à une hyperactivité des complexes SCF qui entraînent la dégradation de leurs propres constituants (**paragraphe II.2, introduction**). L'accumulation des cullines neddylées chez les plantules MIF2^{OE} résulte donc d'un arrêt de ce cycle modulé par le signalosome. Ainsi, l'effet de la protéine MIF2 sur le signalosome est négatif et ceci est certainement dû à l'interaction de la protéine MIF2 avec la protéine CSN5.

Afin d'expliquer le mode d'action de la protéine MIF2 sur la protéine CSN5 provoquant l'inhibition de son activité enzymatique, plusieurs hypothèses ont été testées.

Mécanismes d'inhibition de la protéine MIF2 sur la protéine CSN5.

Plusieurs possibilités peuvent expliquer que l'interaction MIF2/CSN5 conduit à une inhibition de l'activité de CSN5. La première à avoir été testée est que l'interaction MIF2/CSN5 provoque une instabilité de cette dernière qui est alors dégradée. Cette hypothèse a été réfutée grâce à une évaluation de la quantité de la protéine CSN5 dans des extraits protéiques de plantules MIF2^{OE} (**figure 3A, article 1**).

En revanche, les expériences de BiFC ont montré que le complexe MIF2/CSN5 est localisé hors du noyau qui correspond à la localisation commune de chacune des deux protéines (**figure 3D, article 1** et **figure 32D**). Ce résultat, discuté dans l'**article 1**, montre que la protéine CSN5 en présence de la protéine MIF2, n'est plus capable d'être présente dans le noyau qui est le lieu d'assemblage et de mise en œuvre de l'activité du signalosome. Ainsi, la protéine MIF2 est capable de moduler la localisation subcellulaire de la protéine CSN5. Les expériences de BiFC ont cependant apporté des éléments visant à élucider le domaine d'interaction de la protéine CSN5 avec la protéine MIF2. Le BiFC est une technique dans laquelle chaque protéine d'intérêt est fusionnée à une portion de la protéine YFP, la portion correspondant aux 174 acides aminés à l'extrémité N-terminale de la protéine (YFP^{N}) ou la portion correspondant aux 66 acides aminés à l'extrémité C-terminale de la protéine (YFP^{C}). Ainsi, huit combinaisons sont réalisées pour chaque test d'interaction. Pour l'interaction des protéines IMA/MIF2 avec les protéines SlCSN5A/AJH1, une seule combinaison nous permet d'observer le signal fluorescent lié à la YFP reconstituée. Il s'agit de la combinaison suivante (**schéma 1**).

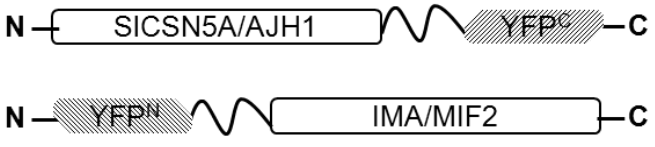


Schéma 1: Constructions ayant donné un signal positif en BiFC pour l'interaction des protéines CSN5A et IMA/MIF2.

Seules les protéines de fusion SlCSN5A/AJH1 avec la portion YFP en C-terminal des protéines d'intérêt fonctionnent, ce qui indique qu'une fusion en N-terminal de la protéine CSN5A peut gêner l'interaction avec IMA/MIF2, certainement à cause de l'encombrement stérique dû à la portion de la protéine YFP. De plus, comme nous l'avons précédemment évoqué au **paragraphe I.1** de ce chapitre, lors du criblage de la banque d'ADNc en double hybride, trois clones SlCSN5A ne possédaient pas les 107 acides aminés présents à l'extrémité C-terminale de la protéine. Ces éléments suggèrent que les protéines SlCSN5A/AJH1 interagissent avec les protéines IMA/MIF2 grâce à leur domaine N-terminal qui contient le domaine catalytique JAMM. De manière intéressante, une délétion partielle ou totale du domaine enzymatique JAMM de la protéine AJH1 empêche sa localisation nucléaire alors que la séquence de localisation nucléaire putative (motif RRK souligné, **figure 31**) est toujours présente. En effet, lorsque la séquence comprise dans le domaine JAMM (HSHPGYGCWLSGID) est tronquée de la protéine AJH1, certaines cellules montrent un signal fluorescent exclusivement dans le cytoplasme. Lorsque tout le domaine JAMM est tronqué de la protéine AJH1 (en *gris*, **figure 30**), toutes les cellules transformées montrent uniquement un signal cytoplasmique (**figure S5, article 1**). Toutes ces données associées offrent une perspective intéressante sur l'exploitation du site d'interaction entre les protéines SlCSN5A/AJH1 et les protéines IMA/MIF2 et posent la question d'une interaction directe entre le site catalytique des protéines CSN5A et des protéines IMA/MIF2 visant à inhiber l'activité enzymatique des protéines CSN5A.

L'exclusion de la protéine CSN5 du noyau peut résulter, comme cela a déjà été montré en absence de la protéine CSN5 (Gusmaroli, et al. 2007; Dohmann, et al. 2008b), en l'assemblage partiel et non fonctionnel du complexe signalosome. L'intégrité du complexe signalosome peut être vérifiée par des expériences de chromatographie d'exclusion. Cette technique a été réalisée dans des conditions telles que la séparation des masses protéiques s'effectue entre 10 et 600 kDa (**chapitre matériel et méthodes**). Elle a déjà été utilisée pour identifier les divers niveaux d'assemblage de la machinerie protéolytique (Dohmann, et al, 2008b; Gusmaroli, et al. 2004 et 2007) permettant de discriminer les sous-unités du signalosome libres (~40 kDa), le complexe signalosome (450 kDa) et la machinerie protéolytique comprenant le signalosome, le complexe ubiquitine-ligase et le protéasome (>600 kDa). Le passage d'extraits protéiques obtenus à partir de plantules d'*Arabidopsis thaliana* de 7 jours, de type sauvage ou surexprimant *MIF2 (*MIF^{OE}), sur la colonne de séparation a permis de collecter des fractions. La comparaison des profils d'élution entre la plante de type sauvage et la plante $MIF2^{OE}$ révèle une différence dans les profils de séparation des protéines (**figure 33**). En effet, alors que les profils de 600 kDa à 350 kDa sont identiques, un pic d'élution supplémentaire apparaît dans les extraits protéiques des

plantes MIF2^{OE} correspondant à des protéines ou des complexes protéiques de 150 kDa. De plus, le pic correspondant à des protéines ou complexes de 50 kDa est beaucoup moins important dans les extraits protéiques des plantes MIF2^{OE} par rapport à une plante de type sauvage. Ces éléments indiquent que le fait de surexprimer la protéine MIF2 provoque un réarrangement des complexes protéiques présents dans la plante ou la modification d'expression de certaines protéines. Cependant, l'identité des protéines impliquées n'est pas connue.

Pour tenter de répondre à cette question et pour connaître la composition des complexes, les fractions ont été analysées à l'aide de deux méthodes différentes. La première méthode, la plus couramment utilisée, consiste à réaliser des immunodétections sur les différentes fractions d'intérêt avec des anticorps reconnaissants des constituants du signalosome essentiellement. Cette méthode permet une approche ciblée qui nécessite une expérience d'immunodétection indépendante pour chaque protéine dont on veut observer la répartition. Sachant que le signalosome se construit en plusieurs phases d'assemblage successives et ne sachant pas à quel niveau son assemblage peut être altéré dans les plantes MIF2^{OE}, il est nécessaire de tester la présence de chaque sous-unité du signalosome et d'avoir les anticorps dirigés contre chacune d'entre elles, ce qui présente un inconvénient important. Cependant, des immunodétections visant à révéler la présence de la sous-unité 4 et de la sous-unité 5 du signalosome ont été tentées sans aucun résultat apparent dû à un problème technique. La deuxième méthode qui a été utilisée est une méthode sans *a priori* puisqu'elle consiste à séquencer les protéines présentes dans chaque pic d'élution par spectrométrie de masse (Plateforme Protéome CGFB-Bordeaux) (**figure 33**). Le nombre de protéines séquencées pour chaque pic d'élution est résumé dans le tableau suivant:

	WT	**MIF2^{OE}**
>600 kDa	272	259
350 kDa	66	61
150 kDa		241
50 kDa	292	295

Tableau 1: Nombre de protéines séquencées classées par pic d'élution dans les extraits protéiques des plantes WT et MIF2^{OE}.

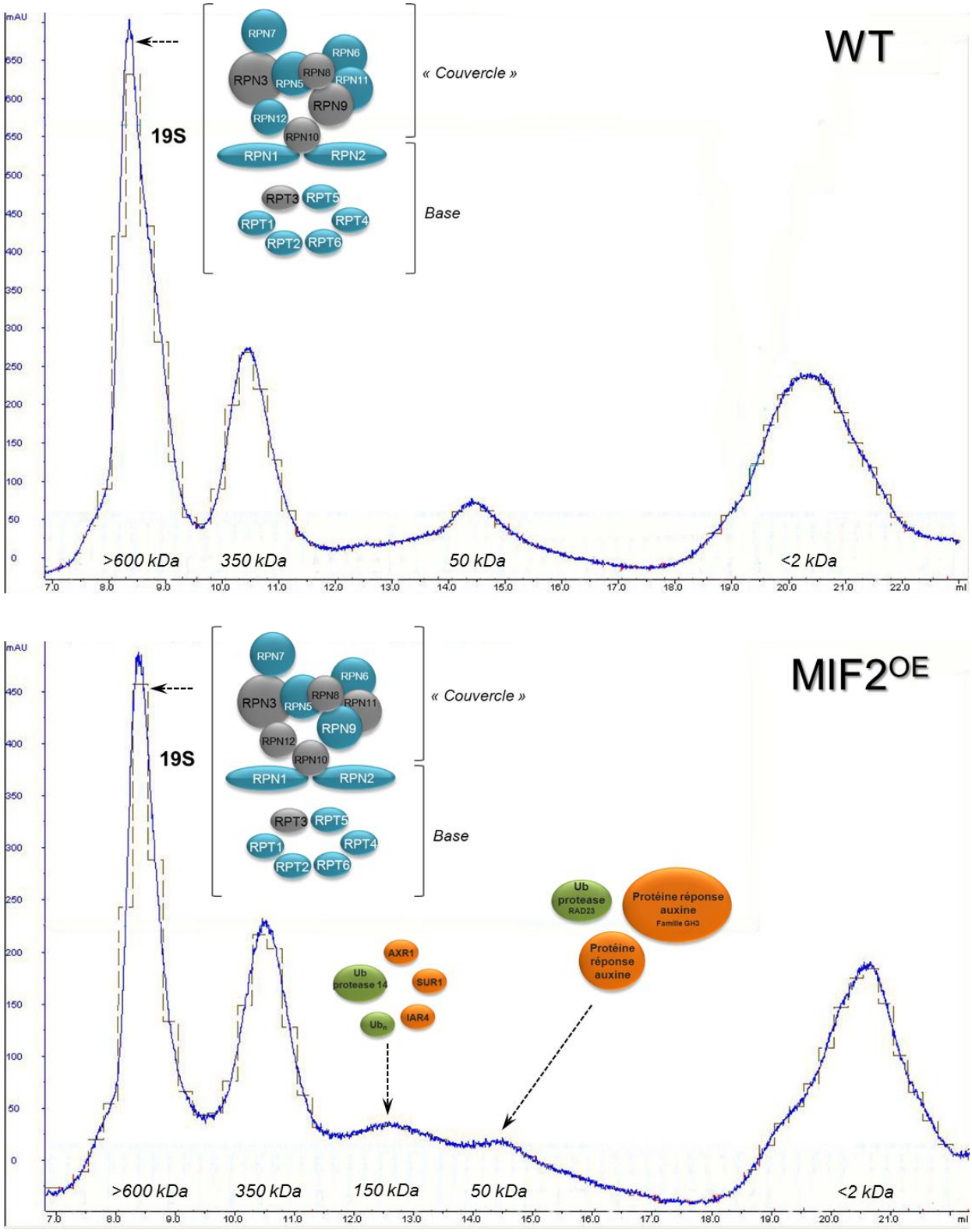


Figure 33: Profils d'élution des extraits protéiques issus de plantules d'Arabidopsis de type sauvage (haut) et surexprimant le gène *MIF2* (bas) en chromatographie d'exclusion.

Les graphiques représentent la mesure de la densité optique (mAU = milli Absorbance Unit) à 280 nm (longueur d'onde usuelle lors d'un dosage de protéines qui représente l'absorbance d'acides aminés aromatiques) par rapport au volume d'élution qui sort de la colonne (mL). En moyenne, une unité de DO est égale à 1 mg/mL.

Le dernier pic d'élution contient des éléments de moins de 2 kDa et correspond essentiellement au dessalage de la colonne.

Malgré un nombre important de protéines séquencées, aucune protéine appartenant au complexe signalosome n'a pu être identifiée. Cette situation peut s'expliquer par trois principales raisons: la première est qu'avant d'être séquencée en spectrométrie de masse, les protéines sont digérées une nuit par la trypsine, une enzyme qui coupe en C-terminal des acides aminés basiques (lysine et arginine). Ainsi, selon la composition peptidique des protéines, la digestion va s'effectuer de manière inégale libérant un nombre plus ou moins important de peptides. De ce fait, une protéine pourtant présente dans la fraction d'élution pourra être sous-représentée lors du séquençage à cause d'une digestion moins efficace par la trypsine. De plus, les peptides libérés lors de la digestion peuvent être plus ou moins bien ionisés, ce qui est pourtant essentiel pour le séquençage des peptides dans le spectromètre de masse. Enfin, il est important de noter que ce sont des extraits protéiques totaux qui ont été traités par chromatographie d'exclusion puis séquencés. Ainsi, pour le pic d'élution correspondant aux protéines de 600 kDa et plus, plus de la moitié des protéines séquencées correspondent à des protéines ribosomales présentes en quantité abondante dans la cellule. La digestion par la trypsine et le séquençage qui s'en suit vont être très efficaces sur des protéines très représentées, ce qui va avoir tendance à masquer d'autres protéines sous-représentées.

Cependant, certains résultats provenant du séquençage méritaient d'être soulignés. En effet, quel que soit l'extrait protéique étudié, certaines des sous-unités appartenant au protéasome 19S ont été identifiées dans le premier pic d'élution (**figure 33**). Pour rappel, le protéasome 19S vient se fixer sur le protéasome 20S afin de former le protéasome 26S. Le protéasome 19S est, lui-même, constitué de deux parties, la base qui contient six sous-unités ATPasiques (RPT1 à 6) et trois sous-unités non ATPasiques (RPN1, 2 et 10) et le «couvercle» qui contient huit sous-unités homologues aux sous-unités du signalosome (RPN3, 5-9, 11 et 12). D'une manière générale, les mêmes sous-unités du protéasome 19S sont mises en évidence dans les extraits protéiques des plantes de type sauvage et MIF2^{OE}. Les sous-unités identifiées lors du séquençage sont représentées en *bleu* dans la **figure 33**. Le protéasome 19S a un poids moléculaire d'environ 900 kDa mais les conditions de séparation appliquées dans cette expérience ne permettent pas de révéler le niveau d'assemblage de la machinerie protéolytique auquel le protéasome 19S appartient puisque tous les complexes de 600 kDa et plus sont élués en même temps. Enfin, certaines protéines ont été identifiées dans les extraits protéiques des plantes MIF2^{OE} mais pas chez les plantes de type sauvage. Ainsi, dans le pic d'élution correspondant aux protéines ou complexe de 150 kDa qui est spécifique des extraits protéiques des plantes MIF2^{OE}, cinq protéines ont été identifiées. Parmi ces protéines, il y a deux protéines liées à l'ubiquitine (en *vert*, **figure 33**), une protéine ayant une activité de dégradation de l'ubiquitine (Ub protéase

14) et des polymères d'ubiquitine (Ubi_n). Il y a aussi trois protéines liées à la voie de signalisation auxinique (en *orange*, **figure 33**), AXR1 qui participe à la constitution de l'enzyme d'activation de l'ubiquitine E1 et qui est essentielle à la réponse à l'auxine, SUR1 qui est une enzyme participant à la synthèse de l'auxine (**figure 4, chapitre introduction**) et IAR4 (IAA-conjugate resistant 4) qui est responsable de la conjugaison de l'auxine aux acides aminés et notamment à l'alanine. Dans le pic d'élution correspondant aux protéines de 50 kDa, une protéine impliquée dans la dégradation de l'ubiquitine et normalement associée au protéasome, RAD23 (en *vert*, **figure 33**) a été séquencée ainsi que deux protéines de fonction inconnue mais dont l'accumulation est induite en présence d'auxine (en *orange*, **figure 33**). L'identification de protéines impliquées dans la dégradation de l'ubiquitine ou dans la réponse à l'auxine n'apporte pas d'explication supplémentaire au rôle de l'interaction des protéines MIF2/CSN5 mais permettent de constater que des changements s'opèrent dans des plantes qui surexpriment le gène *MIF2*. Ces changements concernent visiblement la machinerie protéolytique, sans doute par le biais de l'interaction avec CSN5, et la voie de réponse à l'auxine dans laquelle les protéines MIF2 et CSN5 ont, de manière indépendante, un rôle connu. Cependant, dans ce contexte, le rôle de MIF2 dans la voie de réponse à l'auxine reste à préciser. Il s'agit notamment de déterminer s'il est dépendant ou non de son interaction avec la sous-unité CSN5.

Afin de répondre à cette question, il serait intéressant de réaliser une expérience de chromatographie d'exclusion sur des extraits protéiques obtenus après un enrichissement préalable. Pour ce faire, une co-immunoprécipitation réalisée avec des anticorps dirigés contre une sous-unité du signalosome et contre la protéine MIF2 qui interagit avec CSN5 permettrait d'enrichir les extraits protéiques en complexe signalosome ou en sous-unités pré-assemblées. L'identité des protéines impliquées pourra alors être révélée, comme précédemment, par séquençage.

5. Conséquence de l'interaction MIF2/CSN5 dans la réponse à l'auxine.

Le rôle du signalosome dans la réponse à l'auxine a été largement étudié et bien caractérisé, notamment au niveau des réponses physiologiques (**paragraphe III.2, chapitre introduction**). Par ailleurs, une étude (Tao, et al. 2005, **paragraphe II.2, chapitre introduction**) a mis en avant le mécanisme moléculaire qui conduit à la dégradation du répresseur transcriptionnel de l'auxine, AXR3/IAA17. Cette étude a démontré qu'AXR3/IAA17 est localisé dans des structures nucléaires qui se forment rapidement en présence d'auxine mais pas en présence de MG132, un inhibiteur du protéasome 26S. Les répresseurs transcriptionnels de la classe des Aux/IAA ont une demi-vie courte, entre 10 et 80 min, et sont très rapidement dégradés en présence d'auxine.

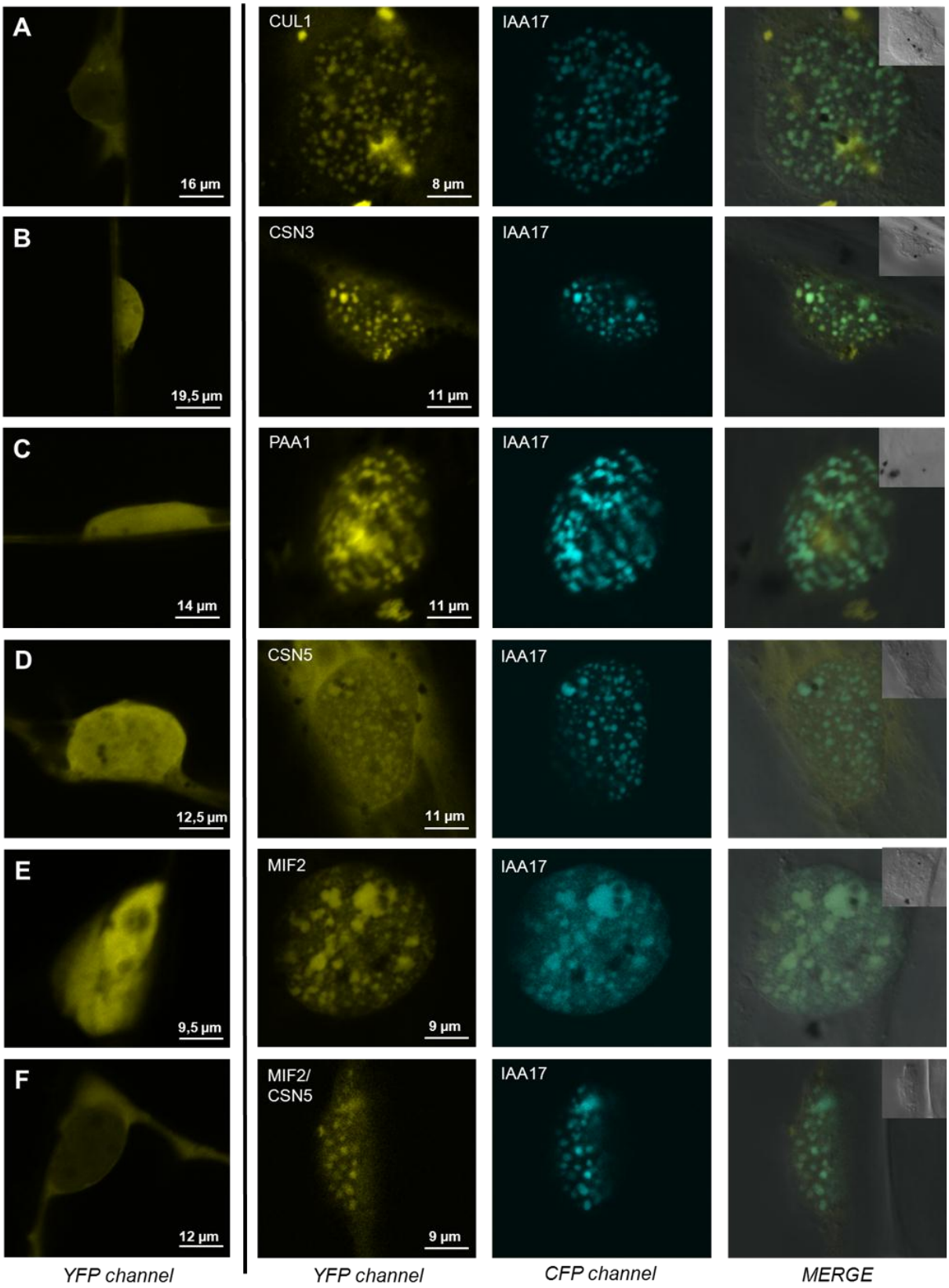


Figure 34: Localisation des protéines CUL1 (A), CSN3 (B), PAA1 (C), CSN5 (D), MIF2 (E) et du complexe MIF2/CSN5 (F) fusionnées à la protéine YFP seules (colonne de gauche) ou en présence de la protéine AXR3/IAA17 fusionnée à la protéine CFP et d'auxine (trois colonnes de droite).

L'image réduite en haut à droite de la dernière colonne correspond à l'acquisition de l'image en lumière transmise permettant de visualiser le noyau.

Il a été montré qu'en co-exprimant AXR3/IAA17 avec les divers constituants de la machinerie protéolytique dans des protoplastes d'Arabidopsis, chaque acteur de la machinerie protéolytique était capable de colocaliser dans ces structures nucléaires apparentées à des lieux de protéolyse active.

Le fait que le complexe MIF2/CSN5 ne soit pas localisé dans le noyau soulève la question de l'intégrité du complexe signalosome et de sa capacité à assurer son rôle dans les processus de protéolyse. Afin de répondre à ces questions, nous avons étudié la localisation subcellulaire des différents constituants de la machinerie protéolytique et de MIF2 en présence d'AXR3/IAA17 et d'auxine dans des cellules épidermiques d'oignon. Nous avons réalisé des co-transformations de protéines appartenant au complexe SCF tel que la culline 1 (**figure 34A**), au complexe signalosome avec CSN3 et CSN5A (**figure 34B** et **D**) et au complexe protéasome 26S avec PAA1 ou α1 (**figure 34C**). Ces protéines, lorsqu'elles sont exprimées seules, sont toutes localisées à la fois dans le noyau et dans le cytoplasme que ce soit en présence ou en absence d'auxine (**figure 34A à D, colonne de gauche**). La protéine de fusion CUL1-YFP est visible dans peu de cellules et le signal fluorescent correspondant est faiblement observable dans le noyau, certainement à cause de sa taille (poids moléculaire d'environ 106 kDa). Le temps nécessaire pour sa transcription, sa traduction et son repliement tridimensionnel est donc plus long que pour les autres protéines testées. Cependant, en présence de la protéine AXR3/IAA17 et d'auxine, les protéines CUL1, CSN3, PAA1 et CSN5A sont localisées dans des structures nucléaires avec AXR3/IAA17 (**figure 34A à D**) tel que décrit par Tao *et al*. (2005). Ainsi, la machinerie protéolytique est apte à s'associer dans des structures spécialisées en présence d'un substrat de cette machinerie et du stimulus initiant la dégradation de ce substrat, en l'occurrence ici, l'auxine.

La protéine MIF2-YFP est une protéine essentiellement nucléaire présentant un signal fluorescent diffus dans le noyau (**figure 34E, colonne de gauche**). Cependant, en présence d'auxine, la protéine MIF2 a tendance à être localisée dans des structures nucléaires (**figure 4A, article 1**) laissant présager que la protéine MIF2 est potentiellement impliquée dans les mécanismes de dégradation protéolytique. En effet, tout comme les divers constituants de la machinerie protéolytique, en présence d'auxine, la protéine MIF2 colocalise avec la protéine AXR3/IAA17 dans les structures nucléaires (**figure 34E**). La question est de savoir si lorsque la protéine MIF2 interagit avec la protéine CSN5, cette dernière est capable de rejoindre ces structures spécifiques de la dégradation protéolytique alors qu'en absence ou en présence d'auxine, le complexe MIF2/CSN5 n'est pas présent dans le noyau (**figure 34F, colonne de gauche**).

Contre toute attente, en présence de la protéine AXR3/IAA17 et d'auxine, la protéine MIF2 n'empêche pas la localisation nucléaire de CSN5 dans ces structures nucléaires associées à la protéolyse (**figure 34F**).

Ainsi, il semble que la protéine MIF2 agisse comme une protéine adaptatrice modulant la localisation de la sous-unité CSN5A afin de réguler sa participation à certaines voies de réponse tel que la réponse à l'auxine. En effet, d'une manière générale, la protéine MIF2 inhibe l'activité de déneddylation due à l'action de la protéine CSN5 soulevant la question du mode opératoire de cette action inhibitrice. Ainsi, il est intéressant de déterminer si cette inhibition est totale ou réservée à certaines voies de signalisation dans lesquelles le signalosome intervient. Pour résumer, la protéine MIF2 ne semble pas déstabiliser la protéine CSN5 et ne conduit pas à sa dégradation. Cependant, l'interaction des protéines MIF2 et CSN5 conduit à une relocalisation des protéines uniquement dans le cytoplasme suggérant que la protéine MIF2 soustrait la protéine CSN5 du complexe signalosome localisé, quant à lui, dans le noyau. Malheureusement, l'intégrité du complexe signalosome en présence de la protéine MIF2 n'a pu être évaluée à ce jour. Cependant, sachant que les protéines MIF2 et CSN5 sont toutes deux nécessaires à la voie de réponse à l'auxine, nous avons voulu évaluer si l'interaction entre ces deux protéines est responsable des défauts de réponse à l'auxine observés chez des plantes surexprimant le gène *MIF2.* Pour cela, nous nous sommes intéressés aux mécanismes moléculaires mis en jeu dans cette voie de réponse. De façon surprenante, lorsque la voie de réponse à l'auxine est activée et qu'il y a nécessité de dégrader les répresseurs transcriptionnels, le complexe MIF2/CSN5 est capable d'être localisé dans des structures nucléaires qui rassemblent tous les éléments nécessaires à la dégradation protéolytique. Ce dernier élément suggère que la protéine MIF2 n'empêche pas la protéine CSN5 de rejoindre la machinerie protéolytique lorsque cela est nécessaire dans le cadre de la réponse à l'auxine. Ainsi, l'inhibition de la protéine CSN5 par la protéine MIF2 peut s'exercer en séquestrant la protéine CSN5 hors de son lieu d'action mais peut également s'effectuer directement au sein du complexe signalosome. Deux mécanismes peuvent être proposés pour expliquer ce mode d'inhibition. En effet, nous ne connaissons pas encore les modalités de la régulation de l'assemblage du signalosome lors de l'activation de la machinerie protéolytique. Cependant, en présence d'auxine, la protéine CSN5 peut rejoindre les structures nucléaires associées à la protéolyse, même en interaction avec la protéine MIF2. Mais aucun élément ne nous permet de dire si le complexe signalosome est correctement assemblé et fonctionnel. Le second mécanisme est suggéré par les caractéristiques de l'interaction entre les protéines MIF2 et CSN5. En effet, cette interaction s'effectue grâce à la partie N-terminale de la protéine CSN5 qui contient le

domaine enzymatique JAMM. Or, si le domaine JAMM de la protéine CSN5 qui doit être accessible pour le substrat NEDD8/RUB1 n'est pas exclu de cette interaction, comme ce doit être le cas lors de l'interaction entre CSN5 et CSN6, la déneddylation des cullines ne pourra avoir lieu. Nous avons montré que la délétion du domaine JAMM provoque une perte de la localisation nucléaire de la protéine CSN5 comme dans le cas de l'interaction avec la protéine MIF2. Ces différents résultats suggèrent qu'en présence d'auxine, la protéine CSN5, par un phénomène encore inconnu, est capable d'être localisée dans le noyau et peut-être, d'être intégrée dans le complexe signalosome, même en présence de la protéine MIF2. Dans ce cas, la protéine MIF2 ne provoque peut-être pas de défaut d'assemblage du complexe signalosome mais se fixe au niveau du site catalytique de la protéine CSN5 inhibant son activité de déneddylation.

Cette première partie a mis en lumière certaines caractéristiques de l'interaction entre les protéines MIF2 et CSN5 et a permis de montrer que la protéine MIF2 intervient dans la réponse à l'auxine au niveau moléculaire en interagissant avec la protéine CSN5. Cependant, le rôle de cette interaction dans le développement de la plante reste à définir. En effet, l'inhibition exercée par la protéine MIF2 sur la protéine CSN5 concerne-t'elle toutes les voies de réponse auxquelles le signalosome participe et précisément, toutes les voies de réponse aux hormones dans lesquelles le signalosome et la protéine MIF2 sont impliqués ? De plus, le gène *MIF2* est exprimé exclusivement dans les parties reproductrices de la plante suggérant une spécificité d'action de la protéine MIF2 sur la protéine CSN5 dans ces territoires. Or, nous avons généré des plantes qui surexpriment le gène *MIF2* sous la dépendance d'un promoteur constitutif fort 35S du CaMV. La question de l'effet de la surexpression du gène *MIF2* dans tous les tissus de la plante sur la protéine CSN5 et par défaut, sur l'activité de la machinerie protéolytique reste posée.

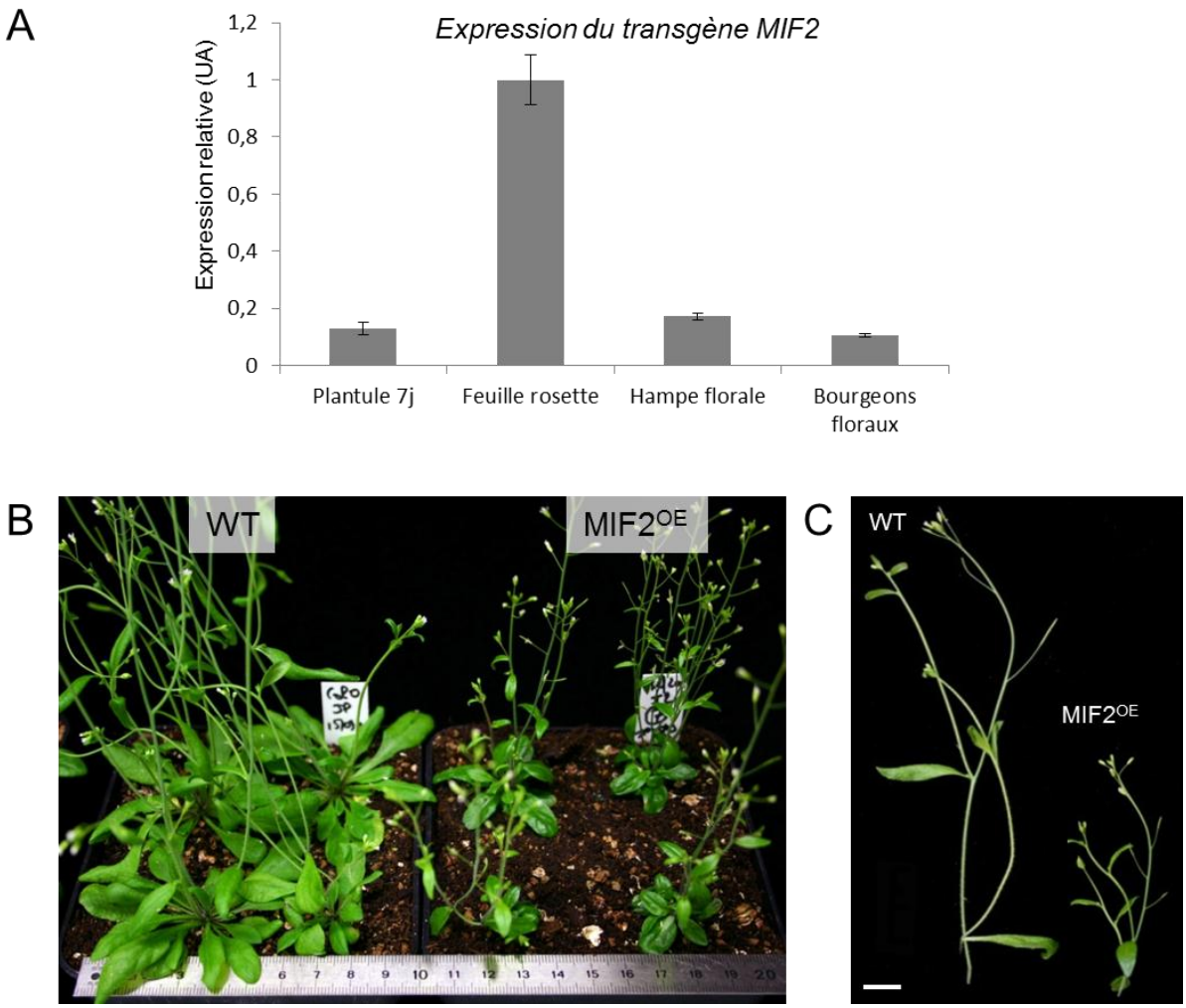


Figure 35: Expression spatiale du transgène (A) et phénotypes des plantes MIF2^{OE} (B et C).

Echelle en C: 1 cm.

II Caractérisation du gène *MIF2* lors du développement de la plante.

1. Caractéristiques phénotypiques des plantes surexprimant *MIF2*.

Les plantes MIF2^{OE} (MIF2 overexpressors) ont été générées à l'aide d'une construction plasmidique portant le gène *MIF2* sous la dépendance du promoteur fort 35S. Quatre lignées indépendantes d'*Arabidopsis thaliana* transgéniques ont été sélectionnées en se basant sur le niveau d'expression du transgène *MIF2* (**figure S2, article**). La caractéristique phénotypique la plus remarquable associée à l'expression du transgène est la réduction de taille et la perte de dominance apicale donnant un aspect buissonnant. La sévérité de ce phénotype corrèle avec le niveau d'expression du transgène; le nanisme le plus prononcé étant observé pour la plante surexprimant le plus fortement *MIF2*. Ainsi, les plantes MIF2^{OE}, comme les plantes MIF1^{OE} (Hu and Ma 2006) présentent un développement végétatif très altéré. La réduction globale de la taille de la plante est due à la réduction de taille de chaque organe. Les rosettes ont un diamètre plus petit dû à un défaut d'élongation du limbe et du pétiole de la feuille (**figure 2, article** et **figure 35B**) donnant une forme longue et non oblongue comme pour les feuilles des plantes de type sauvage. La couleur des feuilles est d'un vert sombre (**figure 2, article** et **figure 35B**) avec une cuticule épaisse donnant un aspect brillant. La perte de dominance apicale soulignée précédemment est caractérisée par une augmentation du nombre d'axes inflorescentiels (**figure 35B**) plus courts avec des entrenœuds réduits (**figure 35C**). La croissance de ces plantes est ralentie par rapport à une plante de type sauvage et la floraison est beaucoup plus tardive.

Il est intéressant de noter que le transgène ne s'exprime pas de façon homogène dans toute la plante. En effet, l'expression du transgène est forte dans les feuilles de rosette mais elle est modérée dans les plantules, la hampe florale et les bourgeons floraux (**figure 35A**). Ainsi, le transgène *MIF2* est fortement exprimé dans les tissus végétatifs alors qu'il ne s'exprime pas dans les tissus correspondants chez la plante sauvage (**figure 32E**). Cette situation peut expliquer la sévérité des modifications observées au niveau des structures végétatives chez les plantes MIF2^{OE}.

A l'inverse, le développement de la fleur semble moins affecté chez les plantes transgéniques par rapport aux fleurs des plantes de type sauvage. Ainsi, les pétales montrent une réduction de taille significative laquelle se traduit par une déformation du pistil (**figure 36A**) entraînant un problème de déhiscence et une diminution de la fertilité. Les siliques obtenues par fécondation «mécanique» sont petites et déformées par rapport aux siliques des plantes sauvages. Leur maturation est également plus lente que chez les plantes de type sauvage. Chez la tomate, la surexpression du gène *IMA* entraîne une diminution de l'expression du gène *SlWUS* et une augmentation de l'expression des gènes de la fonction D dans les derniers stades du développement floral afin de promouvoir la

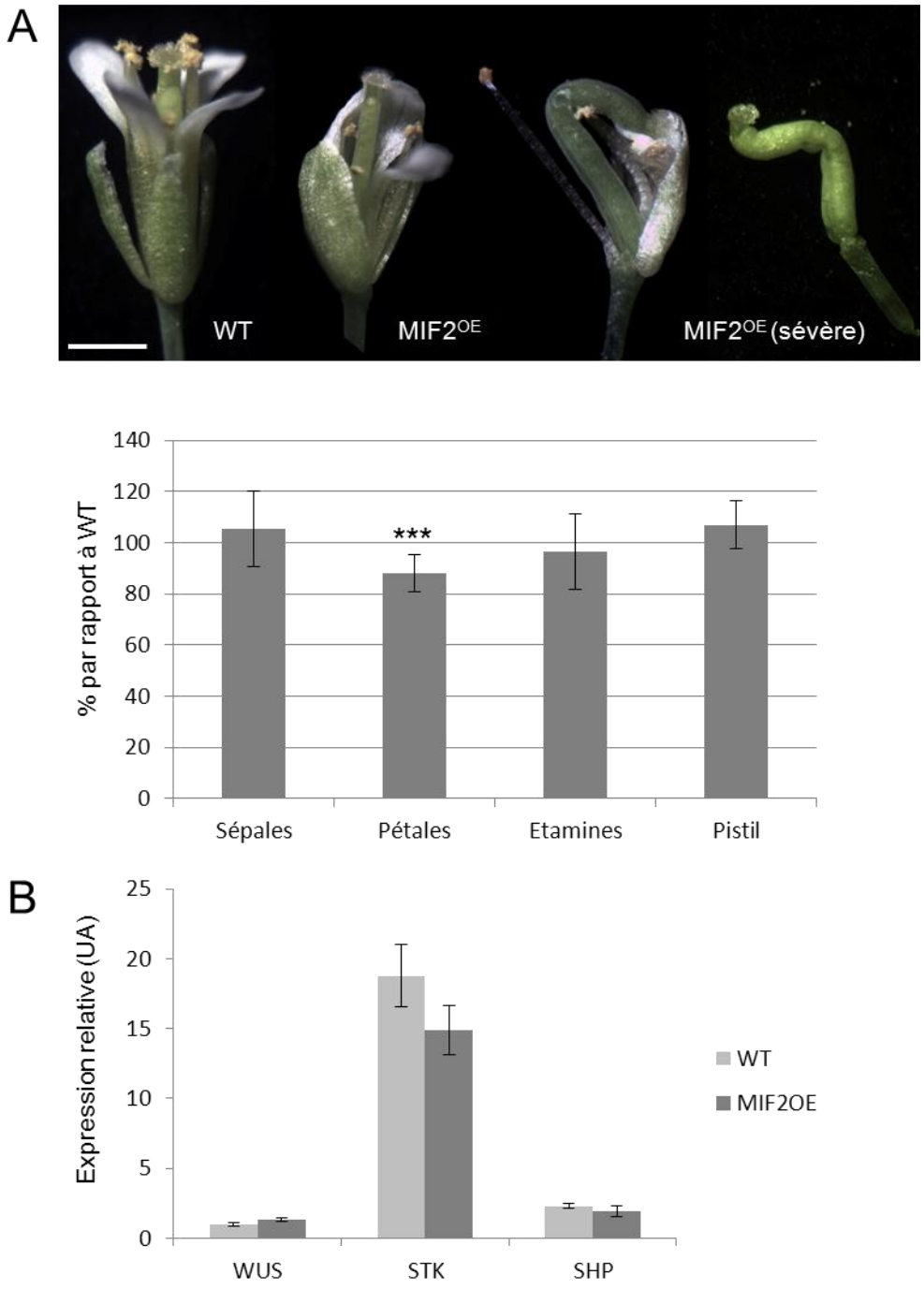


Figure 36: Phénotypes des fleurs des plantes MIF2^{OE}.

(A) Phénotypes des fleurs MIF2^{OE} et mesure de la longueur, exprimée en pourcentages, des différentes pièces florales MIF2^{OE} par rapport à celles de la plante de type sauvage (WT). Sépales, n=12; pétales, n=12, p<0,001, variances égales; étamines n=18 et pistils n=3 (échelle: 1mm).

(B) Expression relative des gènes *WUS*, *STK* et *SHP1/2* dans les bourgeons floraux. L'expression est normalisée par rapport à l'expression des gènes *EF1α* et *TUBULINE.* L'expression du gène *WUS* dans la plante MIF2^{OE} et des gènes *STK* et *SHP* dans les plantes WT et MIF2^{OE}, est rapportée à l'expression du gène *WUS* dans la plante WT (valeur =1). L'expression de ces gènes est donc relative à l'expression du gène *WUS* dans la plante de type sauvage WT.

terminaison florale (Sicard, et al. 2008b). Afin de déterminer si les anomalies associées à la surexpression de *MIF2* chez Arabidopsis peuvent être attribuées, comme c'est le cas pour le gène *IMA* chez la tomate, à la dérégulation de gènes clés intervenant dans le développement floral, l'expression du gène *WUS*, et des gènes de la fonction D, *STK* et *SHP1/2*, a été mesurée dans des jeunes bourgeons floraux. Les expressions de ces gènes entre la plante de type sauvage et la plante MIF2^{OE} ne présentent pas de différences significatives (**figure 36B**). Ainsi, chez Arabidopsis, le gène *MIF2* ne semble pas avoir d'impact sur l'expression de ces gènes. Cependant, les résultats présentés dans la **figure 36B** ont été obtenus à partir des ARNm de bourgeons floraux prélevés à différents stades. L'expression relativement faible du gène *WUS* et celle relativement élevée du gène *STK* suggère que la terminaison florale s'est déjà produite. Le stade des bourgeons floraux au moment du prélèvement pourrait se situer en aval du stade à partir duquel le gène *MIF2* agit. La surexpression de *MIF2* pourrait alors se révéler sans effet sur l'expression des orthologues des gènes mis en évidence chez la tomate. L'analyse de l'expression de ces gènes en fonction des stades de développement des bourgeons floraux devra être réalisée pour tenter de vérifier cette hypothèse.

2. Régulation transcriptionnelle entre les gènes MIF2 et CSN5A.

La première partie de ce chapitre a mis en lumière un mécanisme de régulation post-traductionnelle qu'exerce la protéine MIF2 sur la protéine CSN5A. Cependant, nous avons cherché si la régulation de l'une ou l'autre de ces protéines pouvait s'exercer à un autre niveau de régulation et notamment, au niveau transcriptionnel.

Les niveaux d'expression du gène *MIF2* ont été mesurés dans les tissus des plantes de type sauvage et dans les plantes mutées pour le gène *CSN5A* (mutant perte-de-fonction *csn5a1*) (**figure 37A**). Le gène *MIF2* est presque indétectable dans les feuilles. Aucune différence significative n'a pu être observée concernant l'expression de *MIF2* entre les feuilles des plantes de type sauvage et les feuilles des plantes *csn5a1*. En revanche, dans la hampe florale et les bourgeons floraux, le gène *MIF2* est significativement moins exprimé chez les plantes *csn5a1* que chez les plantes de type sauvage (**figure 37A**). En effet, l'expression du gène *MIF2* diminue de 60% dans la hampe florale et de 45% dans les bourgeons floraux. Ces données suggèrent que la protéine CSN5A est impliquée dans la régulation transcriptionnelle du gène *MIF2*.

Les niveaux d'expression du gène *CSN5A* chez les plantes de type sauvage et les plantes MIF2^{OE} ont été comparés (**figure 37B**). Le gène *CSN5A* est exprimé de façon ubiquitaire dans la plante, mais une augmentation d'environ 20% de son expression dans les bourgeons floraux des plantes MIF2^{OE} par rapport à ceux de la plante de type sauvage peut être observée spécifiquement dans ces organes.

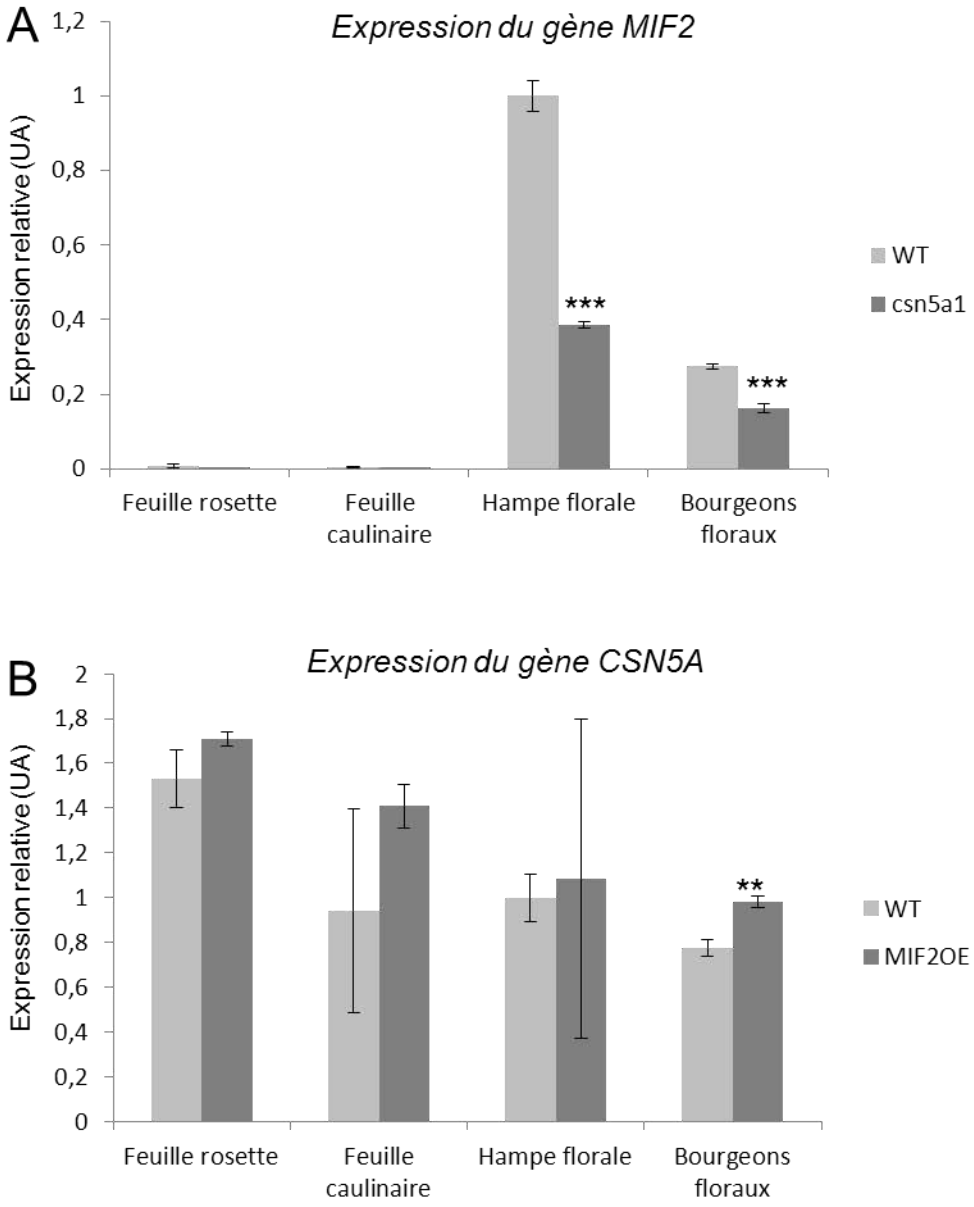


Figure 37: Expression des gènes *MIF2* (A) et *CSN5A* (B) dans les plantes WT, *csn5a1* et MIF2^{OE}.

L'expression est normalisée par rapport à l'expression des gènes *EF1α* et *TUBULINE* et relative à l'expression du gène *MIF2* dans la hampe florale de la plante WT (valeur =1) en (A) et à l'expression du gène *CSN5A* dans la hampe florale de la plante WT (valeur =1) en (B).

Tests statistiques: n=3 pour chaque donnée d'expression et *** p<0,001, ** p<0,01, variances égales.

Cette différence d'expression semble indiquer que la protéine MIF2 peut induire l'expression de CSN5A dans les bourgeons floraux. Cependant bien que significative, cette différence n'a pas forcément d'impact au niveau physiologique. Pour parfaire cette étude, il serait intéressant de regarder l'expression du gène *MIF2* chez des plantes qui surexpriment le gène *CSN5A* et l'expression du gène *CSN5A* chez des plantes qui sous-expriment le gène *MIF2*.

Ainsi, la protéine CSN5A semble exercer une régulation transcriptionnelle tissu-spécifique sur l'expression du gène *MIF2*. Cette régulation doit certainement s'effectuer de manière indirecte puisque la protéine CSN5A ne possède pas d'activité connue de régulateur transcriptionnel. En revanche, la protéine CSN5A, en participant au complexe signalosome, régule la durée de vie de nombreux facteurs de transcription qui pourraient être impliqués dans la régulation transcriptionnelle du gène *MIF2*. Nous n'avons actuellement aucune donnée permettant d'identifier ces régulateurs. Cependant, nous avons montré que le signal auxinique induit l'expression du gène *IMA* (**article 1**). Or le complexe signalosome participe indirectement à la réponse au signal auxinique à travers la dégradation des répresseurs transcriptionnels Aux/IAA. De plus, la régulation transcriptionnelle indirecte de la protéine CSN5A sur le gène *MIF2*, soutient l'hypothèse que l'interaction entre ces deux protéines doit être spécifique du développement floral et constitue un élément majeur de la régulation du développement floral et après fécondation, du fruit.

3. Expression des gènes *MIF2* et *CSN5A* et réponse à la lumière au cours de la germination.

Les huit sous-unités du complexe signalosome ont été découvertes à partir des caractéristiques des phénotypes des mutants *csn* lesquels présentent une réponse constitutive à la lumière dite de «photomorphogenèse constitutive». Le phénotype de ces mutants se caractérise, lors de la germination en absence de lumière, par un hypocotyle court et des cotylédons jaunes ouverts, à l'inverse de la plante de type sauvage chez laquelle les plantules forment une crosse apicale et un hypocotyle allongé. Les plantules $MIF1^{OE}$ et $MIF2^{OE}$ (Hu and Ma 2006 et Hu, et al. 2011, respectivement) présentent également ce phénotype de croissance à l'obscurité caractéristique des mutants *csn*.

Nous avons répété l'expérience de Hu *et al.* (2011) en faisant germer à l'obscurité les plantules $MIF2^{OE}$ que nous avons générées au cours de notre étude. Or ces dernières présentent, à l'obscurité, une croissance de l'hypocotyle similaire à celle de la plante de type sauvage (**figure 38A**). Cependant, les plantules $MIF2^{OE}$ présentent l'autre aspect du phénotype «photomorphogenèse constitutive», à savoir les cotylédons ouverts à l'inverse des cotylédons des plantules de type sauvage qui forment une crosse apicale (**figure 38A**).

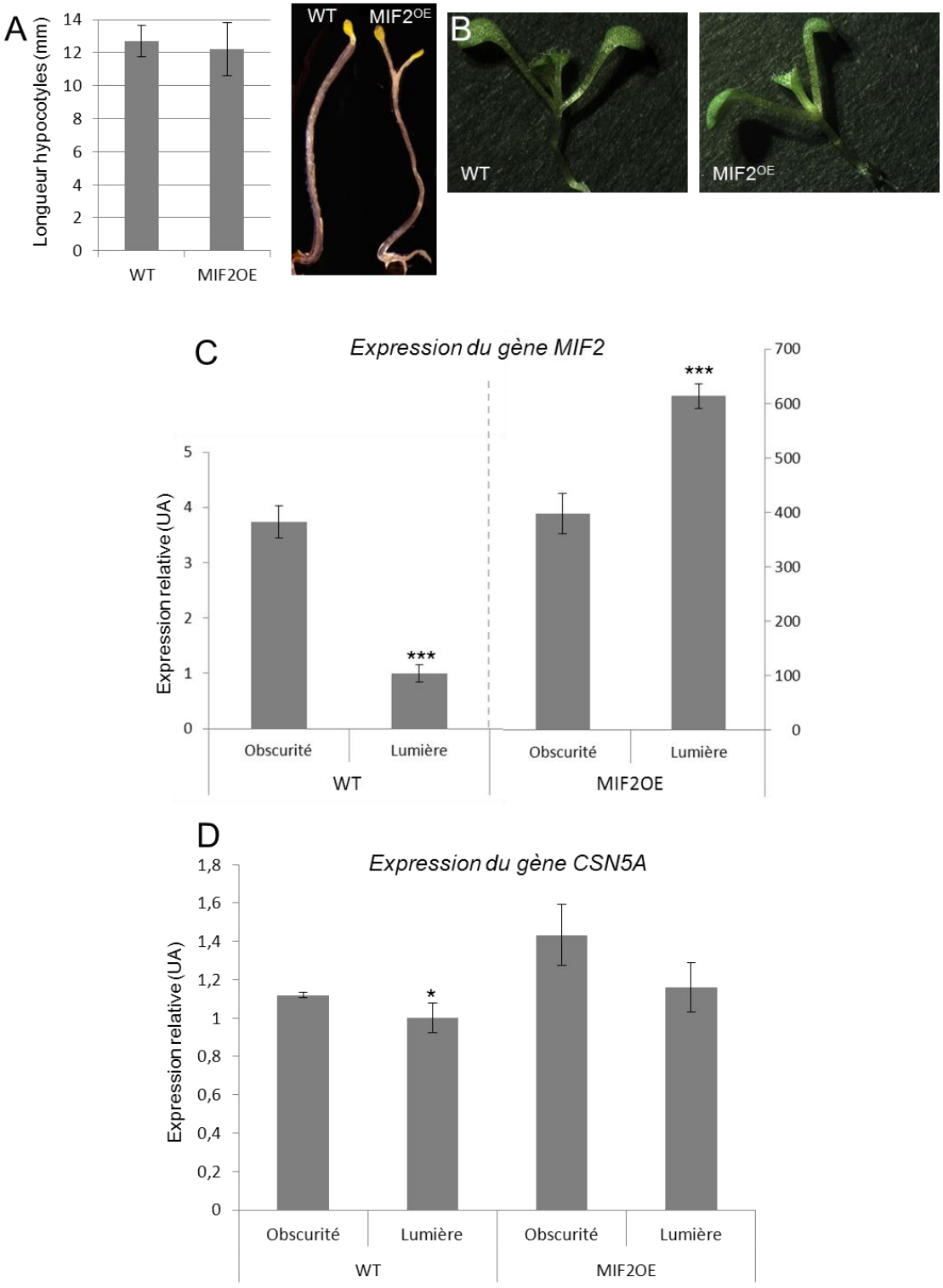


Figure 38: Phénotypes des plantes MIF2^{OE} lors de la germination à l'obscurité (A) et à la lumière (B) et expression des gènes *MIF2* et *CSN5A* en fonction de la lumière chez des plantules de 7 jours (C et D).

L'expression est normalisée par rapport à l'expression des gènes *EF1α* et *TUBULINE* et relative à l'expression du gène *MIF2* (C) ou *CSN5A* (D) dans la plante WT à la lumière (valeur =1). L'échelle de gauche en (C) correspond aux échantillons WT et l'échelle de droite correspond aux échantillons MIF2^{OE}.

Tests statistiques: n=3 pour chaque donnée d'expression et *** p<0,001, * p<0,05, variances égales.

A l'heure actuelle, nous n'avons pas d'éléments définitifs permettant d'expliquer la différence de phénotype observée entre les plantules transgéniques MIF2^{OE} décrites par Hu *et al*. (2011) et celles que nous avons générées au cours de cette étude. Cependant, parmi les hypothèses que nous pouvons avancées, la nature de l'antibiotique de sélection utilisé pour le criblage des plantes transformées qui n'est pas le même entre les plantes générées par Hu *et al*. (hygromycine) et nos plantes MIF2^{OE} pour lesquelles nous avons utilisé la kanamycine. Par ailleurs, il existe certainement des différences dans les conditions de culture qui peuvent affecter le phénotype. Cependant, nous n'avons pas assez d'informations sur les conditions de culture utilisées par Hu *et al*. (2011) pour conclure définitivement sur ces hypothèses. Malgré ces différences, nous avons pu observer que lors de la germination à la lumière, les plantules MIF2^{OE} se développent de la même manière que les plantules de type sauvage (**figure 38B**). Cependant, les plantules MIF2^{OE} présentent très rapidement un retard de développement car les feuilles de la première paire ne sont pas individualisées alors que celles de la plante de type sauvage sont déjà séparées. Ainsi, les plantes MIF2^{OE} présentent à l'obscurité une photomorphogenèse constitutive partielle montrant une similarité phénotypique supplémentaire avec les plantes mutantes *csn5a1*.

De plus, nous avons pu montrer que la condition lumineuse influe sur l'expression du gène *MIF2* et dans une moindre mesure, sur l'expression du gène *CSN5A* (**figure 38C** et **D**). Les ARNm du gène *MIF2*, peu exprimés dans les plantules ayant grandi à la lumière, sont détectés à un niveau quatre fois plus important dans les plantules ayant grandi à l'obscurité (**figure 38C, gauche**). Dans les plantules MIF2^{OE}, les transcrits correspondant au gène *MIF2* endogène et au transgène sont fortement exprimés à l'obscurité et à la lumière, 100 fois plus et 600 fois plus, respectivement par rapport à la plantule sauvage dans les mêmes conditions (**figure 38C, droite**). De plus, chez les plantules MIF2^{OE}, l'expression totale de *MIF2* est légèrement plus importante dans les plantules ayant germées à la lumière.

Ainsi, chez les plantes MIF2^{OE}, le profil d'expression du gène *MIF2* endogène en fonction de la condition lumineuse est inversé et la différence d'expression dans la condition obscurité par rapport à la condition lumière est moins marquée. Le gène *CSN5A* est légèrement moins exprimé lors d'une germination à la lumière par rapport à une germination à l'obscurité (-11%) mais cette différence ne semble pas très significative suggérant que l'expression de ce gène ne semble pas sensible à la différence d'intensité lumineuse (**figure 38D, gauche**). La surexpression du gène *MIF2* entraîne une légère augmentation de l'expression du gène *CSN5A*, 27% à l'obscurité et 16% à la lumière (**figure 38D, droite**). Cette faible variation d'expression du gène *CSN5A* suggére, une nouvelle fois, que la protéine MIF2 n'intervient pas dans la régulation de son expression.

Le signalosome est un élément essentiel à la répression de la photomorphogenèse à l'obscurité. En effet, il participe, *via* la sous-unité CSN1, au maintien de la protéine COP1 dans le noyau. Cette dernière va inhiber les facteurs de transcription responsables de l'activation des gènes de réponse à la lumière. Le signalosome, par son activité de déneddylation, est aussi impliqué dans la régulation de complexes ubiquitines-ligases, qui participent à la dégradation de ces facteurs de transcription, (**paragraphe III.4, chapitre introduction**). Ainsi, lorsqu'une des sous-unités du signalosome est déficiente dans sa fonction, la plantule à l'obscurité n'est plus capable de réprimer les gènes de réponse à la lumière, provoquant l'arrêt de croissance des hypocotyles et l'ouverture des cotylédons. Lorsque le gène *MIF2* est surexprimé, la croissance de l'hypocotyle à l'obscurité est identique à celle de la plante de type sauvage mais les cotylédons s'ouvrent comme en présence de lumière. Ces données suggèrent que la photomorphogenèse constitutive partielle des plantes MIF2^{OE} n'est nécessairement pas la conséquence de l'action de la protéine MIF2 sur la protéine CSN5A. Cependant, le mécanisme d'action de la protéine MIF2, dans la cellule, est d'interagir avec des partenaires protéiques. Le gène *MIF2* est exprimé chez la plante sauvage à l'obscurité, suggérant que la protéine MIF2 intervient dans le développement de la plantule à l'obscurité en interagissant avec des partenaires protéiques dont l'identité reste à préciser. Ainsi, en surexprimant le gène *MIF2*, les partenaires potentiels de la protéine MIF2 sont rapidement complexés si le ou les partenaire(s) ciblé(s) ne sont pas eux-mêmes surexprimés. Cette situation peut conduire aux altérations phénotypiques de faible intensité observées chez les plantes MIF2^{OE}.

La réponse à la lumière est intrinsèquement liée à la voie de réponse à l'auxine et aux gibbérellines (Collett, et al. 2000). Nous avons choisi d'aller plus loin dans la caractérisation du rôle de MIF2 dans la réponse à la lumière et dans ce but, d'observer quel rôle peut jouer MIF2 au carrefour de ces différentes voies de signalisation.

4. Rôle du gène *MIF2* dans la régulation des voies de signalisation aux phytohormones lors de la germination à l'obscurité.

Rôle du gène MIF2 dans la croissance de l'hypocotyle en réponse à l'auxine.

L'auxine, naturellement présente dans la plante, permet de promouvoir la croissance de l'hypocotyle. En revanche, un apport extérieur d'auxine entraîne un dépassement du seuil intrinsèque à la plante laquelle répond, à l'inverse, en inhibant la croissance de l'hypocotyle (Collett, et al. 2000). En effet, la plantule de type sauvage a une croissance inhibée en présence de 10 µM d'auxine puisque la croissance des hypocotyles diminue de 70% par rapport à la croissance en absence d'auxine (**figure 39A, gauche**). Les plantules MIF2^{OE} présentent une croissance de l'hypocotyle à l'obscurité qui est similaire à celle des plantules de type sauvage (**figure 38A et 39A**). L'ajout de 10 µM d'auxine entraîne une diminution

significative de la croissance de l'hypocotyle des plantules MIF2^{OE} mais cette diminution est moins importante (8%) que pour la croissance des plantules de type sauvage dans les mêmes conditions (**figure 39A, droite**). Ainsi, les plantules MIF2^{OE} sont insensibles à l'ajout exogène d'auxine, ce qui indique que la surexpression du gène *MIF2* inhibe la voie de réponse à l'auxine.

Afin de confirmer que l'inhibition de la réponse à l'auxine, lors de l'élongation de l'hypocotyle dans les plantules MIF2^{OE} est la conséquence de l'interaction des protéines MIF2 et CSN5, il serait intéressant d'analyser l'expression des gènes de réponse primaire à l'auxine. Les régulateurs transcriptionnels de la réponse à l'auxine, les protéines ARF sont inhibées en absence d'auxine par leur interaction avec les protéines Aux/IAA. Un stimulus auxinique provoque la dégradation des protéines Aux/IAA et la dimérisation des protéines ARF permettant l'activation des gènes de réponse à l'auxine. Parmi ces gènes, les gènes codant les protéines Aux/IAA sont rapidement induits (**paragraphe I.2, chapitre introduction**). Dans les plantules MIF1^{OE}, l'expression de dix gènes codant les Aux/IAA a été mesurée dans les plantules ayant été exposées à l'obscurité ou à la lumière (Hu and Ma 2006). Une diminution importante des expressions des gènes *Aux/IAA* étudiés, à l'obscurité, peut être observée, confirmant l'insensibilité des plantes MIF1^{OE} à l'auxine. Cependant, il est parfois difficile d'observer une régulation transcriptionnelle commune des gènes de réponse aux phytohormones. Par exemple, les gènes de réponse à l'auxine sont régulés de façon complexe en fonction des différentes combinaisons des régulateurs transcriptionnels, dont l'activité peut être régulée de manière tissu-spécifique ou en fonction du stade de développement (Varaud, et al. 2011). Cette régulation complexe s'applique aussi pour l'expression des gènes de réponse aux gibbérellines, qui provoque des réponses physiologiques antagonistes à celles décrites pour la réponse à la lumière.

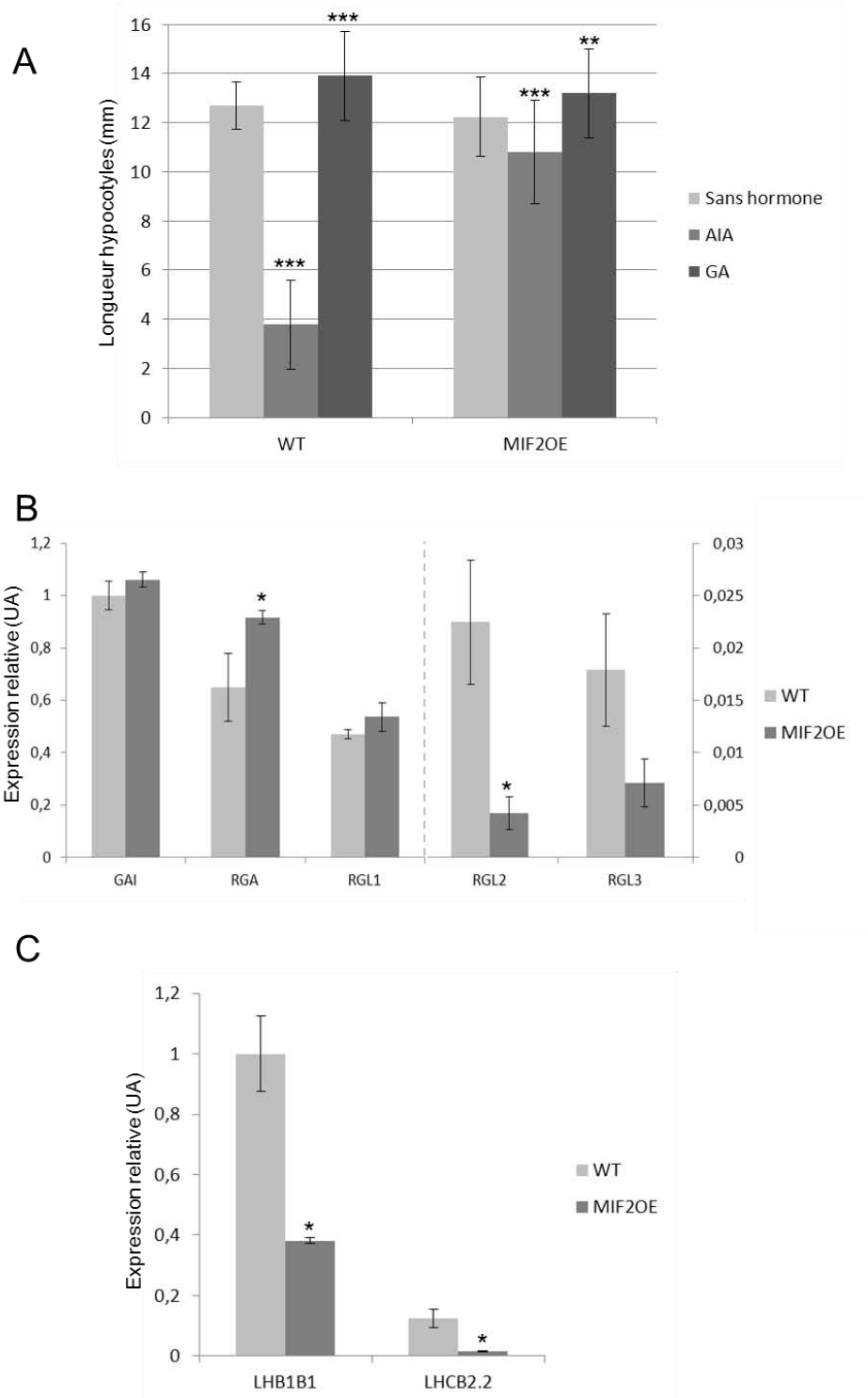


Figure 39: Réponse aux auxines (AIA) et aux gibbérellines (GA_3) lors de la croissance des plantules à l'obscurité.

(A) Mesure de la longueur des hypocotyles (en mm) des plantules WT et $MIF2^{OE}$ en présence de 10 µM d'AIA ou de 10 µM de GA_3. n= 40 pour chaque condition.

(B et C) L'expression est mesurée dans des plantules âgées de 7 jours ayant eu une croissance à l'obscurité. L'expression est normalisée par rapport à l'expression des gènes *EF1α* et *TUBULINE* et relative à l'expression du gène *GAI* (B) et *LHB1B1* (C) dans la plante WT (valeur =1). L'échelle de gauche en (B) correspond aux gènes *GAI*, *RGA* et *RGL1* et l'échelle de droite correspond aux gènes *RGL2* et *RGL3*. n= 3 pour chaque donnée d'expression.

Tests statistiques: *** p<0,001, ** p<0,01 et * p<0,05, variances égales.

Rôle du gène MIF2 dans la croissance de l'hypocotyle en réponse aux gibbérellines.

Les gibbérellines participent aussi à la croissance de l'hypocotyle, mais à l'inverse de l'auxine, l'ajout exogène de gibbérellines entraîne une saturation de la réponse mais pas d'effet inhibiteur (Cowling and Harberd 1999). Au niveau moléculaire, le rôle des gibbérellines dans la croissance de l'hypocotyle a été caractérisé par l'interaction des protéines DELLA et PIF. A l'obscurité, les gibbérellines induisent la transcription des gènes *DELLA* (*GAI*, *RGA*, *RGL1-3*) en même temps que la dégradation des protéines correspondantes par le système protéasome-signalosome. Les protéines DELLA, ainsi dégradées, permettent aux protéines PIF d'induire les gènes intervenant dans l'élongation de l'hypocotyle tout en réprimant les gènes de réponse à la lumière (Cheminant, et al. 2011). Récemment, il a été montré qu'une partie minoritaire des protéines DELLA n'est pas dégradée à l'obscurité et permet ainsi de lever temporairement l'inhibition des protéines PIF sur les gènes de réponse à la lumière. Ce mécanisme permet de préparer la plantule à son passage à la lumière et d'éviter tout dommage photo-oxydatif (Cheminant, et al. 2011). Parmi les gènes de réponse à la lumière ou gènes photosynthétiques, il y a des gènes codant des protéines se fixant à la chlorophylle, *LHB1B1* et *LHCB2.2* (LIGHT-HARVESTING CHLOROPHYLL-PROTEIN COMPLEX). Le gène *LHB1B1* est une cible directe des protéines PIF qui répriment son expression (Leivar, et al. 2009).

En présence de 10 µM de gibbérellines (GA_3), les plantules de type sauvage grandissent d'environ 10% de plus qu'en absence de GA_3 (**figure 39A, gauche**). Les plantules $MIF2^{OE}$ présentent également un allongement de 8% suite à l'apport exogène de GA_3 indiquant que les plantes $MIF2^{OE}$ répondent vraisemblablement aux gibbérellines de manière identique à la plante de type sauvage (**figure 39A, droite**). Les protéines DELLA ont des rôles tissu-spécifique, souvent en accord avec l'expression spatiale de leurs gènes correspondants. Ainsi, les protéines GAI et RGA sont les acteurs majeurs de la réponse aux gibbérellines durant la croissance végétative et l'induction florale alors que les protéines RGA, RGL1 et RGL2 agissent de concert afin de moduler le développement floral (Fleet and Sun 2005). Les expressions de quatre gènes *DELLA* chez les plantules $MIF2^{OE}$ sont modifiées par rapport à celles des gènes correspondants chez les plantules de type sauvage. En effet, l'expression des gènes *RGA* et *RGL1* dans les plantules $MIF2^{OE}$ est augmentée de 41% et 14%, respectivement. A l'inverse, l'expression des gènes *RGL2* et *RGL3* diminue de 81% et 60%, respectivement (**figure 39B**). Ce sont donc les gènes *DELLA* spécifiquement impliqués dans le développement floral dont les expressions sont modifiées dans les plantules $MIF2^{OE}$. Cependant, la variation d'expression des gènes *DELLA* dans les plantules $MIF2^{OE}$ ne permet pas de dégager une règle commune permettant d'expliquer l'effet de la surexpression du gène *MIF2* sur la régulation transcriptionnelle des gènes

DELLA. Ces éléments reflètent la complexité des mécanismes de régulation impliqués dans l'expression des gènes de réponse aux gibbérellines. De plus, il a souvent été souligné que le niveau d'expression des gènes *DELLA* n'est pas nécessairement corrélé à la quantité de protéines présentes dans la cellule du fait de la labilité des protéines DELLA. En revanche, les expressions des deux gènes photosynthétiques, *LHB1B1* et *LHCB2.2* sont fortement diminuées (-61% et -87% respectivement) dans les hypocotyles des plantules MIF2^{OE} par rapport aux expressions de ces gènes dans les plantules de type sauvage (**figure 39C**). Ces résultats suggèrent que, dans les plantules MIF2^{OE}, les protéines PIF répriment de manière plus importante l'expression de ces gènes photosynthétiques. Le niveau d'inhibition que les protéines PIF exercent sur l'expression des gènes photosynthétiques, suggère que la faible proportion de protéines DELLA capables d'inhiber l'activité des protéines PIF, n'est plus disponible. La diminution de la quantité des protéines DELLA peut s'expliquer par deux phénomènes, soit par une diminution de leur synthèse, soit par une augmentation de leur dégradation. Une diminution de leur production peut s'expliquer par une diminution de la transcription des gènes correspondants, normalement induits en présence de gibbérellines. En effet, la surexpression du gène *MIF2* entraîne une diminution de l'expression des gènes *RGL2* et *RGL3* mais provoque aussi l'augmentation de l'expression du gène *RGA* (**figure 39B**). Or la protéine RGA est impliquée dans la croissance végétative alors que ce n'est pas le cas des protéines RGL2 et RGL3 (Fleet and Sun 2005). Il semble donc exclu que la différence de régulation transcriptionnelle des gènes photosynthétiques, soit due à une diminution de la synthèse des protéines DELLA. L'autre hypothèse serait que l'augmentation de la dégradation des protéines DELLA est responsable de ce phénomène suggérant une réponse plus importante des plantes MIF2^{OE} aux gibbérellines. Cette hypothèse suppose que le signalosome n'est pas inhibé en présence d'une quantité importante de la protéine MIF2. Cependant, cette hypothèse est à nuancer car le signalosome ne semble pas être indispensable à la dégradation des protéines DELLA, notamment, de la protéine RGA (Dohmann, et al. 2010, **paragraphe III.2, chapitre introduction**) et nécessite de vérifier les quantités des protéines DELLA dans les plantules MIF2^{OE} à l'obscurité.

L'ensemble de ces résultats indiquent que les plantules MIF2^{OE} répondent, en absence de lumière, aux gibbérellines de la même manière que les plantules de type sauvage (**figure 39A**) et semblent être hypersensibles aux gibbérellines endogènes (**figure 39C**). Ces informations indiquent que la protéine MIF2 n'inhibe pas le signalosome dans la réponse aux gibbérellines lors de la croissance de l'hypocotyle à l'obscurité. Pourtant un des principaux phénotypes des plantes MIF2^{OE} adultes est un verdissement très prononcé des feuilles de rosette. Ce phénotype peut être rapproché du phénotype des mutants de la voie de signalisation des gibbérellines (Fleet and Sun 2005).

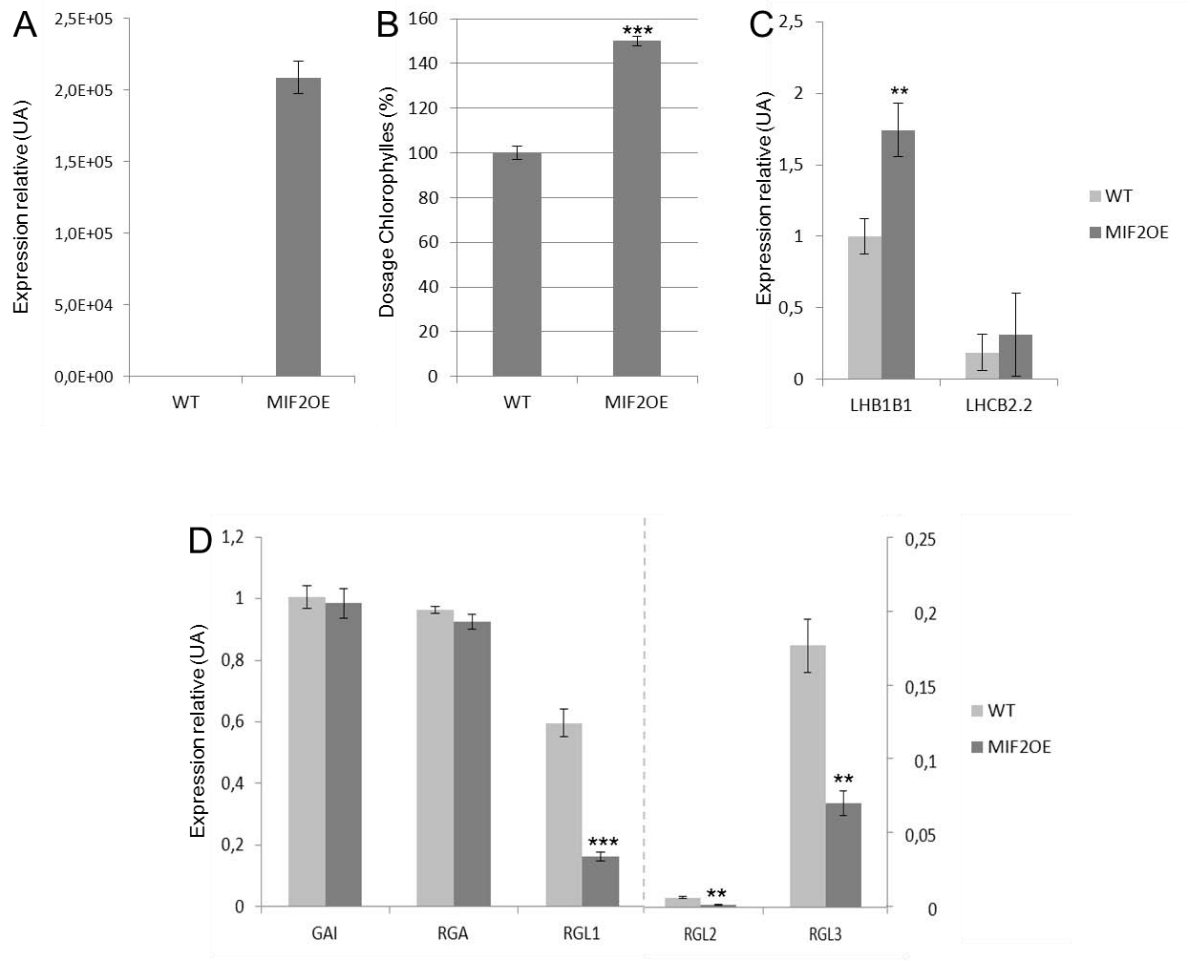


Figure 40: Caractéristiques des plantes MIF2^{OE} à la lumière lors de la réponse aux gibbérellines.

(A) L'expression du gène *MIF2* est mesurée dans les feuilles de rosette des plantes adultes. L'expression est normalisée par rapport à l'expression des gènes *EF1α* et *TUBULINE* et relative à l'expression du gène *MIF2* dans la plante WT (valeur =1).

(B) Les chlorophylles ont été extraites de 3 échantillons indépendants contenant des fragments de 10 mg de 3 feuilles de rosette. Les valeurs correspondent au contenu total en chlorophylles (chlorophylle A et chlorophylle B). La quantité de chlorophylles est fixée à 100% chez la plante WT.

(C et D) L'expression est mesurée dans les feuilles de rosette. L'expression est normalisée par rapport à l'expression des gènes *EF1α* et *TUBULINE* et relative à l'expression du gène *LHB1B1* (C) et *GAI* (D) dans la plante WT (valeur =1). L'échelle de gauche en (D) correspond aux gènes *GAI, RGA* et *RGL1* et l'échelle de droite aux gènes *RGL2* et *3*. n= 3 pour chaque donnée d'expression.

Tests statistiques: *** p<0,001, ** p<0,01 et * p<0,05, variances égales.

Il suggère que les plantes MIF2^{OE}, au stade adulte, sont insensibles à l'action des gibbérellines. La caractérisation de ce phénotype fait l'objet du paragraphe suivant.

5. Rôle du gène *MIF2* dans la régulation de la voie de signalisation des gibbérellines lors de la réponse à la lumière.

Les gibbérellines et le stimulus lumineux ont un effet antagoniste sur le développement de la plante, le premier provoquant l'élongation de l'hypocotyle et le second inhibant cette élongation, initiant l'ouverture des cotylédons et la mise en place de la photosynthèse. Sous l'effet d'un signal lumineux, les protéines DELLA piègent les protéines PIF en interagissant avec elles au niveau de leur domaine d'interaction avec l'ADN. Ainsi, les gènes impliqués dans l'élongation de l'hypocotyle ne sont plus activés et les gènes photosynthétiques ne sont plus inhibés. De plus, le stimulus lumineux provoque une diminution de l'expression des gènes de biosynthèse des gibbérellines et une augmentation de l'expression des gènes qui inactivent les gibbérellines afin de diminuer la quantité de gibbérellines disponible (Alabadi, et al. 2008).

Les plantes MIF2^{OE} présentent un verdissement prononcé au niveau de la rosette (**figure 2, article** et **figure 35B**) associé à une diminution de taille des feuilles de rosette. Ces phénotypes sont caractéristiques de mutants présentant une inhibition de la synthèse des gibbérellines ou un défaut dans la voie de réponse aux gibbérellines. Dans les feuilles des plantes MIF2^{OE}, le gène *MIF2* est fortement surexprimé alors qu'il n'est pas du tout exprimé dans la feuille de la plante de type sauvage (**figure 40A**). Le verdissement plus important des feuilles de rosette est associé à une augmentation de 50% du contenu en chlorophylles (**figure 40B**). L'accumulation plus importante de chlorophylles est corrélée à une augmentation de l'expression des gènes photosynthétiques, notamment le gène *LHB1B1* dont l'expression augmente de 75% (**figure 40C**). L'augmentation de la transcription des gènes photosynthétiques est certainement liée à une levée d'inhibition exercée par les protéines PIF, les protéines PIF étant piégées par les protéines DELLA. Alors que les gènes *GAI* et *RGA* ne présentent pas de différence d'expression entre les plantes de type sauvage et les plantes MIF2^{OE}, les gènes *RGL1*, *2* et *3* sont moins exprimés dans les feuilles des plantes MIF2^{OE} par rapport aux plantes de type sauvage (**figure 40D**). En effet, l'expression des gènes *RGL1*, *RGL2* et *RGL3* est diminuée de 60 à 70% dans les feuilles des plantes MIF2^{OE}. Il y a donc une tendance commune pour trois des gènes *DELLA* dont l'expression est diminuée en réponse à la surexpression du gène *MIF2*. Ces données suggèrent que la voie de biosynthèse des gibbérellines est moins active dans les feuilles des plantes MIF2^{OE}, ce qui peut entraîner le phénotype «vert foncé» des feuilles des plantes surexpresseurs de *MIF2*. Afin de confirmer que la voie de biosynthèse des gibbérellines est altérée dans les plantes MIF2^{OE}, l'expression des gènes impliqués dans cette voie doit être analysée.

De plus, il serait intéressant d'évaluer la quantité de protéines DELLA au niveau des feuilles des plantes MIF2^{OE} afin de déterminer si la voie de signalisation aux gibbérellines est modifiée par la surexpression de la protéine MIF2, au travers de son interaction avec la protéine CSN5.

L'étude de la réponse aux gibbérellines des plantes MIF2^{OE} dans deux organes différents et dans des conditions environnementales différentes, a permis de mettre en évidence deux mécanismes de régulation différents. Ces différences peuvent être liées au niveau d'expression du gène *MIF2* dans ces organes (hypocotyle ou feuilles de rosette) ou dans les conditions testées (lumière ou obscurité) (**figure 38C**). Cependant, nous avons montré que la surexpression du gène *MIF2* n'entraîne pas d'inhibition de croissance de l'hypocotyle comme cela est pourtant le cas pour les plantules MIF1^{OE} et les plantules *csn5a1* (Hu and Ma 2006, Dohmann, et al. 2005). Sachant que la croissance des hypocotyles est hautement régulée par la réponse à deux phytohormones, l'auxine et les gibbérellines, nous avons étudié les voies de réponse aux auxines et gibbérellines dans la croissance de l'hypocotyle. Les résultats obtenus indiquent en accord avec les résultats précédemment décrits (**paragraphe I.4**), que les plantules MIF2^{OE} ne sont pas capables d'activer la voie de réponse à l'auxine (**figure 39A**), certainement à cause de l'interaction des protéines MIF2 et CSN5A. En revanche, les plantules MIF2^{OE} semblent répondre à la présence des gibbérellines (**figure 39**), réponse se traduisant par la croissance de l'hypocotyle à l'obscurité. En effet, Collett *et al*. (2000) ont montré que le rôle de l'auxine dans la croissance des hypocotyles est indépendant de celui des gibbérellines. Ainsi, dans cette étude, l'apport exogène de gibbérellines provoque l'élongation de l'hypocotyle même si la voie de signalisation de l'auxine est bloquée (Collett, et al*.* 2000). Ces éléments suggèrent que la protéine MIF2, bien qu'elle inhibe l'activité de la protéine CSN5A, n'intervient pas de la même manière dans la régulation des diverses voies de signalisation dans lesquelles le signalosome intervient. A l'inverse, le phénotype des feuilles de rosette des plantes MIF2^{OE} est clairement associé à une insensibilité des plantes aux gibbérellines (**figure 40**). Pour confirmer cette hypothèse, il est nécessaire de vérifier si l'insensibilité des feuilles de rosette aux gibbérellines provient d'une inhibition de la protéine MIF2 sur la protéine CSN5A, comme nous l'avons montré dans le cas de la réponse à l'auxine.

La situation décrite précédemment ne peut être considérée comme physiologique puisque le gène *MIF2* est exprimé de façon ectopique. Cependant, la diversité des réponses provoquée par la surexpression du gène *MIF2* souligne la spécificité d'action de la protéine MIF2 dans de nombreux processus développementaux. Il faut rappeler que la protéine MIF2 a une action au travers de son interaction avec la protéine CSN5 mais aussi de ses

interactions avec les protéines ZHD. Lors de la surexpression du gène *MIF2*, la protéine MIF2 est présente en plus grande quantité que chez la plante de type sauvage mais si cette surexpression n'est pas accompagnée par la surexpression des partenaires protéiques de MIF2, il est probable qu'elle n'aura pas d'effets au niveau phénotypique, ce qui est, par exemple, le cas pour l'hypocotyle se développant à l'obscurité. En revanche, la surexpression du gène *MIF2* dans des organes ou tissus dans lesquels des protéines sont susceptibles d'interagir de façon non spécifique avec la protéine MIF2 peut entraîner une réponse différente, ce qui est vraisemblablement le cas dans la feuille de rosette à la lumière. Un argument supplémentaire concerne l'étude d'Hong *et al.* (2011) qui a révélé l'effet modulateur de la protéine MIF1 sur l'activité du régulateur transcriptionnel ZHD5. Cette équipe a également mis en évidence l'interaction de la protéine MIF2 avec huit des treize protéines ZHD présente chez *Arabidopsis thaliana* suggérant que la protéine MIF2 puisse agir sur l'activité de ces régulateurs transcriptionnels

.

III Etude préliminaire des interactions génétiques et protéiques entre *MIF2* et *ZHD*.

1. Régulation transcriptionnelle.

L'équipe de Hong *et al*. (2011) a démontré deux aspects de la régulation de la protéine MIF1 sur la protéine ZHD5, l'une en empêchant ZHD5 d'être localisé dans le noyau, l'autre en inhibant l'interaction de ZHD5 avec ses séquences promotrices cibles. En effet, les protéines ZHD semblent interagir spécifiquement avec une séquence consensus de vingt nucléotides contenant le motif «ATTA». De plus, les protéines ZHD forment en s'associant entre elles des hétérodimères afin de réguler la transcription des gènes cibles. Cependant, l'étude de Hong *et al*. n'a pas permis de mettre en évidence une régulation transcriptionnelle du gène ZHD5 par la protéine MIF1 et inversement de la protéine ZHD5 sur le gène *MIF1*. Ces données indiquent que la régulation exercée par la protéine MIF1 sur la protéine ZHD5 s'effectue uniquement à un niveau post-traductionnel et que la protéine ZHD5, malgré son activité de régulateur transcriptionnel, n'agit pas sur l'expression du gène *MIF1*.

Les données obtenues par Hong *et al*. ne présume en rien de l'implication de la protéine MIF2 dans la régulation des gènes *ZHD* et inversement des protéines ZHD sur le gène *MIF2*. Pour tester cette hypothèse, nous avons cherché, dans un premier temps, s'il existait une régulation transcriptionnelle entre la protéine MIF2 et certaines protéines ZHD.

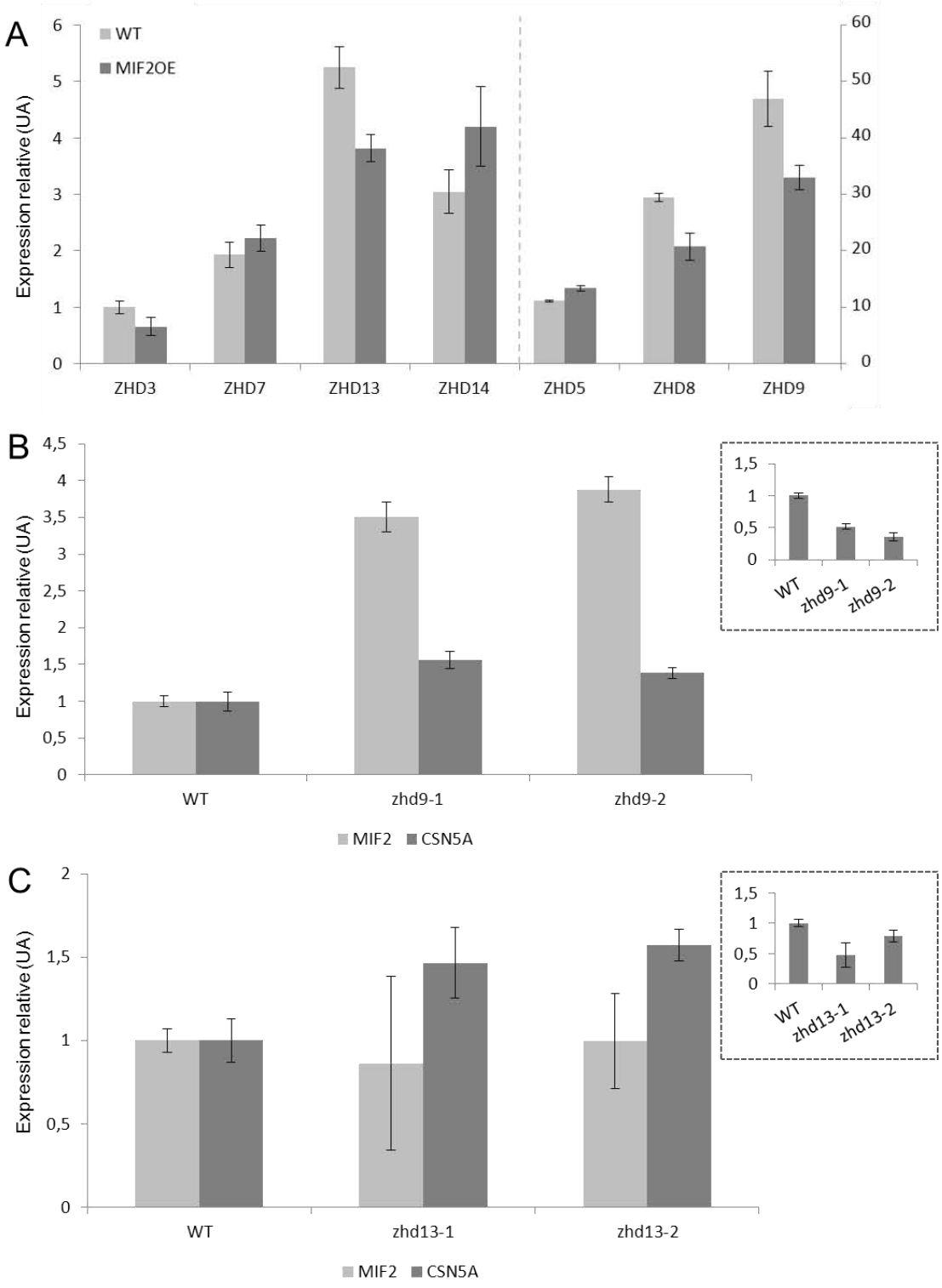


Figure 41: Expression des gènes *ZHD* chez les plantules de 7 jours WT et MIF2^{OE} (A) et des gènes *MIF2* et *CSN5A* dans des lignées mutées pour les gènes *ZHD9* (B) et *ZHD13* (C).

L'expression est normalisée par rapport à l'expression des gènes *EF1α* et *TUBULINE* et relative à l'expression du gène *ZHD3* dans la plante WT (A) et du gène *MIF2* dans la plante WT (B et C) (valeur =1). L'échelle de gauche en A correspond aux gènes ZHD3, 7, 13 et 14 alors que l'échelle de droite correspond aux gènes ZHD5, 8 et 9. Les encadrés en B et C montrent le niveau d'extinction des gènes *ZHD9* (B) et *ZHD13* (C) dans les différentes lignées.

La surexpression du gène *MIF2*, entraîne quelques variations de l'expression de certains des gènes *ZHD* mais les différences observées sont faibles, s'échelonnant de 15 à 35% par rapport à la plante de type sauvage (**figure 41A**). Il est intéressant de noter que cette étude préliminaire a été réalisée chez des plantules âgées de 7 jours de plantes de type sauvage dans lesquelles l'expression des gènes *ZHD* n'est pas prédominante. L'expression du gène *MIF2* a été évaluée dans des plantules âgées de sept jours de deux lignées de mutants d'insertion pour les gènes *ZHD9* et *ZHD13* obtenues à partir du NASC (**chapitre Matériels et Méthodes**). Les graines de ces quatre différentes lignées ont été semées sur l'agent de sélection nous permettant de récupérer une population de plantules, hémi- ou homozygotes pour la mutation, exprimant différentiellement les gènes *ZHD9* et *ZHD13*. Aucune plante de ces lignées n'a été caractérisée à ce jour et les résultats de la **figure 41** ont été obtenus à partir de ces populations hétérogènes. Les lignées *zhd9-1* et *zhd9-2* présentent toutes deux une diminution globale de l'expression du gène *ZHD9* de 50% et 65% respectivement (**figure 41B, encadré**). De façon intéressante, l'expression du gène *MIF2* dans les lignées *zhd9-1* et *zhd9-2* augmente de façon importante de 250% et 290% respectivement alors que l'expression du gène *CSN5A* augmente plus modérément, de 50% et 40% (**figure 41B**). Les lignées *zhd13-1* et *zhd13-2* présentent une diminution de l'expression du gène *ZHD13* de 50% et 20%, respectivement (**figure 41C, encadré**). Cependant, l'expression du gène *MIF2* dans ces lignées est nettement moins altérée puisqu'elle subit une diminution de 13% dans la lignée *zhd13-1* et aucune modification dans la lignée *zhd13-2* (**figure 41C**). En revanche, l'expression du gène *CSN5A* augmente de 45% et 55% dans les lignées *zhd13-1* et *zhd13-2*, respectivement (**figure 41C**).

Ces mesures préliminaires nous permettent de dégager des pistes intéressantes. En effet, bien que la protéine MIF2, comme la protéine MIF1, ne semble pas être impliquée dans la régulation transcriptionnelle des gènes *ZHD*, les lignées *zhd9* présentent une forte induction de l'expression du gène *MIF2* suggérant que la protéine ZHD9 est impliquée dans la régulation transcriptionnelle du gène *MIF2*. Cependant, la caractérisation des plantes mutantes *zhd9* sera nécessaire pour confirmer ces données. Si cette régulation est confirmée, il serait intéressant de rechercher l'identité de la protéine participant à la régulation transcriptionnelle du gène *MIF2* en interagissant avec la protéine ZHD9.

2. Interaction entre les protéines MIF2 et CSN5.

Nous avons testé *in cellulo* l'interaction entre les protéines MIF2 et ZHD5. Le choix de ZHD5 a été guidé par les résultats de l'étude de Hong *et al*. (2011), qui a montré que la protéine ZHD5 est la seule protéine ZHD pour laquelle une interaction avec une protéine MIF a été démontrée *in cellulo* et que la protéine ZHD5 ne peut plus être localisée dans le noyau

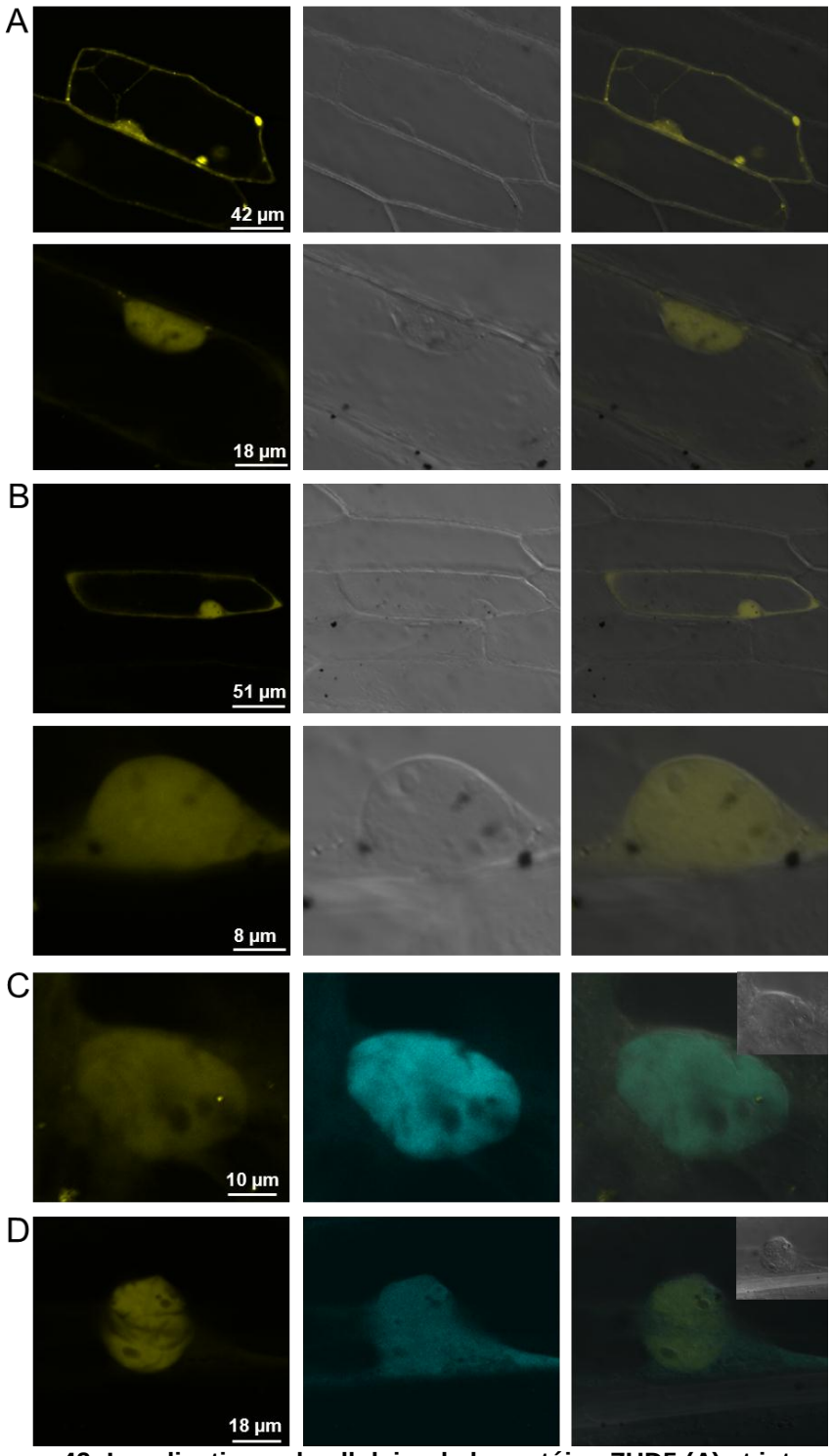


Figure 42: Localisation subcellulaire de la protéine ZHD5 (A) et interactions des protéines MIF2, ZHD5 et CSN5 (B à D) dans des cellules d'épiderme d'oignon.

Localisation de la protéine ZHD5 (A) et du complexe MIF2-ZHD5 (B). La colonne de gauche correspond aux acquisitions du signal YFP, la colonne du milieu correspond aux acquisitions en lumière transmise et à droite, la superposition des deux premières images.

Localisation du complexe MIF2-ZHD5 en présence de la protéine CSN5A-CFP (C) et localisation du complexe MIF2-CSN5A en présence de la protéine ZHD5-CFP (D). La colonne de gauche correspond aux acquisitions du signal YFP, la colonne du milieu correspond aux acquisitions du signal CFP et à droite, la superposition des deux premières images. L'image en haut à droite de la colonne de droite correspond aux acquisitions en lumière transmise.

en présence de la protéine MIF1 rappelant l'effet de la protéine MIF2 sur la localisation de la protéine CSN5.

Hong *et al*. (2011) ont montré que la protéine ZHD5 est localisée principalement dans le noyau que ce soit dans des protoplastes d'Arabidopsis ou dans des cellules d'épiderme d'oignon. Nos observations montrent que la protéine ZHD5 d'*Arabidopsis thaliana* est une protéine localisée à la fois dans le noyau et dans le cytoplasme, comme en témoigne les travées cytoplasmiques, dans un système hétérologue d'épiderme d'oignon (**figure 42A**). Les expériences de BiFC visant à révéler l'interaction entre les protéines MIF2 et ZHD5 montrent une distribution de la fluorescence identique à celle de la protéine ZHD5 (**figure 42B**). En effet, le signal fluorescent associé à l'interaction des protéines MIF2 et ZHD5 est détecté dans le noyau et dans le cytoplasme. Alors que la protéine MIF1 est capable d'empêcher la protéine ZHD5 d'être localisée dans le noyau et que la protéine MIF2 agit de même sur la localisation de la protéine CSN5, aucun effet de changement de localisation n'est observé lors de l'interaction des protéines MIF2 et ZHD5. Ces éléments indiquent qu'il existe certainement une spécificité d'action des protéines MIF sur des protéines cibles telles que les protéines ZHD et la protéine CSN5. Il existe deux exemples connus à ce jour pour lesquels les protéines MIF modulent la localisation des protéines avec lesquelles elles interagissent. Cependant, la fonction qu'exercent les protéines MIF sur leurs partenaires ne semble pas être interchangeable puisque la protéine MIF2 n'agit pas de la même manière que la protéine MIF1 sur la localisation de la protéine ZHD5.

Par ailleurs, lors des expériences de BiFC, nous testons les huit combinaisons possibles correspondant aux fusions en N- ou C-terminal des protéines testées des deux moitiés N- ou C-terminales de la YFP. Quatre sur ces huit combinaisons ont permis de mettre en évidence l'interaction des protéines MIF2 et ZHD5 dans les expériences de BiFC. Parmi ces quatre combinaisons, deux permettent de visualiser un signal de fluorescence dans un nombre important de cellules.

Pour les deux autres combinaisons, le signal plus faible ne concerne qu'un nombre limité de cellules. Ainsi, deux combinaisons fonctionnent mieux que les autres lors des expériences de BiFC, ces combinaisons sont représentées dans le **schéma 2** ci-dessous.

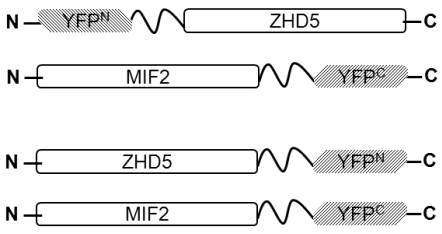


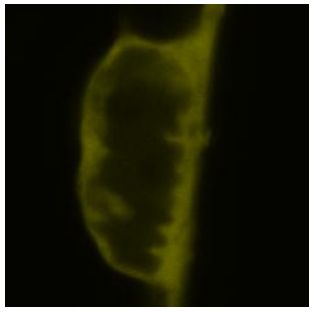
Schéma 2: Constructions ayant donné un signal positif en BiFC pour l'interaction des protéines ZHD5 et MIF2.

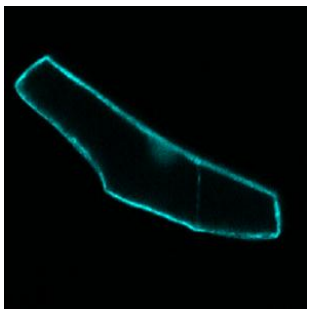
Ces deux combinaisons se caractérisent par la fusion de la portion de la protéine YFP à l'extrémité C-terminale de la protéine MIF2. A l'inverse, une seule combinaison a conduit à un signal fluorescent lors des expériences de BiFC pour les protéines MIF2 et CSN5A (**schéma 1**, **paragraphe I.3**). Dans cette combinaison, la protéine MIF2 est fusionnée à son extrémité N-terminale avec la portion de la protéine YFP. Les deux protéines ZHD5 et CSN5 ont une masse moléculaire de 33 et 39 kDa, respectivement, qui devrait générer un encombrement stérique similaire. Ces arguments suggérent que la protéine MIF2 n'interagit pas avec les protéines ZHD5 et CSN5A avec les mêmes régions de la protéine MIF2 et, que le motif doigt à zinc n'est pas sollicité de la même manière pour ces interactions.

Nous avons co-exprimés les trois protéines MIF2, ZHD5 et CSN5A dans des cellules d'épiderme d'oignon afin de voir s'il existait un phénomène de compétition lors de leurs interactions respectives. Le complexe MIF2-ZHD5 colocalise avec la protéine CSN5A-CFP principalement dans le noyau (**figure 42C**). La présence de la protéine CSN5A ne semble perturber ni l'association des protéines MIF2 et ZHD5 ni la localisation subcellulaire de ces protéines. Le complexe MIF2-CSN5A colocalise avec la protéine ZHD5-CFP uniquement dans le noyau alors que cette dernière est aussi localisée dans le cytoplasme (**figure 42D**). De façon surprenante, le signal fluorescent associé au complexe MIF2-CSN5A, normalement détecté uniquement dans le cytoplasme (**figure 32D**), est localisé spécifiquement dans le noyau en présence de la protéine ZHD5. La protéine ZHD5-CFP ne semble pas perturber l'interaction des protéines MIF2-CSN5A mais modifie la localisation du complexe formé par ces deux protéines. Il est important de noter que ces expériences de co-transformation sont réalisées de sorte à avoir une expression forte et constitutive des trois protéines, elles ne reflètent en rien la stœchiométrie existante dans la plante qui doit, elle-même, être différente selon les tissus.

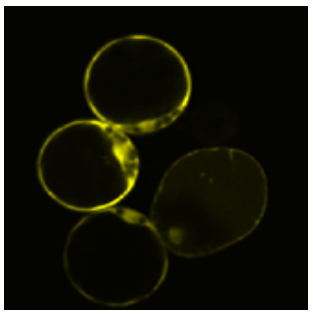
Ces expériences préliminaires nous permettent d'apercevoir le réseau dans lequel peut participer la protéine MIF2 mais nous n'en sommes qu'aux prémices du rôle du gène *MIF2* dans ce réseau. De plus, même si l'interaction des protéines MIF2 et ZHD5 a été démontré *in vitro* (Hong, et al. 2011) et *in cellulo* (BiFC), rien n'indique que, dans la plante, la protéine ZHD5 soit une cible préférentielle de la protéine MIF2 parmi les treize protéines ZHD découvertes chez Arabidopsis.

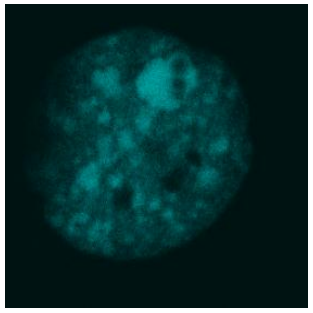






DISCUSSION, PERSPECTIVES







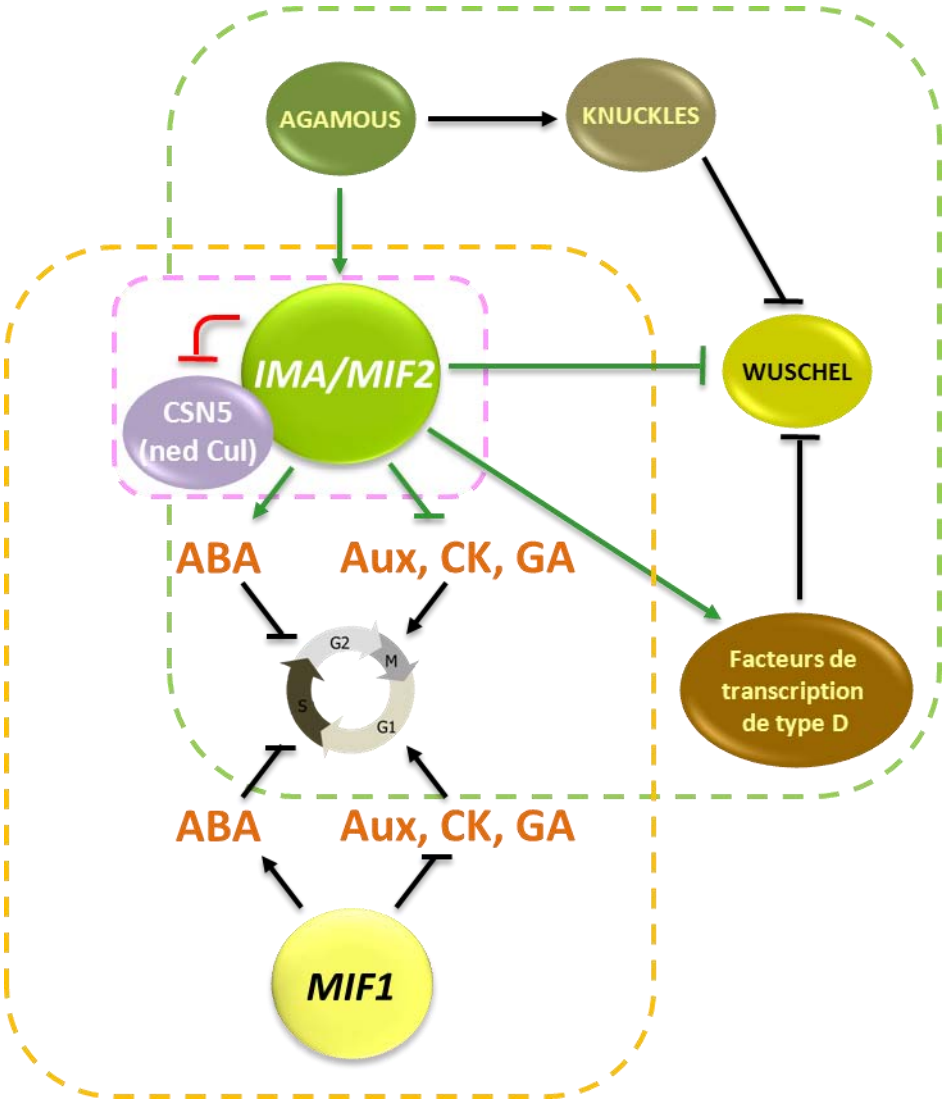


Figure 43: Bilan des données acquises sur le rôle des gènes *MIF in planta* au début de mon projet de thèse.

Le groupe encadré en pointillés vert désigne les données obtenues sur le rôle du gène *IMA* dans la terminaison florale chez la tomate. Le groupe encadré en pointillés jaune correspond au rôle des gènes *MIF1* et *IMA/MIF2* dans les voies de signalisation hormonales chez la tomate et chez *Arabidopsis thaliana*. Le groupe encadré de pointillés rose présente la découverte de l'interaction des protéines IMA/MIF2 et CSN5.

Les flèches noires représentent des données issues de la littérature, citée dans le manuscrit. Les flèches vertes correspondent aux données issues de la publication Sicard *et al*., 2008. La flèche rouge présente le rôle présumé de la protéine IMA/MIF2 sur la protéine CSN5 par rapport à la description des phénotypes des plantes IMA^{OE} de tomate et des plantes mutantes *csn5a1* d'Arabidopsis et constitue le point de départ de ce projet.

DISCUSSION, PERSPECTIVES

I Etat des lieux des connaissances concernant les gènes *MIF* en 2008.

En 1996, une étude visant à identifier des gènes préférentiellement exprimés durant les phases de développement précoce du fruit de Tomate, a conduit à l'isolement d'un clone ADNc appelé LeD40 (Lycopersicon esculentum Division phase clone 40). L'analyse de l'expression du gène correspondant a mis en évidence une forte accumulation des transcrits dans les tissus du fruit au cours des phases de division et dans les organes floraux. La caractérisation du gène *LeD40* a permis de l'identifier comme un acteur majeur dans les processus de terminaison florale et de développement du fruit et a amené le laboratoire à dénommer ce gène *Inhibitor of Meristem Activity* (*IMA*).

Le mécanisme principal mettant fin au statut indéterminé du méristème est l'extinction de l'expression du gène *WUS*, élément primordial pour spécifier aux cellules qui l'expriment leur identité de cellules souches. Par conséquent, l'expression du gène *WUS* est inhibée lors des processus de terminaison florale par l'activation de l'expression du gène *KNU* par la protéine AGAMOUS. De plus, la protéine AG se fixe sur le promoteur du gène *KNU* (Sun, et al. 2009) mais également sur celui du gène *MIF2* chez Arabidopsis (Sicard 2007) afin de réguler positivement l'expression des gènes *KNU* et *MIF2*. De façon intéressante, la protéine IMA participe également à l'extinction de l'expression de *SlWUS* (Sicard, et al. 2008b). Les mécanismes d'action des protéines KNU et IMA/MIF2 sur l'expression de *WUS* ne sont pas encore élucidés. De plus, Sicard *et al*. (2008) a montré que le gène *IMA* est fortement exprimé dans les primordia d'ovules. Ainsi, l'induction de l'expression des gènes de la fonction D dans les ovules par le gène *IMA* succède à l'inhibition du gène *SlWUS* au centre du méristème floral. Ainsi, l'activation de l'expression du gène *IMA* par l'action d'AG suivie de l'inhibition de *WUS* et de l'expression des gènes de la fonction D, conduit à la formation d'un méristème floral, prêt pour les processus de fécondation et de formation du fruit (**figure 43, en vert**).

La surexpression du gène *IMA* chez la tomate et celle du gène *MIF1* chez Arabidopsis ont modifié la capacité des plantes à répondre à certaines phytohormones. En effet, les plantes IMA^{OE} (Sicard, et al. 2008) et $MIF1^{OE}$ (Hu and Ma 2006) sont insensibles à l'ajout d'auxine, de gibbérellines, de cytokinines, de brassinostéroïdes et d'éthylène et, à l'inverse, sont hypersensibles à la présence d'acice abscissique (Sicard 2007) (**figure 43, en jaune**). De plus, les plantes IMA^{OE} et $MIF1^{OE}$ présentent une photomorphogenèse constitutive indiquant leur incapacité à réprimer la réponse au signal lumineux en absence

de ce signal. Cependant les mécanismes par lesquels la protéine IMA peut intervenir dans la régulation de ces diverses voies de signalisation sont inconnus. En revanche, l'interaction de la protéine IMA/MIF2 avec la protéine CSN5 a permis d'élucider, en partie, le mécanisme d'action de la protéine IMA/MIF2 (**figure 43, en rose**).

II IMA/MIF2, une protéine adaptatrice modulant l'activité du signalosome ?

1. Mécanismes d'interaction des protéines IMA/MIF2 et CSN5.

La découverte de l'interaction *in vitro* des protéines IMA/MIF2 et CSN5 ainsi que la similarité des phénotypes des plantes IMA^{OE} et des plantes mutantes *csn5a* ont conduit à l'hypothèse que la protéine IMA/MIF2 perturbait l'activité de la protéine CSN5 et, de ce fait, l'activité du complexe signalosome auquel CSN5 participe. Outre les phénotypes visibles liés à la perte de fonction de la protéine CSN5, une des caractéristiques principales des plantes mutantes *csn5a* est l'accumulation de cullines neddylées provoquant une défaillance dans la machinerie d'ubiquitinylation de substrats. Ainsi, l'accumulation de cullines neddylées dans des extraits protéiques de plantes d'Arabidopsis $MIF2^{OE}$ a permis d'amener un argument supplémentaire indiquant que la protéine MIF2 était impliquée dans l'inhibition de l'activité de la protéine CSN5 (**figure 2C, article**). Par la suite, nous avons cherché à identifier les caractéristiques de l'interaction entre les protéines IMA/MIF2 et CSN5 qui pouvaient mener à cette inhibition. Trois mécanismes différents mais non exclusifs ont été proposés. (1) IMA/MIF2 conduit à la dégradation de la protéine CSN5, (2) IMA/MIF2 séquestre la protéine CSN5 hors du noyau, lieu d'assemblage du complexe signalosome, et (3) IMA/MIF2 séquestre la protéine CSN5 dans le noyau, au sein ou au dehors du complexe signalosome.

(1) La stabilité de la protéine CSN5 en présence d'un excès de protéine IMA/MIF2 a été révélée par immunodétection (**figure 3A, article**). Ainsi, la protéine CSN5 ne semble pas être plus dégradée dans des extraits protéiques issus de plantes $MIF2^{OE}$ que dans des extraits protéiques issus de plante de type sauvage. Des études préliminaires indiquent que la stabilité de la protéine CSN5 semble être similaire dans des extraits protéiques de plantules de tomate surexprimant ou sous-exprimant le gène *IMA*. L'hypothèse d'une dégradation accrue de la protéine CSN5 due à la présence de la protéine IMA/MIF2 a donc été rapidement écartée.

(2) Les expériences de BiFC nous ont permis de confirmer l'interaction des protéines IMA/MIF2 et CSN5 *in cellulo* et d'observer la localisation subcellulaire du complexe. Alors que les deux protéines, IMA/MIF2 et CSN5, sont localisées toutes les deux dans le noyau, l'interaction de ces deux protéines provoque leur incapacité à être localisées dans le noyau

(**figure 3, article** et **figure 32**). Ainsi, la protéine IMA/MIF2 empêche la protéine CSN5 d'être localisée dans le noyau (**figure 44**). De façon intéressante, nous avons montré que la localisation de la protéine CSN5 pouvait être strictement cytoplasmique lorsque son domaine enzymatique, le domaine JAMM, était retiré de la protéine CSN5. Ces données suggèrent que la protéine MIF2 puisse interagir avec la protéine CSN5 au niveau de son site catalytique, essentiel à l'activité de déneddylation. Afin de confirmer cette hypothèse, des expériences de test ELISA ont été initiées afin de détecter de manière quantitative et relative l'interaction des protéines MIF2 et CSN5. Pour ce faire, les protéines MIF2 et CSN5A fusionnées à la protéine glutathion-S-transférase (GST) ont été produites en système hétérologue bactérien (**paragraphe IV.1, chapitre Matériels et Méthodes**). Cependant, il reste à produire les protéines MIF2 et CSN5A étiquetées avec le peptide 6xHistidine (His6) et les versions tronquées des protéines CSN5A étiquetées avec la protéine GST ou le peptide His6. Nous pourrons ainsi mesurer l'interaction de la protéine MIF2 avec les protéines tronquées correspondants à CSN5A par rapport à l'interaction de la protéine MIF2 avec la protéine CSN5A entière.

Le fait d'exclure la protéine CSN5 du noyau doit perturber l'assemblage du signalosome puisque la perte de fonction d'une sous-unité de ce complexe provoque des défauts d'assemblage résultant en la formation partielle des complexes signalosomes. (3) Afin d'évaluer l'intégrité du complexe signalosome, j'ai réalisé des expériences de chromatographie d'exclusion. Les conditions de séparation des masses protéiques devaient mener à l'identification des différents niveaux d'assemblage du signalosome. Cependant, des problèmes techniques ne nous ont pas permis de détecter les différentes sous-unités du signalosome et la protéine IMA/MIF2 dans les différentes fractions correspondant à des masses protéiques données. Cette expérience nécessite d'être poursuivie en enrichissant les extraits protéiques avant l'étape de chromatographie. Cet enrichissement des complexes protéiques pourra être réalisé en les immunoprécipitant à l'aide d'anticorps dirigés contre la protéine IMA/MIF2. Nous avons déjà générés des anticorps dirigés contre deux peptides communs aux protéines IMA et MIF2 (**paragraphe IV.7, chapitre Matériels et Méthodes**). Malheureusement, ces anticorps ne permettent pas de détecter les protéines IMA ou MIF2 *in planta*. Pour pallier à ce problème, nous avons généré des plantes d'Arabidopsis exprimant la protéine MIF2 fusionnée à la protéine YFP. Après caractérisation de ces plantes, et après nous être assurés que la protéine MIF2 fusionnée à la protéine YFP est capable d'assurer sa fonction *in planta,* nous procéderons aux expériences d'immunoprécipitations à l'aide d'anticorps dirigés contre la protéine YFP.

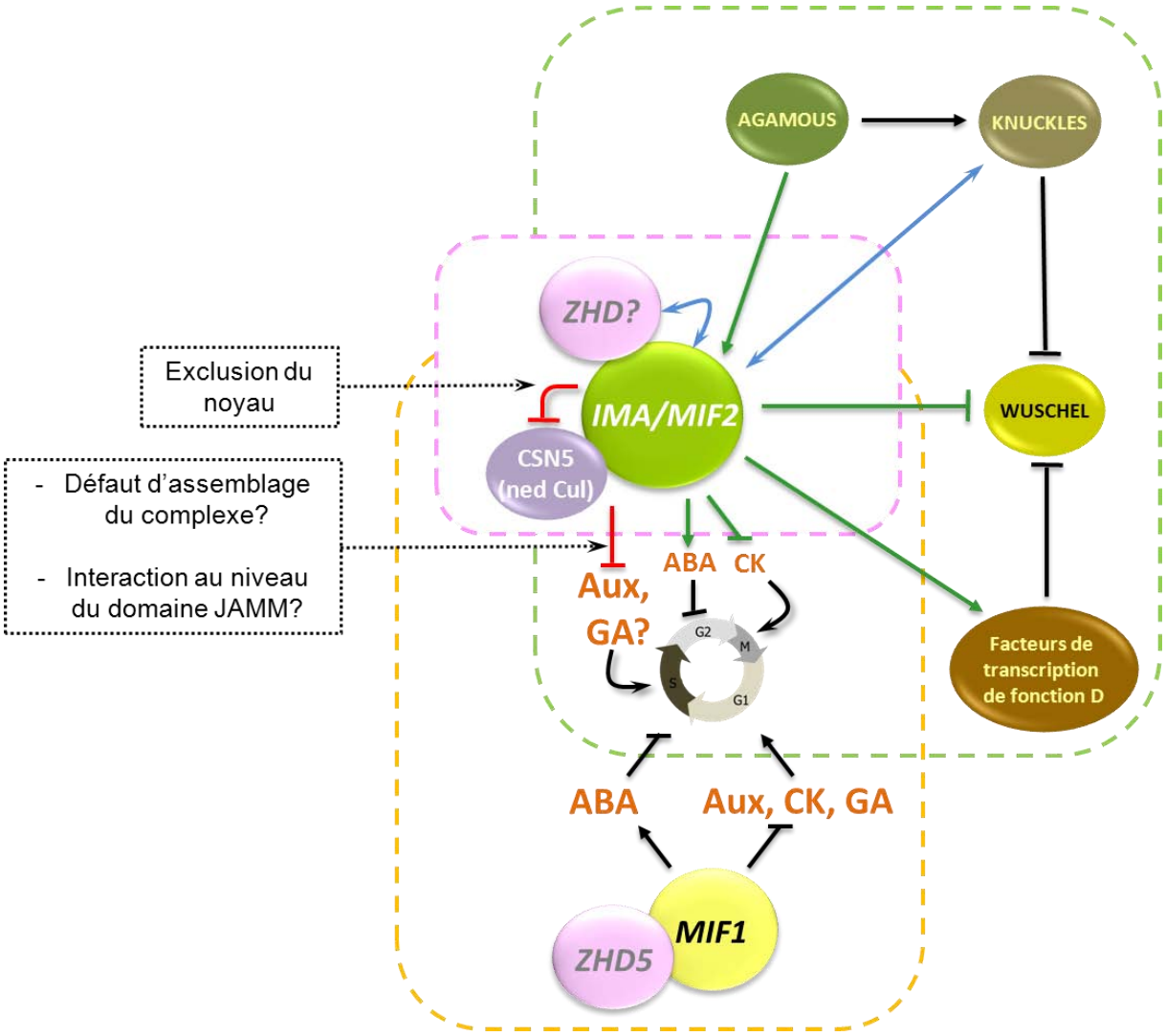


Figure 44: Bilan des données sur le rôle des gènes *MIF in planta* à la fin de mon projet de thèse.

Le groupe encadré de pointillés roses présente les protéines interagissant avec la protéine IMA/MIF2.

Les flèches rouges correspondent aux modes d'inhibition identifiés de la protéine IMA/MIF2 sur la protéine CSN5, ces mécanismes étant décrits dans les encadrés en pointillés noirs. Les flèches en bleu présentent les perspectives d'interactions à tester, notamment entre la protéine IMA/MIF2 et les protéines ZHD et la protéine IMA/MIF2 avec la protéine KNUCKLES.

1. Les protéines IMA/MIF2 inhibent la réponse à l'auxine par leur action sur la protéine CSN5.

Le signalosome participe à la régulation du complexe SCF^{TIR1} ciblant les protéines Aux/IAA, répresseurs transcriptionnels des gènes de réponse à l'auxine. Ainsi, l'inhibition de l'activité de déneddylation de la protéine CSN5 conduit à l'accumulation des protéines Aux/IAA en présence d'auxine.

Nous avons montré que les plantules $MIF2^{OE}$ présentent une insensibilité à l'auxine au niveau de la croissance de l'hypocotyle à l'obscurité (**figure 39**). Les plantes surexprimant le gène *MIF1* ou le gène *MIF2* chez Arabidopsis ou le gène *IMA* chez la tomate présentent une insensibilité à l'auxine. Dans le cas d'IMA/MIF2, le défaut de réponse à l'auxine est certainement dû à l'inhibition qu'exerce la protéine IMA/MIF2 sur la protéine CSN5. Cependant, ce niveau de régulation est complexe et a révélé un mécanisme d'action de la protéine MIF2 que nous n'avions pas soupçonné. En effet, les expériences de colocalisation entre les différents acteurs de la machinerie protéolytique et le répresseur transcriptionnel auxinique, IAA17, en présence d'auxine, montrent l'association physique de l'ensemble de cette machinerie dans des structures nucléaires spécifiques connues pour être des sites de dégradation protéolytique. La protéine MIF2 colocalise avec la protéine IAA17 dans les corps de dégradation protéique, montrant, une nouvelle fois, que la protéine MIF2 est associée à la machinerie protéolytique. La colocalisation du complexe MIF2-CSN5 avec la protéine IAA17, a permis de révéler que la rétention hors du noyau de la protéine CSN5 par la protéine MIF2, est un phénomène réversible, en présence d'un substrat de la machinerie de dégradation et du stimulus associé (**figure 34**). Ainsi, la protéine MIF2 est capable d'une part, d'empêcher la protéine CSN5 d'être présente dans le noyau, et, d'autre part, d'inhiber l'activité de la protéine CSN5 dans le noyau, au sein même des structures de protéolyse, en réponse à l'auxine. Ce second mode d'inhibition suggère que la protéine MIF2 est capable d'inhiber l'activité de la protéine CSN5 directement au sein du complexe signalosome ou, en piégeant CSN5, provoque un défaut d'assemblage du signalosome, comme cela a déjà été précédemment évoqué (**figure 44**).

Par ailleurs, nous avons montré que l'expression du gène IMA est influencée par la présence d'auxine (**figure S6, article**). Ces données permettent d'entrevoir le rôle potentiel de MIF2 dans la réponse à l'auxine. Ainsi, en présence d'auxine, le gène MIF2 est exprimé et la protéine MIF2 est associée, *via* son interaction avec la protéine CSN5, à la machinerie protéolytique en présence d'un substrat de cette machinerie (dans nos expériences IAA17) lequel est dégradé. En l'absence d'auxine, la protéine MIF2 maintient la protéine CSN5 hors du noyau ce qui limite la dégradation de substrats de la machinerie protéolytique.

Cependant, pour asseoir définitivement l'implication de MIF2 dans la voie de signalisation auxinique, il serait intéressant, d'une part de mesurer la quantité de protéines Aux/IAA dans les plantes MIF2^{OE} en présence d'auxine et d'autre part, de mesurer l'expression des gènes codant les protéines Aux/IAA, gènes de réponse primaire à l'auxine. De plus, les plantes surexprimant la protéine MIF2 fusionnée à la protéine YFP permettraient d'évaluer l'interaction des protéines MIF2 et CSN5 *in planta* ainsi que la composition des complexes protéiques se formant dans le noyau en réponse au stimulus auxine.

2. Le paradoxe de la fonction de la protéine MIF2 dans la réponse à l'obscurité et aux gibbérellines.

Le premier rôle identifié du complexe signalosome est de participer à la dégradation de facteurs de transcription spécifiques de la réponse à la lumière en condition d'obscurité. Par la suite, le rôle du signalosome dans la réponse aux gibbérellines a été caractérisé puisque, de la même façon que pour l'auxine, le signalosome participe, en présence de gibbérellines, à la dégradation des protéines DELLA, répresseurs de la réponse aux gibbérellines. Ainsi, la perte de fonction d'une des sous-unités du signalosome chez des plantes mutantes entraîne une réponse constitutive à la lumière et un défaut de réponse aux gibbérelines. La surexpression du gène *MIF2*, chez Arabidopsis, aurait pu conduire aux défauts phénotypiques attendus lorsque la plante répond à la lumière de manière constitutive et ne répond plus aux gibbérellines, comme cela a été montré pour les plantes IMA^{OE} de tomate et les plantes MIF1^{OE} d'Arabidopsis. Nous avons montré que les plantules MIF2^{OE} présentent une réponse à l'obscurité identique à la plantule de type sauvage et que les plantules MIF2^{OE} sont capables de répondre à l'ajout de gibbérellines. Ces phénotypes indiquent que la protéine MIF2 ne participe pas à l'inhibition de la protéine CSN5 dans la croissance de l'hypocotyle à l'obscurité ni dans la croissance induite par les gibbérellines (**figure 39**). Cependant, la protéine MIF2 est préférentiellement présente dans les tissus des organes floraux, mais elle est également fortement synthétisée dans les hypocotyles des plantules placées à l'obscurité. La présence de la protéine MIF2 suggère que cette dernière agit dans le développement de l'hypocotyle à l'obscurité mais, il est peu probable que son rôle soit d'inhiber la protéine CSN5 dans ce processus. En effet, l'inhibition de la protéine CSN5 aurait dû conduire à un phénotype photomorphogénique constitutif. L'étude de la réponse aux gibbérellines dans les feuilles de rosette d'Arabidopsis en présence de lumière révèle que lorsque le gène *MIF2* est surexprimé, la plante devient insensible à la présence de gibbérellines (**figure 40**). Dans ce contexte, il serait intéressant de réaliser une étude au niveau moléculaire du rôle de la protéine MIF2 dans la réponse aux gibbérellines comme cela a été fait pour l'auxine.

Cette étude nous permettrait notamment de déterminer si l'inhibition qu'exerce la protéine MIF2 sur les voies de réponse aux gibbérellines dans la feuille passe par son interaction avec la protéine CSN5.

En effet, la réponse différentielle des plantes MIF2^{OE} aux gibbérellines suggère que l'action *in planta* de la protéine MIF2 ne passe pas nécessairement par son interaction avec la protéine CSN5. L'interaction de la protéine MIF2 avec les protéines ZHD est un élément essentiel à prendre en compte dans la diversité des phénotypes des plantes MIF2^{OE} (**figure 44**). Nous ne connaissons pas les partenaires préférentiels de la protéine MIF2 parmi les protéines ZHD, ni l'effet de la protéine MIF2 sur ces protéines ZHD avec lesquelles elle interagit et encore moins les voies de réponse dans lesquelles les complexes protéiques MIF2-ZHD peuvent être impliqués. La découverte récente de l'effet modulateur de la protéine MIF1 sur l'activité de la protéine ZHD5 (Hong, et al. 2011) ouvre de nouvelles perspectives sur le rôle du gène *MIF2* dans la plante. Ainsi, la protéine MIF2 peut interagir avec la protéine CSN5 et avec les protéines ZHD. Quelle va être la dynamique d'association de ces différents partenaires et quel va être le rôle de ces différentes associations dans le développement de la plante et plus précisément, au niveau du méristème floral? En effet, les gènes *ZHD* et le gène *MIF2* sont exprimés de façon majoritaire au cours du développement floral. La protéine CSN5 est présente tout au long du développement de la plante et dans tous les organes. La mise en évidence des protéines ZHD interagissant spécifiquement avec la protéine MIF2 et l'analyse moléculaire de cette interaction permettrait d'apporter de nouvelles informations dans les processus dans lesquels ces interactions prennent place. Cette étude devra être complétée par une analyse génétique de plantes issues de croisements entre des parents exprimant différentiellement les protéines MIF2, CSN5 et les protéines ZHD concernées afin de caractériser les interconnections entre les différentes voies de régulation impliquant MIF2 au cours du développement floral.

Mais, nous ne pouvons pas non plus, exclure l'implication d'autres partenaires de la protéine MIF2 qui restent encore inconnus. A titre d'exemple et de façon surprenante, le criblage double hybride que nous avions réalisé, n'a pas permis d'identifier d'interactions entre la protéine IMA/MIF2 et les protéines ZHD alors que l'expérience de double hybride ciblé, réalisée par Hong *et al*. (2011), a permis de mettre en évidence des interactions entre la protéine MIF2 et les protéines ZHD. De plus, la régulation de l'expression du gène *WUS* par les protéines IMA/MIF2 et KNU pour lesquelles les gènes correspondant sont tous deux exprimés grâce à l'action de la protéine AG, suggère un mécanisme d'action commun entre les protéines IMA/MIF2 et KNU. En effet, la protéine KNU possède un motif «doigt à zinc» de type C2H2, couramment impliqué dans les interactions protéine-ADN ou protéine-protéine ainsi qu'un domaine apparenté à une fonction de répresseur transcriptionnel.

Ainsi, on peut se demander si les deux protéines, KNU et IMA/MIF2, ne pourraient pas avoir une action combinée dans l'inhibition du gène *WUS* par leur interaction physique (**figure 44**). Des expériences d'interaction protéine-protéine sont en cours pour déterminer si les protéines KNU et IMA/MIF2 sont capables d'interagir entre elles.

Le méristème est une structure organisée dans laquelle la prolifération cellulaire est régulée au niveau spatial et temporel à la fois par un réseau de gènes extrêmement bien coordonné et par l'effet de signaux associés aux phytohormones.

Ainsi, comme nous l'avons montré précédemment, la protéine IMA/MIF2 participe, par son interaction avec la protéine CSN5, à l'intégration du signal auxinique connu pour son activité mitogène, notamment au niveau du méristème. Cependant, des données convergentes suggèrent que l'interaction entre IMA/MIF2 et CSN5 pourrait intervenir sur la régulation du cycle cellulaire, indépendamment des voies de signalisation des phytohormones.

III IMA/MIF2, un interrupteur régulant l'activité du cycle cellulaire ?

1. Description du cycle cellulaire et de ses différents niveaux de régulation.

Le cycle cellulaire correspond à l'intervalle de temps qui sépare une division cellulaire de la suivante. Il comporte quatre phases successives, la phase G1 (G pour "gap"), phase pré-synthétique au cours de laquelle la cellule effectue sa croissance et "vérifie" que les conditions sont réunies pour la mise en place de la phase suivante, la phase S au cours de laquelle l'ADN est répliqué (S pour "synthèse"), la phase G2, préparatoire à la mitose, et enfin la phase M (M pour "mitose") au cours de laquelle a lieu la division nucléaire, c'est-à-dire la répartition équitable des chromosomes dans deux noyaux distincts, puis la division cytoplasmique. Les phases G1, G2 et S constituent l'interphase. La mitose (division nucléaire) et la cytokinèse (division cytoplasmique) forment la phase M. La succession de ces différents évènements est coordonnée de manière précise, afin que chaque processus se soit correctement déroulé avant que ne débute le suivant. Il existe ainsi un système de contrôle qui assure que les différents évènements ont lieu au bon moment, dans un ordre correct et une seule fois. Il existe ainsi trois points de contrôle ("checkpoint"), où la progression du cycle cellulaire peut être stoppée. A chacun de ces points, des conditions environnementales et physiologiques précises sont requises afin de permettre le passage de la cellule dans la phase suivante.

Les protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire sont très conservées chez les Eucaryotes. Diverses approches expérimentales ont permis de montrer que la progression du cycle cellulaire repose essentiellement sur des complexes protéiques formés

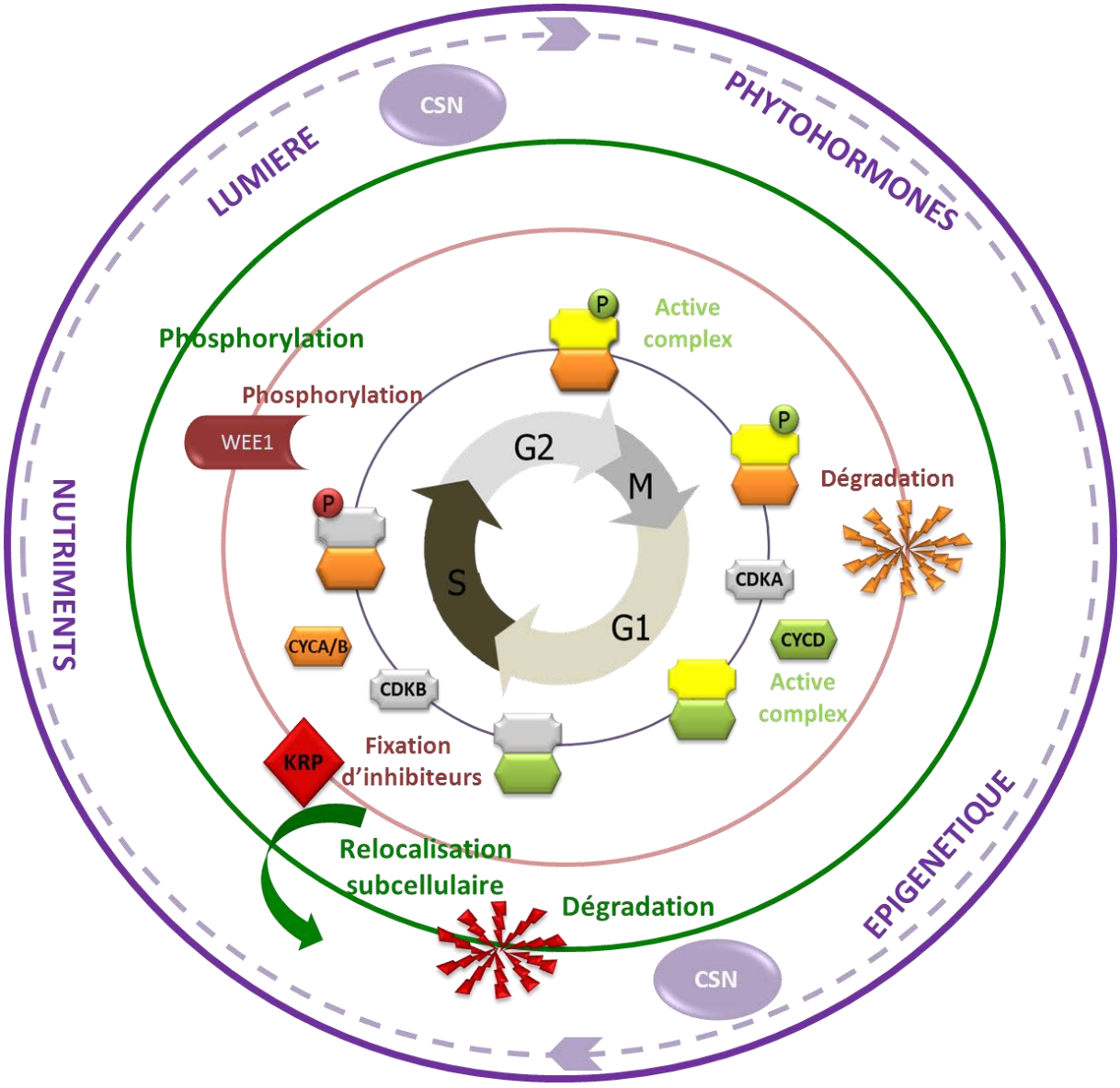


Figure 45: Le cycle cellulaire et ses différents niveaux de régulation.

Le cycle cellulaire est composé de quatre phases dont l'enchaînement est étroitement contrôlé par des complexes protéiques CDK/cyclines. Les complexes CDK/cyclines sont eux-mêmes extrêmement régulés par divers mécanismes intrinsèques à la cellule ayant un rôle inhibiteur (en rouge) ou activateur (en vert). La progression d'une cellule dans le cycle cellulaire est aussi influencée par des signaux endogènes ou environnementaux (en violet) qui sont intégrés au niveau du complexe signalosome (CSN).

de deux sous-unités : une sous-unité catalytique CDK (Cyclin-Dependent Kinase) activée par une sous-unité régulatrice de type cycline (**figure 45**). Les différents complexes CDK-cycline font également l'objet de diverses modifications, qui vont moduler leur activité au cours du cycle cellulaire. Ainsi, la progression dans les différentes phases du cycle cellulaire fait appel à trois grands types de mécanismes. (1) Le statut de phosphorylation/ déphosphorylation de la sous-unité CDK, est dépendant, entre autres, de l'activité de la protéine kinase WEE1 qui régule ainsi négativement l'activité des complexes CDK-cycline. (2) L'association d'inhibiteurs spécifiques de CDK, appelés KRP (Kip-Related Protein) avec les complexes CDK-cyclines module leur activité kinase, mais également la formation de certains complexes (comme CDKA-cyclineD), provoquant un blocage dans la progression du cycle cellulaire. (3) L'activation cyclique des complexes CDK-cycline est contrôlée par les variations de concentrations en cyclines. La concentration en cyclines est régulée par la dégradation de ces protéines, qui a lieu par la voie du protéasome 26S, dépendante de leur ubiquitinylation (**figure 45, en rouge**). Chez les animaux et la levure, la dégradation des cyclines mitotiques requiert leur ubiquitinylation par une enzyme appartenant à la famille des E3-ligases, l'APC/C (Anaphase Promoting Complex/ Cyclosome). En revanche, la dégradation des cyclines de type G1 intervient au moment de la phase S et nécessiterait l'implication du complexe SCF pour leur ubiquitinylation. Les trois mécanismes qui viennent d'être brièvement décrits entraînent un arrêt du cycle cellullaire.

Cependant, l'inhibition qui est exercée sur la progression du cycle cellulaire peut être levée de diverses manières, telles que la phosphorylation inactivatrice de la protéine kinase WEE1, la dégradation des protéines KRP ou encore la relocalisation subcellulaire de ces dernières (**figure 45, en vert**). Enfin, un dernier niveau de régulation correspond aux phytohormones qui peuvent agir sur chacun des éléments listés ci-dessus (**figure 45, en violet**). Ainsi, l'auxine, régulateur de croissance positif, favorise la transcription des gènes codant les cyclines A et les protéines CDKB et les cytokinines participent favorablement à la transcription des gènes codant les cyclines D. A l'inverse, l'acide abscissique active la transcription des gènes *KRP* (Mathieu-Rivet 2009).

2. Implication des protéines IMA/MIF2 et CSN5 dans la régulation du cycle cellulaire chez les plantes.

Implication des protéines MIF dans la progression des cellules dans le cycle cellulaire.

Le phénotype le plus marqué des plantes surexprimant le gène *IMA* chez la tomate et les gènes *MIF* chez Arabidopsis, concerne le nanisme des plantes résultant de la diminution de taille des organes. Ces observations impliquent que les gènes *IMA* et *MIF* ont un effet inhibiteur sur la croissance des plantes. La réduction de taille des organes peut être due à

une réduction du nombre de cellules associée à un défaut de division cellulaire, à une réduction de la taille des cellules à cause d'un défaut de fonctionnement dans les processus d'élongation cellulaire ou à ces deux phénomènes conjugués. Les analyses microscopiques des plantes MIF1^{OE} suggèrent que ce sont les processus d'élongation cellulaire qui sont affectés dans ces plantes. En revanche, l'analyse des plantes de tomate surexprimant le gène *IMA* indique que la protéine IMA inhibe les processus de division cellulaire. De plus, les plantes IMA^{OE} présentent une diminution de l'expression des gènes *CDKB* et *CYCD*, associée à l'insensibilité de ces plantes aux auxines et aux cytokinines, et, à l'inverse, une augmentation de l'expression du gène *KRP1*, associée à l'hypersensibilité des plantes IMA^{OE} à l'acide abscissique (Sicard 2007). Enfin, des expériences de cytométrie en flux ont démontré que les plantes IMA^{OE} accumulent plus de noyaux ayant un contenu en ADN de 4C par rapport aux plantes de type sauvage. Cette observation suggère que les cellules des plantes IMA^{OE} sont bloquées entre la phase de synthèse (S) et la mitose.

Implication de la protéine CSN5 dans la régulation du cycle cellulaire.

L'implication du signalosome dans la régulation de la progression des cellules au cours du cycle cellulaire et particulièrement dans la réponse aux lésions de l'ADN a été détaillée au **paragraphe III.5 du chapitre introduction** (**figure 45**). Cependant, la protéine CSN5 participe à la régulation du cycle cellulaire à différents niveaux sans être obligatoirement intégrée au complexe signalosome.

Chez les plantes, deux exemples démontrent l'interaction de la protéine CSN5 avec les protéines KRP. Ainsi, l'interaction des protéines CSN5 et KRP1 dans le noyau se produit grâce par l'intermédiaire d'un motif conservé chez les quatre protéines KRP de tomate (Nafati, et al. 2010). Chez le tabac, la protéine NtKIS1, appartenant à la famille des protéines KRP et la protéine CSN5 d'Arabidopsis, AJH1, interagissent *in vivo*. Lors des expériences de BiFC, le complexe NtKIS1-AJH1 est localisé uniquement dans le noyau. En revanche, lors d'expériences de colocalisation subcellulaire des protéines NtKIS1 et AJH1, 80% des protoplastes de tabac ayant un signal positif montrent une relocalisation de NtKIS1 dans des structures nucléaires apparentées aux clastosomes alors que la protéine AJH1 conserve la même localisation (Le Foll, et al. 2008).

Ainsi, la protéine CSN5 interagit d'une part avec la protéine IMA/MIF2 et, d'autre part, avec les protéines KRP. Le rôle de l'interaction des protéines CSN5 et KRP chez les plantes est peu décrit mais la localisation de NtKIS1 dans les clastosomes en présence de CSN5 suggère que la protéine CSN5 régule négativement l'action des protéines KRP comme cela est le cas chez l'homme (Le Foll, et al. 2008). Il serait intéressant de caractériser la dynamique d'association des protéines IMA/MIF2, CSN5 et KRP. On peut néanmoins proposer le modèle suivant, l'exclusion de la protéine CSN5 du noyau par son interaction

avec la protéine IMA/MIF2 peut lever l'inhibition exercée par CSN5 sur la protéine KRP, entraînant une inhibition de l'activité du cycle cellulaire. Ainsi, la protéine IMA/MIF2 pourrait agir à différents niveaux dans la régulation du cycle cellulaire.

3. IMA/MIF2, une protéine végétale à visée thérapeuthique ?

Lorsque le premier complexe signalosome a été purifié de cellules de mammifères, une activité kinase impliquée dans la phosphorylation de facteurs de transcription a aussi été identifiée. Jusqu'à présent, trois protéines à activité kinase ont été associées au signalosome dans des cellules humaines. La première est une kinase 5/6 inositol 1,3,4-triphosphate. Elle interagit avec le signalosome *via* la sous-unité CSN1 et il y aurait un mécanisme de régulation entre cette kinase et la sous-unité CSN5 (Harari-Steinberg and Chamovitz 2004). Les deux autres protéines kinases sont la protéine kinase CK2 (Casein Kinase 2) et la PKD (Protein Kinase D). La protéine kinase CK2 a déjà été identifiée dans la machinerie protéolytique chez les plantes pour son rôle potentiel dans la phosphorylation de HY5, facteur de transcription impliqué dans la réponse à la lumière. La phosphorylation de HY5 par CK2 empêcherait la fixation de COP1 sur HY5 afin de stabiliser ce facteur de transcription à la lumière (Hardtke, et al. 2000). Chez l'homme, CK2 et PKD se lient au signalosome afin de phosphoryler certains facteurs de transcription mais aussi des sous-unités du signalosome lui-même. Ainsi, CK2 phosphoryle les sous-unités CSN2 et CSN7, cette dernière étant également phosphorylée par la protéine PKD. Ces deux protéines kinases sont en plus capables de se fixer à CSN3 (Uhle, et al. 2003). Ces trois activités kinases sont donc impliquées dans la phosphorylation de protéines régulatrices et notamment, chez l'homme, dans la phosphorylation de facteurs protéiques associés à la régulation du cycle cellulaire, $p27^{KIP1}$, p53 et c-Jun.

La protéine $p27^{KIP1}$ a un rôle majeur dans la prolifération cellulaire puisqu'elle appartient à la classe des protéines inhibitrices KRP. Elle contrôle l'activité d'un des complexes CDK/cycline afin d'inhiber la progression des cellules dans la phase S du cycle. La protéine CSN5 a la capacité de transloquer la protéine $p27^{KIP1}$ hors du noyau. Cette relocalisation cytoplasmique de $p27^{KIP1}$ interrompt son effet inhibiteur sur la prolifération cellulaire et permet d'augmenter la motilité cellulaire. Ce processus permet aussi de favoriser la dégradation de $p27^{KIP1}$ par le protéasome (Shackleford and Claret 2010).

Le facteur de transcription p53 est une protéine dite «suppresseur de tumeur». Elle se trouve en petite quantité dans des cellules saines mais, elle est rapidement induite dans des cellules tumorales. Lors d'apparitions de lésions de l'ADN, la protéine p53 permet de stopper les cellules entre la phase G1 et S afin de permettre à la cellule de réparer les lésions ou, lorsque celle-ci est dans l'incapacité de réparer, d'induire l'apoptose. La phosphorylation d'acides aminés et notamment de la thréonine 155 de la protéine p53 entraîne sa

dégradation. Il a été montré que les protéines kinases CK2 et PKD phosphorylent la protéine p53, ce qui entraîne la fixation de p53 à une ubiquitine-ligase, Mdm2 conduisant à la dégradation de p53 (Bech-Otschir, et al. 2002). Par ailleurs, il a été montré que la protéine CSN5, de la même manière que pour la protéine $p27^{KIP1}$, est capable de fixer la protéine p53 afin de la conduire hors du noyau et de favoriser sa dégradation cytoplasmique grâce à l'ubiquitinylation médiée par Mdm2 (Shackleford and Claret 2010).

Enfin, la protéine c-Jun appartient à un complexe ayant une activité transcriptionnelle, le complexe AP-1 (Activating Protein-1) qui a un effet mitogène sur la cellule. La protéine c-Jun possède deux domaines distincts, un domaine de liaison à l'ADN en C-terminal caractérisé par une région «leucine-zipper» et un domaine d'activation de la transcription en N-terminal. La phosphorylation de certains résidus sérines dans ce domaine N-terminal par la protéine kinase JNK (c-Jun N-terminal Kinase) conduit à la stabilisation de c-Jun et à une augmentation de l'activité transcriptionnelle d'AP-1 alors que la phosphorylation d'acides aminés dans le domaine C-terminal conduit à une diminution de l'activité transcriptionnelle de c-Jun. Il a été montré que les activités kinases liées aux protéines CK2 et PKD sont impliquées dans la phosphorylation spécifique d'acides aminés du domaine N-terminal de c-Jun. Les phosphorylations d'acides aminés dans le domaine N-terminal de c-Jun empêche l'ubiquitinylation de cette dernière et par conséquent, empêche sa dégradation par le protéasome. La protéine CSN5 est aussi identifiée, chez l'homme, par un autre nom, JAB1 pour c-Jun Activation-domain-Binding protein 1. En effet, JAB1/CSN5 a été identifié comme un co-activateur de c-Jun puisqu'il stabilise la liaison du complexe AP-1 sur les promoteurs des gènes cibles de ce complexe (Harari-Steinberg and Chamovitz 2004). Au bilan, la protéine c-Jun est stabilisée, d'une part, par les activités kinases associées au signalosome et d'autre part, par son interaction avec CSN5. En condition d'activité du cycle cellulaire normale, la phosphorylation dépendante du signalosome permet de maintenir de faibles quantités du suppresseur de tumeur p53 alors que l'activité transcriptionnelle du complexe AP-1, de par la stabilisation de c-Jun, permet à la cellule d'avoir une activité normale de division cellulaire.

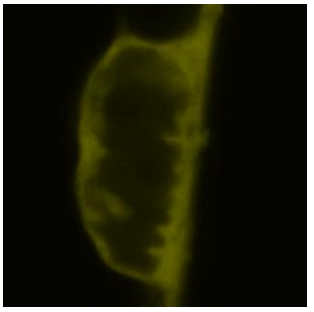
L'ensemble de ces données indiquent que CSN5, chez l'homme comme chez les plantes, en dehors de son activité au sein du complexe signalosome, est capable d'initier des changements de localisation d'inhibiteurs du cycle cellulaire bien que ces changements soient de nature différente pour les deux espèces.

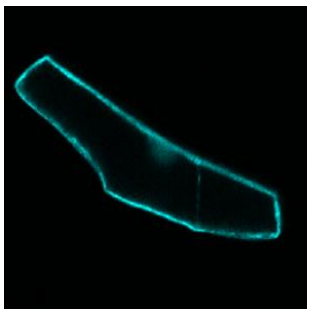
D'après tous ces éléments, on imagine aisément que le signalosome et tout particulièrement CSN5, doit être étroitement contrôlé pour que la cellule n'entre pas dans des phases de division accrue pouvant conduire à des phénomènes de tumorigenèse. En effet, la revue de Lee et al. (2011) recense l'implication du signalosome et tout particulièrement, de la protéine CSN5, dans de nombreux cancers humains.

La protéine CSN5 est surexprimée dans de nombreux types de cancers, affectant un large panel d'organes (poumon, colon, sein, cerveau) jusqu'à la leucémie. Une augmentation de l'expression de CSN5 conduit à une forte diminution de l'inhibiteur de croissance cellulaire $p27^{KIP1}$ et de la protéine «suppresseur de tumeur» p53 résultant en une prolifération cellulaire anarchique. Cependant, peu d'éléments régulateurs du signalosome et de ses sous-unités ont été découverts jusqu'à présent. Le gène *CSN5* présente rarement des mutations dans le cas d'un cancer, ce qui accentue la recherche d'un régulateur de la protéine CSN5, capable de moduler son expression ou son activité (Lee, et al. 2011). Un tel acteur serait un candidat intéressant dans l'arsenal de lutte contre les cancers associés à une dérégulation de la protéine CSN5 et du signalosome.

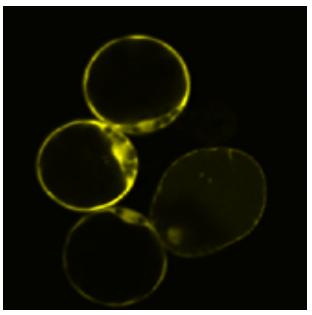
Mon travail de thèse a permis de montrer que la protéine IMA/MIF2, exprimée uniquement chez les plantes, est capable d'intéragir avec la protéine CSN5. La caractérisation de cette interaction a montré que la protéine IMA/MIF2 participe, *via* cette interaction, à la régulation du signalosome dans certains processus physiologiques. Cependant, la modulation de la localisation de la protéine CSN5 en présence de la protéine IMA/MIF2 nous permet de proposer un rôle potentiel de la protéine IMA/MIF2 dans la régulation propre à la protéine CSN5. La diversité d'implications de la protéine CSN5 dans différentes formes de cancer en fait une cible de choix pour les traitements anti-tumoraux. La protéine IMA/MIF2 est un des rares éléments régulateurs du signalosome découverts à ce jour. L'étude du rôle de la protéine IMA/MIF2 dans des modèles de cellules cancéreuses pourrait faire émerger une biomolécule à visée thérapeutique conduisant à l'élaboration d'un traitement anticancéreux pouvant être utilisé dans une large gamme de tumeurs mais il reste à démontrer que cette protéine est capable d'interagir avec la protéine orthologue humaine de CSN5.

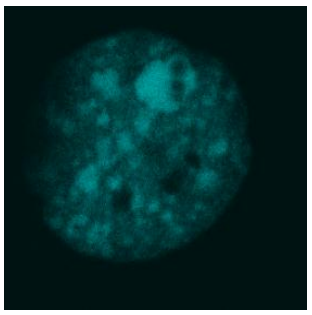






MATERIELS et METHODES







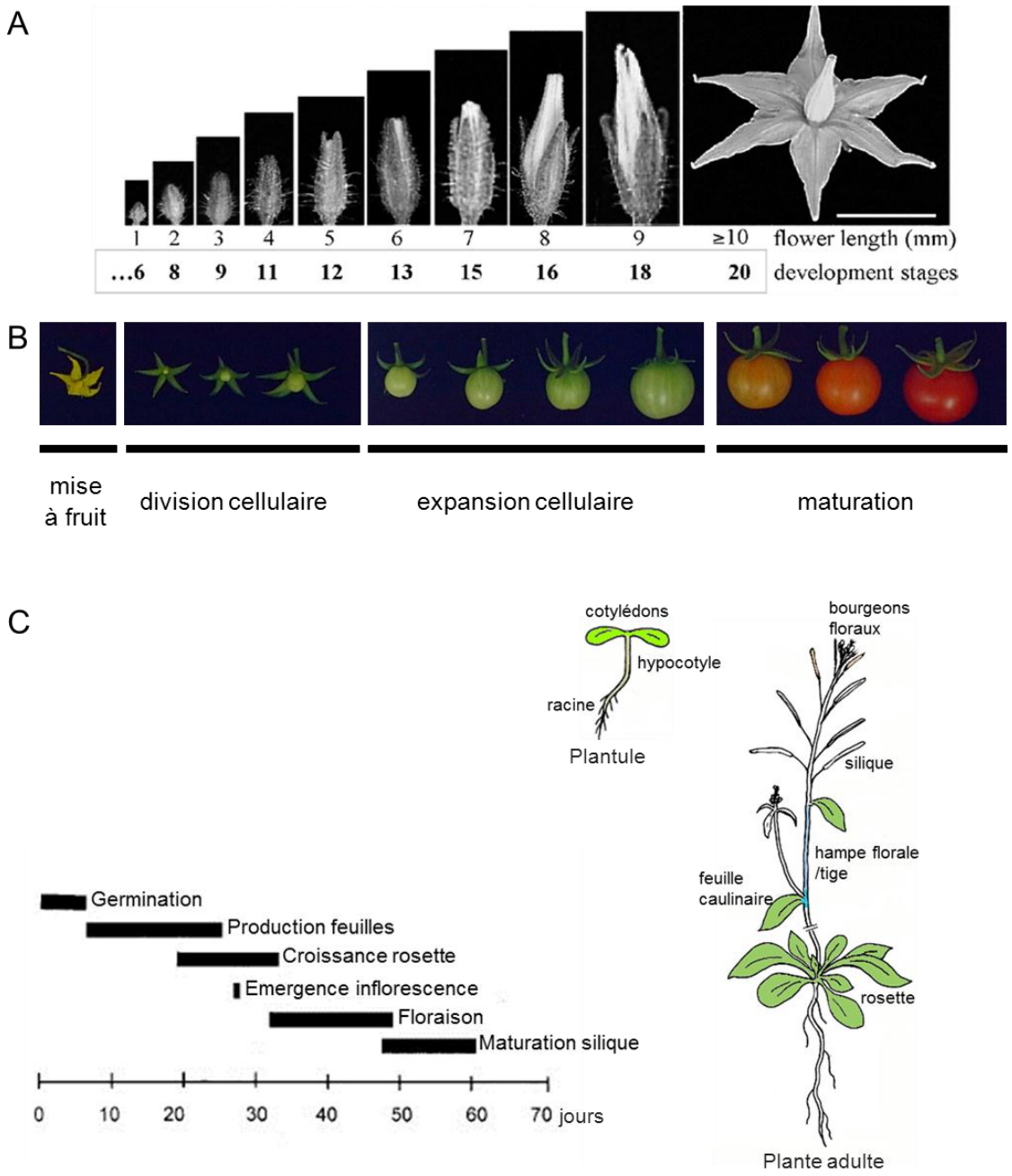


Figure 46: Développement de la fleur (A) (Brukhin, et al. 2003) et du fruit de tomate (B) et schéma développemental d'Arabidopsis thaliana (C).

Chez la tomate, espèce autogame, les phénomènes de déhiscence des anthères (anthèse), de pollinisation et de fécondation ont lieu de façon très rapprochée dans le temps ce qui a conduit à les regrouper sous le terme d'anthèse ou de mise à fruit. La fécondation déclenche l'entrée en phase II du développement du fruit et se caractérise par une reprise des activités de division cellulaire, qui se poursuivent intensément sept à dix jours après anthèse. Chez la tomate cerise (S. lycopersicum var. cerasiformae), la phase III s'étend du 10ème jour au 40ème jour après l'anthèse. Elle est marquée par un ralentissement important de l'activité de division cellulaire et la croissance du fruit est alors majoritairement obtenue par expansion cellulaire. La maturation du fruit est initiée après la phase de croissance et après la maturation des graines. Le fruit subit des changements biochimiques et structuraux importants qui vont déterminer son arôme, sa couleur, sa texture et sa composition biochimique et donc lui conférer ses qualités organoleptiques et nutritionnelles. Ce processus n'influence pas la taille ou la forme du fruit.

MATERIELS et METHODES

I Matériel biologique.

1. Matériel végétal et milieux de culture.

Le milieu utilisé pour la culture *in vitro* des plantes est le milieu MS (Murashige and Skoog, 1962) complémenté de saccharose (30 g/L) et ajusté à un pH de 5.7. Ce milieu peut être dilué au quart (MS¼) ou au demi (MS½) selon les besoins de la culture. Pour des milieux solides, 8 g/L d'agar sont ajoutés.

Les plants de tomate cerise *Solanum lycopersicum* Mill. var. cerasiformae. cv. West Virginia 106 (Wva106) sont cultivés soit en serre, soit in vitro en conditions axéniques dans du milieu MS dans les mêmes conditions citées ci-dessus. Les graines de tomate, préalablement décontaminées en surface pendant 20 min en présence d'hypochlorite de calcium 4% (p/v) et rincées trois fois à l'eau, sont semées sur du milieu MS ¼. Les différents stades de développement de la fleur et du fruit de tomate sont représentés **figure 46** afin d'indiquer les différents stades pour lesquels des tissus ont été prélevés au cours de cette étude.

La plante modèle *Arabidopsis thaliana*, écotype Columbia (Col-0) a été utilisée pour cette étude. La chronologie du développement de la plante est représentée **figure 46** ainsi que les différents tissus prélevés au cours de ce travail. Elle est généralement cultivée dans une chambre phytotronique sous une thermopériode de 22°C/18°C et sous une photopériode 16h/8h (jour/nuit) dans un mélange terreau/vermiculite en proportion 2/1 (v/v). Les graines préalablement décontaminées en présence de javel 5% (v/v) additionnée de Triton X-100 pendant 10 min et lavées 5 fois à l'eau, sont semées sur le milieu $MS^{1/2}$, vernalisées à 4°C durant 2-3 jours avant d'être placées dans une chambre de culture *in vitro* sous une thermopériode de 25°C/20°C et sous une photopériode de 14h/10h (jour/nuit). Les mutants d'insertion *csn5a1* (SALK_063436), *csn5a2* (SALK_027705), *csn5b* (SALK_007134), *zhd9-1* (SALK_656708), *zhd9-2* (SALK_656939), *zhd13-1* (SALK_658914) et *zhd13-2* (SALK_673820) ont été obtenus auprès du Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC).

Les épidermes d'oignon, *Allium cepa*, ont été utilisés au cours de ce travail pour la localisation de protéines d'intérêt en microscopie confocale. Ils sont prélevés sur des écailles de jeunes bulbes d'oignon et déposés, face externe au contact du milieu MS avant d'être transformés par biolistique et observés 12 à 24h après.

2. Souches bactériennes et milieux de culture.

La souche d'*Escherichia coli* TOP 10 (F-mcrA, Δ(mrr-hsdRMS-mcrBc), f80lacZΔM15, ΔlacX74, nupG, recA1, araD139, Δ(ara-leu)797, galE15, galK16, rpsL(Str^R), endA1, λ^-) est utilisée pour le clonage et la propagation des plasmides recombinants de type Gateway®.

La souche d'*Escherichia coli* DB3.1 (F- gyrA462 endA1 gln V44 Δ(sr1-recA) mcrB mrr hsdS20 (r_B^-, m_B^-) ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(Str^r) xyl5 Δleu mtl1) est utilisée pour la propagation des plasmides Gateway® non recombinés, contenant l'opéron ccdB.

La souche d'*Escherichia coli* BL21-AI™ (F- ompT hsdSB (rB-mB-) gal dcm araB::T7RNAP tetA) est utilisée pour la production de protéines recombinantes.

La souche d'*Agrobacterium tumefaciens* GV3101 est utilisée comme vecteur de transformation pour générer les plantes transgéniques. Elle possède un plasmide Ti ("Tumor inducing") désarmé contenant les gènes de virulence *Vir* permettant le transfert de l'ADN de Transfert (ADN-T) dans le noyau des cellules végétales.

Toutes les souches bactériennes sont cultivées dans du milieu LB (Bactotryptone 1% (p/v); extrait de levure 0,5% (p/v); NaCl 1% (p/v)) en présence ou non d'antibiotique. Les bactéries *E. coli* sont cultivées à 37°C et les bactéries *A. tumefaciens* à 28°C. Pour les milieux solides, 15 g/L d'agar bactériologique sont ajoutés.

3. Souche de levures et milieux de culture.

La souche de *Saccharomyces cerevisiae*, MaV203 (MATα, leu2-3,112, trp1-901, his3Δ200, ade2-101, gal4Δ, gal80Δ, SPAL10::URA3, GAL1::lacZ, $HIS3_{UAS}$ GAL1::HIS3@LYS2, $can1^R$, $cyh2^R$) a été utilisée pour un criblage de banque d'ADNc et des analyses d'interactions protéiques ciblées par la technique de double hybride. Cette souche possède les deux mutations *leu2* et *trp1* pour permettre la sélection positive par complémentation fonctionnelle des clones co-transformés.

Lorsqu'elles ne sont pas transformées, ces souches de levures sont cultivées à 30°C dans du milieu YPAD (Extrait de levure 1% (p/v), peptone 2% (p/v), D(+)-glucose 2% (p/v) et adénine sulfate 0,01% (p/v), pH=5,8). Après transformation, les levures sont cultivées dans du milieu dit "de sélection" correspondant au milieu synthétique minimum (SD) ("Yeast nitrogen base without aminoacids" 0,67% (p/v), D(+)-glucose 2% (p/v), pH=5,8) complémenté par une solution d'acides aminés dans laquelle certains acides aminés sont délibérément omis en fonction de la pression de sélection désirée. Les milieux de culture solides sont obtenus par ajout de 15 $g.L^{-1}$ d'agar bactériologique.

4. Plasmides.

Les vecteurs utilisés sont des vecteurs Gateway® (Invitrogen) qui permettent l'insertion de gènes d'intérêt par recombinaison entre des sites spécifiques situés sur deux entités indépendantes (**paragraphe II.2**).

Vecteurs d'entrée.

Le plasmide pDONR^{TM} 201 est utilisé pour cloner des fragments d'ADN délimités par des sites de recombinaison attB1/attB2 entre lesquels se situent un gène de résistance au chloramphénicol (*Cm^r*) et un gène codant pour une toxine antibactérienne (*ccdB*) permettant d'éliminer les bactéries ne portant pas de plasmide recombiné. De plus, ce plasmide possède un gène de sélection bactérien conférant la résistance à la kanamycine.

Vecteur d'expression utilisé pour la transformation stable de plantes.

Le plasmide pK2GW7 a été utilisé pour la transformation d'*Arabidopsis thaliana* par *Agrobacterium tumefaciens*. Il s'agit d'un vecteur binaire contenant entre les sites LB et RB de l'ADN-T, les séquences du promoteur constitutif 35S et du terminateur du gène VI du CaMV entre lesquelles sont insérés des sites de recombinaison attR Gateway® bordant les gènes *Cm^r*.et *ccdB*. La sélection des plantes s'effectue grâce au gène de sélection conférant la résistance à la kanamycine (*Kan^r*). Ce vecteur permet la surexpression du gène d'intérêt inséré au niveau des sites de recombinaison.

Vecteurs d'expression utilisés pour la transformation transitoire de plantes.

Ce sont des vecteurs permettant la localisation subcellulaire de protéines individuelles ou formant un complexe.

Vecteurs pBS-35S-YFP-attR, pBS-35S-attR-YFP, p2CGW7 et p2GWC7.

Ces vecteurs sont utilisés pour étudier la localisation de protéines fusionnées à la Yellow Fluorescent Protein (YFP) ou à la Cyan Fluorescent Protein (CFP). La séquence codante pour la protéine d'intérêt est fusionnée en amont ou en aval de la séquence codante de la YFP ou de la CFP en fonction de l'orientation des sites attR par rapport aux extrémités de la protéine fluorescente. Les séquences sont transcrites sous le contrôle du promoteur 35S. Les vecteurs portent le gène conférant la résistance à l'antibiotique ampicilline (*Amp^r*) pour la sélection des bactéries transformées utilisées pour l'amplification du plasmide.

Vecteurs NeYFP/pUGW2, CeYFP/pUGW2, NeYFP/pUGW0 et CeYFP/pUGW0.

Ces vecteurs sont exploités lors d'expérience de BiFC (Bimolecular Fluorescence Complementation) pour l'expression de protéines fusionnées à des fragments fonctionnellement complémentaires de la protéine YFP. En effet, la protéine YFP de 239 acides aminés est séparée en deux formes, la NeYFP correspondant aux 175 premiers

acides aminés et la CeYFP portant les 64 acides aminés restants. Les séquences codantes de la NeYFP et de la CeYFP peuvent être fusionnées en 5' (vecteurs dont les noms se terminent par 0) de la séquence codante de la protéine d'intérêt ou en 3' (vecteurs dont les noms se terminent par 2) de la séquence codante de la protéine d'intérêt. Ces vecteurs permettent une sur-expression des séquences fusionnées sous la dépendance du promoteur CaMV 35S. Ils possèdent le gène *Amp*^{r} pour la sélection des bactéries transformées.

Vecteurs utilisés pour la recherche d'interaction protéique par la technique de double hybride.

Le plasmide pDEST™-32 est utilisé pour exprimer le gène d'intérêt portant la séquence de la protéine "appât", dans les levures. Le plasmide pDEST™-32 porte la séquence codant pour le domaine de fixation à l'ADN de la protéine GAL4 suivie des sites de recombinaison *attR*. Ce plasmide contient également la cassette d'expression eucaryote gouvernée par le promoteur et le terminateur du gène *ADH1*, des origines de réplication bactérienne (pUC) et de levure (*ARS4/CNE6*). Les marqueurs de sélection concernent la complémentation de la synthèse de Leucine (*LEU2*) pour les levures et le gène de résistance à la Gentamicine (*Gm*^{r}) pour les bactéries.

Les plasmides pDEST™-22 et pEXP-AD502 permettent de sur-exprimer dans des levures les protéines "cibles" fusionnées au domaine d'activation de la transcription de la protéine GAL4. Ils diffèrent également du plasmide précédent par ses marqueurs de sélections qui concernent la complémentation de la synthèse du tryptophane (*TRP1*) pour les levures et le gène *Amp*^{r} pour les bactéries. Le plasmide pDEST™-22 est utilisé pour la recherche ciblée d'interaction et le pEXP-AD502 est utilisé pour la constitution de banque d'ADNc à cribler pour la recherche de protéines interactrices.

Vecteurs utilisés pour la production de protéines recombinantes en système hétérologue bactérien.

Les plasmides pET160-DEST et pDEST15 sont des vecteurs d'expression de protéines étiquetées respectivement par les étiquettes 6x-Histidine (His6) et glutathione S-transferase (GST), lesquelles permettent de purifier les protéines d'intérêt. Ces vecteurs contiennent le promoteur et le terminateur T7 du bactériophage du même nom. Ils possèdent tous deux une séquence Shine-Dalgarno (RBS) suivie d'un codon start et de leurs étiquettes respectives permettant une fusion de l'étiquette à l'extrémité N-terminale de la protéine. Le plasmide pET160-DEST possède la séquence codant pour le His6, une étiquette Lumio^{TM} permettant une détection des protéines recombinantes directement sur le gel d'acrylamide grâce à des propriétés fluorescentes en réponse aux UV. Les deux étiquettes, His6 et Lumio, peuvent être séparées de la protéine d'intérêt par une coupure spécifique par la protéase TEV

(Tobacco Etch Virus) laquelle reconnait un site positionné entre les étiquettes et la protéine d'intérêt. Ces vecteurs portent tous deux le gène *Amp*^{r}.

II Méthodes de manipulation et d'analyse des acides nucléiques.

1. Extraction des acides nucléiques.

Extraction de l'ADN génomique d'Arabidopsis thaliana et de tomate.

La méthode d'extraction est réalisée sur de petits échantillons de jeunes feuilles de l'ordre de 100 mg selon la méthode d'Edwards *et al.* (1991), afin d'obtenir de l'ADNg permettant de sélectionner les plantes transgéniques par criblage PCR (Edwards, et al. 1991).

Extraction des ADN plasmidiques de bactéries.

L'ADN plasmidique est extrait à partir de 6 mL ou de 50 mL de culture saturée, en utilisant respectivement les systèmes d'extraction PureYield^{TM} Plasmid Miniprep System (Promega) ou le kit Wizard® Plus Midipreps DNA Purification System (Promega), selon le protocole décrit par le fournisseur. L'ADN plasmidique est élué dans 30 ou 300 µL d'eau mQ stérile selon le système utilisé et quantifié par spectrométrie à 260 nm.

Extraction d'ADN de levure.

Les colonies issues d'évènements de co-transformation sont dispersées séparément dans 30 µL de NaCl 0,9% afin d'ensemencer 5 mL de milieu liquide SD-LT. Les levures sont ainsi mises en culture durant 2 jours à 30°C sous agitation (200 rpm). Les cultures sont centrifugées 10 min à 4000 rpm et le culot est repris dans 250 µL de tampon de broyage (10 mM Tris-HCl pH8; 1 mM (Na2)EDTA; 100 mM NaCl; 1% (p/v) SDS et 2% (v/v) Triton X-100). La suspension de levures est transférée dans des tubes de 2 mL à vis contenant 100 µL de billes de zirconium de 0,5 mm de diamètre. Deux cent cinquante µL de mélange phénol/chloroforme sont alors ajoutés. Les levures sont broyées durant 2 fois 40 secondes au ribolyser FastPrep®-24 (MP^{TM}) à puissance maximale en refroidissant le mélange dans la glace entre les deux broyages. Après une centrifugation à 14000 rpm pendant 10 min à 4°C, 200 µL de la phase aqueuse contenant les acides nucléiques sont transférés dans un nouveau tube auquel est ajouté 20 µL d'acétate d'ammonium 4M et 600 µL d'éthanol 100%. Ce mélange est placé durant 2h à -20°C ou 30 min à -80°C afin de précipiter les acides nucléiques. Après une centrifugation à 14000 rpm pendant 10 min à 4°C, les culots sont lavés avec 400 µL d'éthanol 75%, centrifugés dans les mêmes conditions que précédemment et séchés sous vide avant d'être repris dans 20 µL de TE (10 mM Tris HCl pH8 et 1 mM (Na2)EDTA).

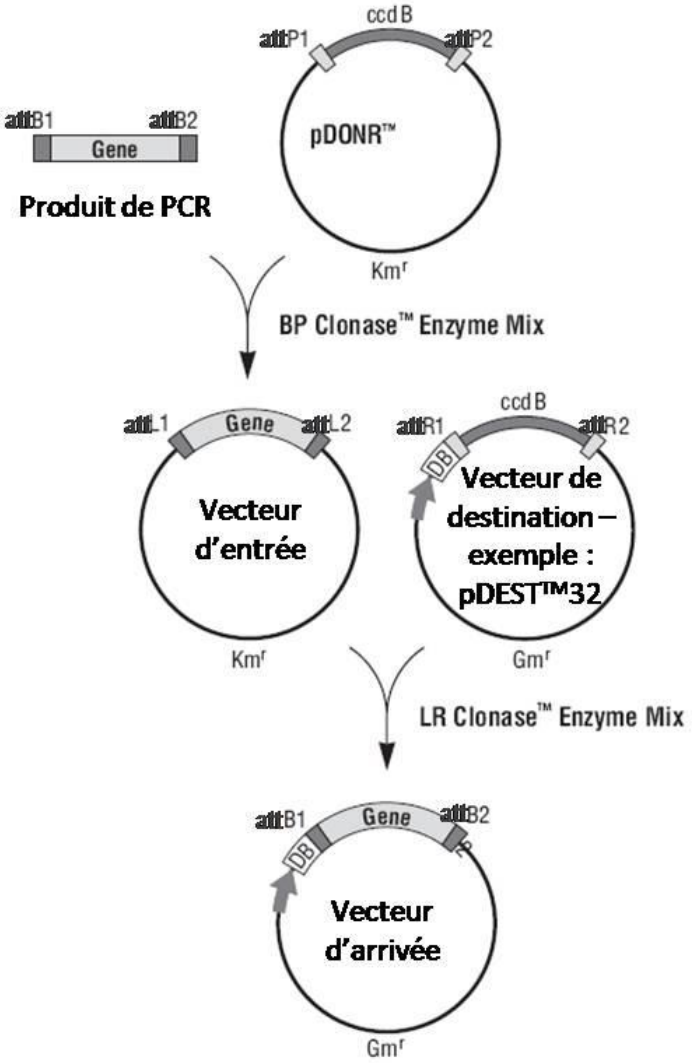


Figure 47: Clonage d'une séquence d'intérêt selon la technologie Gateway®.

Le produit de PCR bordé des séquences de recombinaison attB est inséré dans un vecteur donneur (réaction BP), avant d'être transféré dans un vecteur d'expression (ou de destination) (réaction LR).

(ProQuest™ Two-Hybrid System with Gateway® Technology, Instruction Manual, 2002).

Extraction d'ARN totaux.

L'extraction d'ARN totaux est réalisée à partir de 100 mg de tissus d'Arabidopsis en utilisant le kit «RNeasy Plant Mini Kit» (Quiagen) selon les recommandations du fournisseur. Les ARN élués avec 50 µL d'eau «RNAse free» sont quantifiés au spectromètre à 260 nm (1 unité de DO=40 mg/mL).

La présence d'ADN génomique est évaluée par une réaction PCR sur les échantillons d'ARN. Si cette évaluation est positive, une étape de traitement à la DNase I est alors réalisée avec la TURBO DNase^{TM} (Ambion) selon le protocole indiqué par le fournisseur afin d'éliminer cette contamination.

2. Clonage moléculaire par recombinaison selon la technologie Gateway®.

Le clonage des séquences des gènes d'intérêt d'*Arabidopsis thaliana* ou de tomate est réalisé grâce à la technologie Gateway® développée par Invitrogen. Le principe de cette méthode est présenté dans la **figure 47**. Cette technologie repose sur l'utilisation des capacités du bactériophage lambda à reconnaître des sites spécifiques sur le chromosome d'*E. coli* pour induire des phénomènes de recombinaison d'ADN. La recombinaison a lieu entre des séquences d'ADN spécifiques appelées «site-specific attachment (att)»: attP sur le bactériophage lambda et attB sur le chromosome d'*E. coli*. La recombinaison consiste en un échange, suivi d'une ligation de deux brins d'ADN pour donner un nouvel ADN. Cette technologie fournit donc un moyen efficace et rapide pour intégrer une séquence d'ADN possédant les sites attB dans un vecteur intermédiaire dit "d'entrée" possédant les sites attP. L'intégration dans ce premier vecteur permet de transférer rapidement, toujours par recombinaison, cette séquence d'intérêt dans différent vecteurs dit "de destination" suivant les applications désirées. Les vecteurs utilisés au cours de ce travail de thèse ont été donnés avec leurs caractéristiques au **paragraphe I.4**.

Préparation de l'insert.

La séquence d'intérêt destinée à être insérée dans le vecteur de destination est obtenue à partir d'ADNc d'Arabidopsis ou de tomate par amplification PCR à l'aide de la Taq haute-fidélité DNA Polymerase iProof® (Biorad), selon les recommandations du fournisseur. Le programme utilisé comprend une dénaturation à 98°C pendant 3 minutes, 35 cycles correspondants, par cycle, à 10 secondes de dénaturation à 98°C suivis de 30 secondes d'hybridation des amorces au Tm adaptée à la séquence et à 15 secondes/kb à 72°C d'élongation; le programme s'achève par une étape d'élongation à 72°C pendant 5 minutes. L'amplifiat (10-100 ng) est purifié en utilisant le système de purification Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System selon les recommandations du fournisseur (Promega).

NOM	SEQUENCE	AMPLIFIAT
MIF2attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATGAGGAAGCGTCAGG	AtMIF2
MIF2attB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCTAATTTCCAGTAGAAGG	
ZHD5attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATGGATATGAGAAGCCATGAA	AtZHD5
ZHD5attB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTTAGAGAGTAGTTGTTGGTGT	
AJH1attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCAATGGAAGGTTCCTCG	AtCSN5a
AJH1attB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTCACGATGTAATCATGGGC	
AtCSN5aDEL14S	GGAGAACGTTGTTGGATGGTATGTTTCGACACAGATGCTTAACC	AtCSN5DEL14
AtCSN5aDEL14AS	GGTTAAGCATCTGTGTCGAAACATACCATCCAACAACGTTCTCC	
AtCSN5aDEL76S	GCTCGCTCCGGTGGCACAATCGTTTCGACACAGATGCTTAACC	AtCSN5DEL76
AtCSN5aDEL76AS	GGTTAAGCATCTGTGTCGAAACGATTGTGCCACCGGAGCGAGC	
AJH2attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATGGAGGGTTCGTCGTCG	AtCSN5b
AJH2attB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTCAATATGTAATCATAGGGTC	
AtCSN3attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCGAAGATGATCGGAGC	AtCSN3
AtCSN3attB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTTACATGGAGAACTTCTG	
AtIAA17attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATAATGATGGGCAGTGTC	AtIAA17
AtIAA17attB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTCAAGCTCTGCTCTTGCAC	
AtTIR1attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTGGCCGCAATGCAGAAGC	AtTIR1
AtTIR1attB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTTATAATCCGTTAGTAGTAATG	
AtCUL1attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATGGAGCGCAAGACTATTGA	AtCulline1
AtCUL1attB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCTAAGCCAAGTACCTAAACATG	
AtPAA1attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCGAAGAAGATGAGTAGAGG	AtPAA1
AtPAA1attB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTCAGTCTCGTTCACTAATGG	
AtPBB1attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTTGAAAAAATGTCGCAATCAAC	AtPBB1
AtPBB1attB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTTATTCCTCCATAGCTTCACC	
AtPBF1attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCGCCATGACTAAACAGC	AtPBF1
AtPBF1attB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTTAGTCTTTCCTCAGGTCC	

NOM	SEQUENCE	AMPLIFIAT
IMAattB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAGAAGAGATGAAAAAAGTTTTGAGG	SlIMA
IMAattB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTCATTTAGTAGTAGAAGA	
JAB1attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATGGACGCTCTGAATTCTT	SlCSN5a
JAB1attB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTCAGGTTTCGACCATCGG	
JAB2attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCAATGGACTCTCTGAATTC	SlCSN5b
JAB2attB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTCAGCTTTCGATCATGG	
attL1	CGCGTTAACGCTAGCATGGATCTC	Insert sur le pDONR
attL2	GTAACATCAGAGATTTTGAGACAC	
attB1	ACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT	Insert sur le pDEST
attB2	ACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT	

Tableau 2: Amorces utilisées pour le clonage de gènes candidats.

La séquence soulignée correspond à la séquence spécifique du gène. L'indicatif «At» désigne les gènes amplifiés à partir de tissus d'Arabidopsis thaliana et l'indicatif «Sl» désigne les gènes amplifiés à partir de tissus de tomate.

Afin d'ajouter les sites attB à la séquence d'intérêt, une seconde PCR est réalisée sur 10-100 pg du produit de PCR précédent, en présence d'un couple d'amorces contenant en 3', une séquence spécifique de la séquence d'intérêt et, en 5', les séquences attB (**tableau 2**). Cette réaction d'amplification PCR est également réalisée avec la polymérase iProof®. Les fragments attB-PCR sont purifiés comme précédemment en utilisant le système Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega).

Clonage dans le vecteur d'entrée.

Le clonage du fragment attB-PCR purifié dans le vecteur d'entrée pDONR™ 201 est réalisé grâce à la réaction de "recombinaison BP" selon le protocole du fournisseur (Invitrogen). La réaction de recombinaison est réalisée à partir 30 à 300 ng du produit PCR dans un volume de 3µL, de 75ng de vecteur pDONR™ (vecteur d'entrée) dans un volume de 1µL et de 1 µL d'enzyme BP clonase. Le volume final de mélange réactionnel est de 5 µL. La réaction est incubée pendant 12 h à 25°C. Un µL de cette réaction est utilisé pour transformer 40 µL de cellules électrocompétentes E. coli TOP10 selon le protocole décrit dans le **paragraphe II.3**.

Clonage dans le vecteur de destination.

Le clonage s'effectue également par recombinaison dite "LR" et permet de transférer la séquence d'intérêt dans différents vecteurs de destination. Cette réaction s'effectue sur le produit de la "recombinaison BP" après sélection et amplification des clones recombinants. A 75 ng de vecteur d'entrée recombiné sont ajoutés 75 ng du vecteur de destination, 1µl d'enzyme LR clonase (Invitrogen) complété avec un tampon TE1X pour un volume final de 5 µL. La réaction est incubée sur un temps variable d'une heure à une nuit à 25°C en fonction de la taille du fragment à recombiner. Un µL de réaction est utilisé pour transformer 40 µL de cellules électrocompétentes E. coli TOP10 selon le protocole décrit dans le **paragraphe II.3**.

Les bactéries transformées sont sélectionnées sur un milieu en présence d'un agent de sélection (antibiotique) dont la nature dépend du plasmide utilisé. La présence de la séquence d'intérêt dans le plasmide porté par les bactéries sélectionnées est évaluée par PCR avec des amorces désignées sur les sites att. La discrimination s'effectue sur la taille de l'amplifiat. Après extraction du plasmide, la séquence du fragment cloné est déterminée par séquençage.

3. Préparation et transformation des bactéries électrocompétentes.

Les bactéries *E. coli* TOP10 sont étalées sur un milieu LB solide additionné de streptomycine (30µg/mL), et incubées pendant une nuit à 37°C. Une colonie est ensemencée dans 10 mL de milieu LB. La préculture a lieu en milieu liquide sous agitation (200 rpm) pendant une nuit à 37°C. Deux cents mL de milieu LB sont ensemencés avec 2

mL de la préculture. L'incubation est réalisée dans les mêmes conditions que précédemment jusqu'à l'obtention d'une DO_{600nm} de 0,5. Toutes les étapes suivantes consistent en des cycles de centrifugations (10 min, 1800 g) et de remises en suspension du culot bactérien dans une solution de glycérol 10% (v/v). Toutes ces étapes sont réalisées à 4°C afin d'éviter les chocs thermiques. Les culots sont repris successivement dans des volumes décroissants de 60 mL, 20 mL, 10 mL et 400 µL. Des aliquots de 40 µL de cette préparation sont immédiatement congelés dans de l'azote liquide et conservés à -80°C.

La transformation est effectuée par électroporation en utilisant le Micropulser™ (BioRad). Quarante µL de bactéries électrocompétentes sont décongelés dans la glace et additionnés à une fraction du mélange de recombinaison ou à une certaine quantité de plasmides. Le mélange, placé dans une cuve à électroporation (fente 1 mm), est soumis à une impulsion électrique de 1800 Volt en 5 millisecondes, fournie par le générateur. Les bactéries sont ensuite immédiatement incubées dans 500 µL de milieu LB, sous agitation (200 rpm), pendant 45 min à 37°C. Une fraction de la culture est étalée sur du milieu LB solide additionné de l'antibiotique de sélection approprié.

La préparation de bactéries *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 électrocompétentes et leur transformation sont réalisées selon le même protocole. Les agrobactéries sont cultivées en présence de chloramphenicol (10 µg/mL) et de rifampicine (10 µg/mL).

Les bactéries BL21-AI™ sont transformées par choc thermique selon le protocole fourni. Après une incubation des bactéries en présence de l'ADN plasmidique durant 30 min dans la glace, un choc thermique à 42°C durant 30 secondes est réalisé puis le mélange est immédiatement placé dans la glace. Les bactéries sont ensuite reprises dans 250 µL de milieu LB liquide puis incubées 30 min à 37°C avant d'être étalées sur milieu sélectif.

4. Préparation et transformation des levures thermocompétentes.

Le système «ProQuest™ Two-Hybrid System with Gateway® Technology» (Invitrogen) a servi pour le criblage de la banque d'ADNc réalisée à partir de jeunes fruits. La transformation de la souche MaV203 se fait par choc thermique en présence d'agents chaotropiques, de polyéthylène glycol (PEG) et d'acétate de lithium (LiAc). Le mélange contenant 250 µL de la suspension de levures, 10 µg du plasmide pDEST32 portant la séquence codante de la protéine «appât», 10 µg de la banque d'ADNc et 1,5 mL de la solution PEG/LiAc fournie (Invitrogen) est incubé 30 min à 30°C. Le choc thermique est réalisé après ajout de 88 µL de diméthylsulfoxyde (DMSO) à 42°C durant 20 min. Une étape de centrifugation durant 5 min à 640 g permet de séparer les levures des éléments du mélange précédent. Le culot est repris dans 8 mL de NaCl 0,9%. Les levures sont ensuite déposées sur milieu SD dépourvu de leucine, tryptophane, et histidine (SD-LTH) et

complémenté en 3-Amino-1,2,4-triazole (3AT) permettant d'évaluer la force d'interaction entre les partenaires protéiques «appât»/«cible» et d'éliminer les possibilités d'interactions aspécifiques.

Pour la recherche d'interactions potentielles avec une protéine cible connue, la technique de double hybride ciblé est mise en œuvre. Les levures MaV203 sont étalées sur milieu YPAD et incubées 3 jours à 30°C. Une colonie isolée est mise en culture dans 10 mL de milieu YPAD liquide. Cette culture est incubée durant la nuit à 30°C sous agitation (200 rpm). La concentration en levures de la culture est évaluée avec une cellule de Malassez et un volume de cette préculture contenant 2,5 x 10^8 cellules est utilisé pour ensemencer 50 mL de milieu YPAD. Cette nouvelle culture est incubée durant 3-4 heures à 30°C sous agitation jusqu'à l'obtention d'une concentration de 2 x 10^7 cellules par mL. Après une centrifugation à 1000 g durant 5 min, le culot est repris dans 25 mL d'H2O avant d'être centrifugé dans les mêmes conditions. Le culot est repris dans 3 mL d'acétate de lithium. La suspension est incubée 15 min à 30°C sous agitation. Cette solution est centrifugée de la même manière que précédemment et le culot est repris dans le mélange de transformation contenant 2,4 mL de PEG 3350 50% (p/v); 360 µL de LiAc 1M; 500 µL d'ADN de sperme de saumon à 2 mg/mL et 280 µL d' H_2O puis cette suspension est répartie en volume de 354 µL dans 10 tubes eppendorf contenant chacun 6 µL d'un mélange des deux plasmides utilisés pour la transformation. Les préparations sont incubées au bain marie avant de subir le choc thermique durant 20 min à 42°C. Après une centrifugation de 5 min à 3000 rpm, chaque culot est repris dans 500 µL d' H_2O avant d'être déposé sur milieu sélectif SD-LT.

5. Réaction de transcription inverse (RT).

La synthèse des ADN complémentaires (ADNc) à partir d'une population d'ARN est réalisée selon le protocole fourni par le fournisseur (Biorad). Un microgramme d'ARN dans un volume de 15 µL par échantillon est incubé 5 min à 75°C avant d'être rapidement mis dans la glace. Chaque échantillon est additionné de 4 µL du mélange réactionnel iScript 5X et de 1 µL de la transcriptase inverse iScript. Le mélange réactionnel est incubé suivant le programme comprenant 5 min à 25°C, 30 min à 42°C et 5 min à 85°C réalisé dans un thermocycleur (PTC-100 ; MJResearch).

6. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR).

Les réactions de PCR sont réalisées soit en présence d'ADN génomique (0,1 µg), soit d'ADN plasmidique (0,1 ng), soit d'un mélange d'ADNc, soit directement sur colonies bactériennes.

Mélange réactionnel.

Les réactions de PCR sont réalisées dans un mélange réactionnel de 25 µL contenant 5 µL de tampon de réaction 5X, 0,5 µL de chacune des amorces à 100 µM, 0,25 µL de dNTP (20 mM), 1,25 unités de GoTaq® DNA Polymerase (Promega).

Pour réaliser les différents clonages décrits précédemment, la Taq «haute-fidélité» DNA Polymerase IProof® (Biorad) (0,5 µL, 1 unité) est utilisée en présence de 10 µL de tampon de réaction 5X, 2,5 µL de chacune des amorces (100 µM) et de 0,5 µL de dNTP (20 mM).

Conditions de PCR.

Les réactions d'amplification sont réalisées dans un thermocycleur (PTC-100; MJResearch). Les échantillons subissent une étape initiale de dénaturation de 3 min à 94°C ou 98°C, puis les mélanges réactionnels sont soumis à des cycles d'amplification comprenant une étape de dénaturation des matrices de 30 s à 94°C (ou 10 s à 98°C pour la polymérase iProof®), une étape d'hybridation de 30 s à une température adaptée aux amorces utilisées et une étape de synthèse d'ADN à 72°C dont la durée varie selon la taille de la molécule d'ADN à amplifier et selon la polymérase (1 minute/kb pour la GoTaq® et 15 secondes/kb pour la IProof®). Les réactions de PCR sont achevées par une étape de 5 min à 72°C.

7. PCR en temps réel.

Cette réaction se fait en présence de SYBR® Green, un agent intercalant de l'ADN fluorescent, qui permet d'évaluer l'accumulation d'ADN double brin à chaque nouveau cycle PCR. Les longueurs d'ondes maximales d'excitation et d'émission de ce fluorophore sont respectivement 497 nm et 520 nm. L'enregistrement en temps réel de la fluorescence émise permet de suivre la réaction PCR principalement pendant la phase exponentielle c'est-à-dire quand le signal détecté est proportionnel à la quantité d'ADN présente.

Chaque mélange réactionnel correspond à 5 µL d'ADNc dilué au 50ème dans un volume total de 25 µL contenant 12,5 µL de pré-mix iQ^{TM} SYBR® Green Supermix (Biorad) et 0,4 µM d'oligonucléotides (**tableau 3**). Les réactions sont réalisées dans un thermocycleur «iCycle Optimal System» (Biorad). Pour chaque échantillon, un triplicata technique est réalisé. Le programme d'amplification correspond à une dénaturation initiale de 3 min à 95°C et à une succession de 40 cycles comprenant une dénaturation de 15 sec à 95°C et une étape de 25 sec à 60°C afin de permettre l'hybridation des oligonucléotides et la synthèse d'ADN. La dernière étape consiste à une augmentation graduelle de la température de 65 à 95°C par pallier de 0,5°C toutes les 5 sec afin de tracer la courbe de fusion du produit amplifié. L'allure de la courbe renseigne sur la présence d'un ou plusieurs produits d'amplification.

NOM	SEQUENCE	GENE CIBLE
QAtEF1FW	GTGAAGAAGGGTGCCAAATG	AtEF1α
QAtEF1REV	GCTCAAACGCCATCAAAGTT	
QAtTUBFW	AACGCTGACGAGTGTATGGTTTT	AtTubuline
QAtTUBREV	CCAAAGGTAGGATTAGCGAGCTT	
QTerm6S	ATATCCCGCGGCCATGCTA	Terminateur 6
QTerm6AS	TCCCTTATCTGGGAACTACTCACA	
QMIF1FW2	GTTGATACTGAGGTTGTTTGTG	AtMIF1
QMIF1REV2	CTATAGATATAGATGGGCGGT	
QMIF2FW2	TTGGGGTTTGAGAATGTTCAG	AtMIF2
QMIF2REV2	CCCAACCAGAATACAAATCAAA	
QMIF3FW1	TCGGGAGATCAGTTTACGAAG	AtMIF3
QMIF3REV1	ACGGACGTTGCTTGAAGAAG	
QAJH1FW1	CAGATCCAGAGCCCCATGATT	AtAJH1
QAJH1REV1	TAAACCGGGTCAAACCGATA	
QAJH2FW2	CAAATCTCCCACTGACTCGT	AtAJH2
QAJH2REV2	GAAAGGACAACAAATGATGGGT	
QWUSFW2	TGAAGATCACATCAACGGTGG	AtWUS
QWUSREV2	AGCATAGTTGTGAACATACGAG	
QSTKFW1	CATGCATCTGGGGATTCTTT	AtSTK
QSTKREV1	TGAAGGACCAATACCTTCATTG	
QSHPFW1	GGTACAAGAAAGCTTGYTCC	AtSHP1/2
QSHPREV1	TACTGAGTATTAGCTTCGGTG	
GAIFW	CACCTCGGCTTGGAAACTCTC	AtGAI
GAIREV	TGACAAAGGGAAAAACAGTAGGATTT	
RGAFW	AATAGTGGCCAAGGTTATCGTG	AtRGA
RGAREV	AGTGTGCCAACCCAACATC	

NOM	SEQUENCE	GENE CIBLE
RGL1FW	CAAGCATGTTGTTGGCACTT	AtRGL1
RGL1REV	GCAACAAACAACCTTCATTCTCT	
RGL2FW	CTGCGTTTCCAAAGGAAGAG	AtRGL2
RGL2REV	GTCGGATCCTCTTGCTGCTA	
RGL3FW	GAAACGAAGCCATCAAGAAACG	AtRGL3
RGL3REV	CCACCACCACCACAACCAT	
LHB1B1FW	ATGGGAGCTGTTGAGGGCTA	AtLHB1B1
LHB1B1REV	AGCTCCCACCTGGGTAAAGC	
LHCB2.2FW	CGTCAAGTCTACTCCCCAAAG	AtLHCB2.2
LHCB2.2REV	TCTCCGAGAATGGTCCCAAG	
QSlACTFW	GGACTCTGGTGATGGTGTTAG	SlActine
QSlACTREV	CCGTTCAGCAGTAGTGGTG	
QSleiF4FW	AGTGGACGATTTGGAAGGAAG	SleiF4a
QSleiF4REV	GCTCCTCGATTACGACGTTG	
QIMAFW1	TTCCCTATTTGGAAGCTTGTGT	SlIMA
QIMAREV2	CGATTTCACACCTTATTCACAC	
QCSNAFW1	CGATGGTCGAAACCTGAATAG	SlCSN5a
QCSN5AREV1	CACCCCTTGGGACCTACATA	
QCSN5BFW3	CAAGTCACAGACGGAATCCT	SlCSN5b
QCSN5BREV3	AAACTATCACCTCTTTGTAGGCTG	

Tableau 3: Amorces utilisées pour la PCR en temps réel.

Les niveaux d'expression des gènes d'intérêt sont normalisés par rapport aux niveaux d'expression de gènes de référence, *SlACTINE* et *SleiF4A* pour la tomate et *AtTUBULINE* et *AtEF1α* pour Arabidopsis. Les résultats sont donc exprimés en unité arbitraire d'expression relative.

8. Electrophorèse des ADN.

L'ADN plasmidique ou les produits issus d'amplification PCR sont analysés par électrophorèse non dénaturante en gel d'agarose (1,5% (p/v)) dans du tampon TAE (20 mM Tris HCl pH8, 0,5 mM (Na2)EDTA, 2,5 mM acétate de sodium). Les échantillons sont additionnés de 0,2 volume de tampon de charge (glycérol 50% (v/v), bleu de bromophénol 0,25% (p/v), xylène cyanol 0,25% (p/v), (Na2)EDTA 20 mM). L'ADN est visualisé sous lumière noire instantanément grâce au GelGreen™ (Biotium) ajouté au gel d'agarose.

9. Séquençage.

Le séquençage des fragments d'ADNg, d'ADNc isolés et de plasmides a été réalisé à l'aide d'un séquenceur automatique par la société Génome Express. Les résultats de séquençage sont analysés avec le logiciel Bioedit (Tom Hall, Ibis Therapeutics, Carlsbad, CA).

III Etude des interactions protéines-protéines par la technique de double-hybride.

La technique est basée sur la capacité à séparer les activateurs de la transcription eucaryote en deux domaines distincts : le domaine de liaison à l'ADN ou "*Binding Domain*" et le domaine d'activation de la transcription ou "*Activating Domain*". L'étude de l'interaction entre deux protéines s'effectue en fusionnant l'une ou l'autre des protéines étudiées avec l'"*activating domain*" ou le "*binding domain*" de l'activateur de la transcription GAL4 de levure. L'activation de gènes rapporteurs sous la dépendance d'un promoteur contenant les séquences activatrices de la transcription UAGAL1 ou UASGAL4 ne peut être induite que lorsque les deux domaines de l'activateur de transcription sont réunis, donc lorsque les protéines étudiées interagissent entre elles (**figure 48**). Les souches de levure utilisées ont en commun d'avoir intégré dans leur génome deux gènes rapporteurs sous la dépendance des séquences régulatrices précédemment citées : le gène *HIS3* et le gène codant pour la ß-galactosidase (*lacZ*). Le criblage des interactions protéiques se fera alors par analyse de l'auxotrophie des levures vis-à-vis de l'histidine. Les interactions protéiques peuvent être quantifiées par mesure de l'activité de la ß-galactosidase. Les constructions des vecteurs, la transformation des levures ainsi que les méthodes de culture des levures sont décrites dans

les **paragraphes I** et **II** de ce chapitre. Les étapes successives de ces analyses sont décrites dans les paragraphes suivants.

1. Evaluation du phénomène d'auto-activation des protéines.

Il convient de vérifier que la protéine étudiée n'est pas capable d'activer seule la transcription des gènes rapporteurs. En effet la protéine appât, pour laquelle un partenaire protéique fusionné au domaine de fixation à l'ADN est recherché, peut entraîner l'activation de l'expression du gène rapporteur.

Cette vérification s'effectue en cotransformant des levures avec la construction correspondant à la protéine appât fusionnée au "*binding domain*" et une construction contrôle contenant uniquement l'"*activating domain*". Des levures transformées avec des protéines connues pour interagir ou non entre elles peuvent être utilisées respectivement comme contrôles positif et négatif. Les levures sont ensuite cultivées à 30°C pendant 2 à 3 jours en présence de différentes concentrations de 3-AT. L'utilisation de la souche de levure MaV203 nécessite de tester des concentrations de 3-AT dans une gamme de 10 à 100 mM. Il est nécessaire de tester les cotransformants contrôles sur des concentrations de 3-AT correspondantes à la concentration minimale induisant une absence de croissance des cotransformants testés.

2. Criblage des interactions protéiques.

La sélection des levures cotransformées s'effectue par repiquage des colonies se développant après l'étape de transformation sur milieu sélectif SD-LTH complémenté en 3-AT. Trois concentrations en 3-AT, 25, 50 et 75 mM sont testées. Pour cela, trois colonies pour chaque transformation sont remises en suspension dans 30 µL d'eau stérile avant d'être mises en culture pour une nuit dans 2 mL de SD-LT. La densité optique (DO) de ces cultures est mesurée en plaque pour un volume de 200 µL et des dilutions sont faites, d'une part pour ramener toutes les cultures à une seule et même DO soit 1 unité de DO, et d'autre part on réalise deux dilutions sériées au dixième. Une goutte de 3 µL de ces trois dilutions est alors déposée sur SD-LTH. Les boîtes sont ainsi mises à incuber à 30°C durant deux jours.

3. Vérification de la spécificité d'interaction.

Lorsqu'un clone positif d'interaction est isolé par criblage de la banque double hybride, les plasmides présents dans ces levures sont isolés comme décrit précédemment (**paragraphe II.1**). Un µL de l'ADN de levure extrait est utilisé pour transformer des bactéries électrocompétentes *E. coli* TOP10. La sélection des bactéries contenant l'ADN codant pour la protéine cible intégré dans le vecteur pEXP-AD502 est effectuée par étalement des bactéries transformées sur du milieu LB contenant 100 µg/ml d'ampicilline.

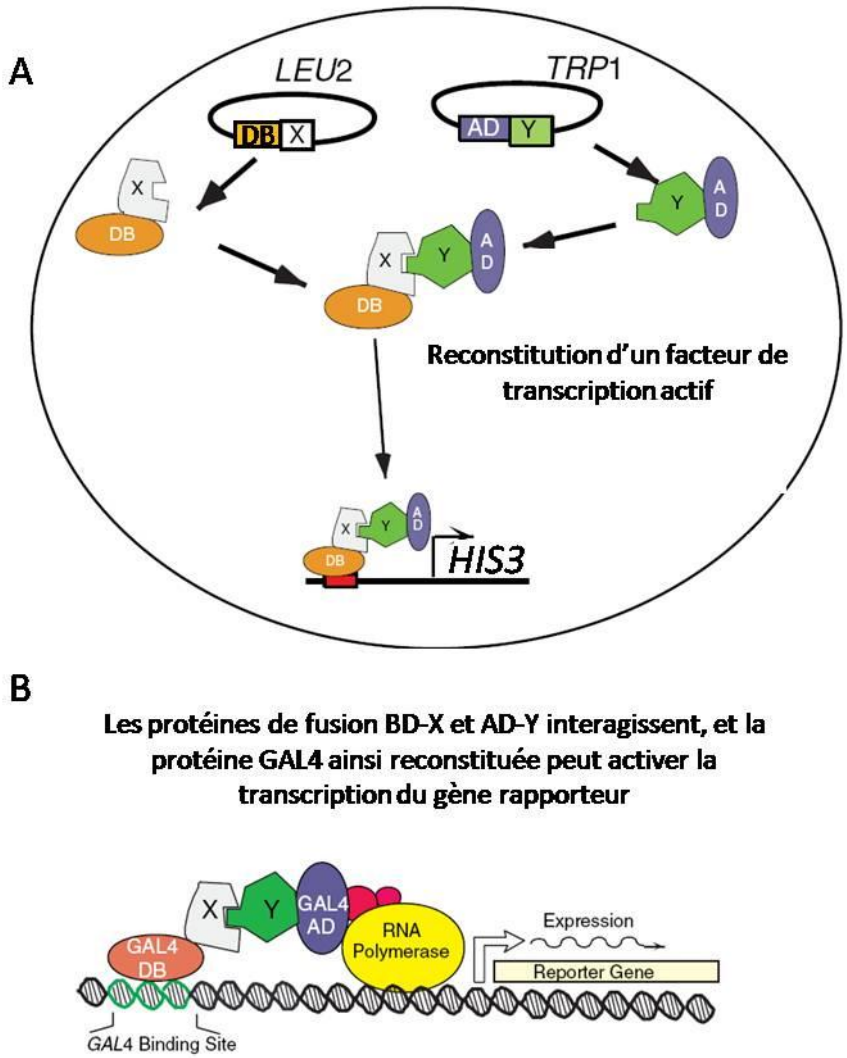


Figure 48: Schématisation du principe de détection des interactions entre protéines par le système double hybride.

Les plasmides codant pour deux protéines de fusion, l'une correspondant à la protéine X fusionnée au domaine de liaison à l'ADN de GAL4 (représenté en orange), et l'autre correspondant à la protéine Y fusionnée au domaine d'activation de la transcription de GAL4 (représenté en bleu), sont construits et introduits dans la levure.

L'interaction entre les deux protéines X et Y conduit à la reconstitution d'une protéine GAL4 fonctionnelle et donc à l'activation de la transcription du gène rapporteur, dont le promoteur contient un site de liaison à GAL4.

(*ProQuest™ Two-Hybrid System with Gateway® Technology, Instruction Manual, 2002*).

Après sélection des clones positifs par PCR, ces derniers sont amplifiés et l'ADN plasmidique est extrait puis l'insert présent est séquencé afin de déterminer l'identité du partenaire cible isolé. L'ADN plasmidique est utilisé pour transformer des levures avec la construction contenant la séquence de l'appât ou avec des plasmides contrôles permettant de vérifier que la protéine cible n'est pas capable d'interagir directement sur le "*Binding domain*" ou sur la séquence promotrice du gène rapporteur et donc d'activer à elle seule la transcription des gènes rapporteurs.

IV Méthodes d'analyse des protéines.

1. Production de protéines végétales recombinantes en système hétérologue bactérien.

Les protéines d'intérêt fusionnées en N-terminal avec l'étiquette His6 ou GST, ont été produites chez la souche BL21-AI d'*E. coli* en utilisant le protocole suivant. Une colonie bactérienne obtenue après l'étape de transformation est mise en culture dans 5 mL de milieu LB additionné de 100 µg/mL d'ampicilline durant la nuit à 37°C et sous agitation (150 rpm). La DO de la culture est déterminée à 600 nm et un volume correspondant à 0,1 unité de DO est prélevé afin d'ensemencer une culture de 20 mL de milieu LB additionné de 100 µg/mL d'ampicilline. Les bactéries sont donc remises en culture pour atteindre une DO de 0,4 à 600 nm. Un prélèvement de 1,5 mL de la culture est effectué afin de conserver un extrait bactérien non induit utilisé comme témoin négatif. La production de protéines est alors induite par ajout de 0,2% (p/v) d'arabinose dans le milieu de culture. Après un temps d'induction de 3 heures, les bactéries sont centrifugées durant 15 min à 8000 rpm pour les cultures de 20 mL induites et durant 2 min à 13000 rpm pour le témoin négatif. Les culots bactériens sont congelés dans l'azote liquide et placés à -20°C.

2. Extraction de protéines.

Extraction de protéines recombinantes à partir de cultures d'E. coli.

Le tampon utilisé pour cette extraction est recommandé par Invitrogen et contient 50 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4, pH 7.8; 400 mM NaCl; 100 mM KCl; 10% (v/v) glycérol; 0,5% (v/v) Triton X-100 et 10 mM imidazole.

Pour l'extraction des protéines recombinantes MIF2 et CSN5, le tampon décrit précédemment est complété avec 1% (v/v) sodium lauroyl sarcosinate, 1 mM PMSF, 1 mM DTT et 2 mg/mL lysozyme. Les culots précédemment congelés sont alors repris dans 3 mL de tampon. Les suspensions bactériennes sont incubées 30 min à 4°C sous agitation puis sont soumises à une sonication continue de 3 min dans la glace.

Les solutions ainsi obtenues sont ensuite centrifugées à 14000 rpm pendant 20 min à 4°C et les deux phases, culot et surnageant, sont séparées et conservées à -20°C.

Extraction de protéines à partir de tissus végétaux.

Extraction à partir de tissus d'Arabidopsis thaliana.

Les protéines sont en général extraites à partir de plantules âgées de 7 jours cultivées en conditions axéniques. Elles sont prélevées et aliquotées par lots de 100 à 200 mg avant d'être congelées dans l'azote liquide. Les tissus sont broyés en présence de billes de céramique Lysing matrix D (MP Biomedicals) de 1,4 mm de diamètre et de 100 µL de tampon de broyage (50 mM Tris HCl pH 7.5; 150 mM NaCl; 0,5% (v/v) Triton X-100; 1 mM PMSF et 1/100ème cocktail inhibiteur de protéase (Roche)) pour 100 mg de tissu. Le broyage s'effectue à l'aide du ribolyser durant 2 périodes de 20 secondes à vitesse maximale. Les échantillons sont refroidis dans la glace entre les deux périodes de broyage. Les échantillons sont ensuite centrifugés à 14000 rpm durant 8 min à 4°C. Les surnageants sont transférés dans de nouveaux tubes et centrifugés dans les mêmes conditions pour éliminer les débris résiduels. Les surnageants sont isolés dans des nouveaux tubes.

Extraction de tissus de tomate.

Les protéines sont aussi extraites de plantules de 7 jours cultivées dans les conditions décrites précédemment. Les plantules sont broyées dans l'azote liquide dans un mortier afin d'être réduites en poudre. Cent milligrammes de poudre sont dispersés dans 100 µL de tampon d'extraction (50 mM Tris HCl pH 7,2; 5 mM DTT; 1 mM PMSF; 3% (v/v) cocktail inhibiteur de protéases et 0,7% (p/v) Polyvinyl Pyrrolidone insoluble) par agitation durant 1 à 2 min. Les échantillons sont centrifugés à 20000 rpm durant 20 min à 4°C. Les surnageants sont transférés dans de nouveaux tubes.

Les protéines sont dosées par la méthode de Bradford (1976) en se référant à une solution de Sérum Albumine Bovine (BSA) comme standard.

3. Purification des protéines recombinantes.

Les protéines recombinantes isolées à partir d'extraits bactériens sont purifiées sur une colonne de nickel pour les protéines portant l'étiquette His6, ou sur une colonne de glutathion pour les protéines portant une étiquette GST. Dans le premier cas, le système de purification «HisPur^{TM} Ni-NTA purification» (Thermo Scientific) a été utilisé selon les recommandations du fournisseur. Dans le deuxième cas, une résine d'agarose liant le glutathion (Molecular Probes) a servi pour réaliser des colonnes de purification de 3 mL et la purification selon le protocole fourni.

4. Concentration des protéines.

Les protéines sont concentrées à l'aide d'une résine à base de silice, StrataClean™ (Stratagene). Dix microlitres de résine capable de fixer 100 µg de protéines sont ajoutés à l'extrait protéique. La préparation est agitée pendant 1 min puis centrifugée 2 min à 2000 rpm. Le surnageant est éliminé et le culot est repris dans 20 µL du tampon de charge utilisé pour l'électrophorèse des protéines.

5. Analyse des protéines par électrophorèse monodimensionnelle en conditions dénaturantes (SDS-PAGE).

L'électrophorèse est réalisée dans les conditions décrites par Laemmli (1970) modifiées dans les conditions suivantes.

Le gel de concentration est constitué de 5,4% (p/v) acrylamide; 0,18% (p/v) bisacrylamide; 125 mM Tris HCl pH 6.8; 0,1% (p/v) SDS; 2mM (Na2)EDTA; 0,5% (p/v) persulfate d'ammonium (APS) et 0,05% (p/v) TEMED. Le gel de séparation est composé de 10 à 15% (p/v) acrylamide; de 0,3 à 0,5% (p/v) bisacrylamide; 375 mM Tris HCl pH 8.8; 0,1% (p/v) SDS; 2mM (Na2)EDTA; 0,5% (p/v) persulfate d'ammonium (APS) et 0,05% (p/v) TEMED.

Des gels à 18% ont été utilisés pour la protéine IMA/MIF2 dont le poids moléculaire est de 10 kDa. Dans ce cas, 25% (v/v) d'éthylène glycol sont ajoutés lors de la préparation du gel de séparation et le rapport acrylamide/bisacrylamide est de 19:1 et non 29:1 comme dans les autres cas.

Vingt à cinquante microgrammes de protéines sont prélevés et mélangés au tampon de charge composé de 80 mM Tris HCl pH 6.8; 2% (p/v) SDS; 17% (v/v) glycérol; 0,05% (p/v) bleu de bromophénol et 3% (p/v) DTT. La préparation est incubée à 90-100°C pendant 5 min puis déposée sur le gel. Un marqueur de taille PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas) est déposé afin d'évaluer la taille des protéines associées aux bandes observées. La migration s'effectue en utilisant le système d'électrophorèse «Mini-PROTEAN® II Cell» (Biorad) dans le tampon de migration (Tris 25mM, (Na2)EDTA 1 mM, glycine 196 mM et SDS 0,1% (p/v)) à un voltage compris entre 25 et 100V en fonction de la migration désirée.

Le système XCell *SureLock*™ Mini-Cell (Invitrogen) a également été utilisé avec les gels précoulés NuPAGE® Novex® Bis-Tris à gradient d'acrylamide de 4 à 12%.

6. Révélation des protéines au bleu de Coomassie.

Après l'électrophorèse, les protéines sont fixées et colorées par immersion du gel pendant 30 min dans une solution contenant 45% (v/v) méthanol, 10% (v/v) acide acétique et

ANTIGENE	ANTICORPS	FOURNISSEUR
AtCSN5	Polyclonal de lapin	Enzo® Life Sciences
AtCSN4	Polyclonal de lapin	Enzo® Life Sciences
HsNEDD8	Polyclonal de lapin	MBL
B. taurus Ubiquitine	Monoclonal de souris	Cell Signaling Technology®
A. Victoria GFP	Fraction purifiée d'IgG de lapin	Invitrogen™
Pentapeptide d'histidine	Monoclonal de souris	Qiagen®
M. musculus GST	Monoclonal de souris	Sigma®

Tableau 4: Anticorps commerciaux utilisés.

0,25% (p/v) bleu de Coomassie R250. Le gel est ensuite décoloré dans une solution contenant 45% (v/v) méthanol et 10% (v/v) acide acétique.

7. Analyse par Western blot.

Electrotransfert des protéines sur membrane.

Afin de visualiser un profil protéique précis, les protéines sont transférées sur une membrane de Polyvinylidène Difluoride, PVDF (Pall® Life Sciences). Cette membrane est trempée dans du méthanol, rincée dans de l'eau avant d'être incubée 5 min dans le tampon de transfert (Tris 25 mM, glycine 196 mM, 20% (v/v) méthanol. L'électrotransfert s'effectue à l'aide du système «Mini Trans-Blot cell» (Biorad).à un ampérage de 350 mA durant environ 1 heure selon la taille des protéines que l'on souhaite observer.

Un autre système, l'iBlot™ Dry Blotting (Invitrogen), a aussi été utilisé permettant un transfert rapide (7 min) selon les recommandations du fournisseur.

Production d'anticorps et liste des anticorps commerciaux utilisés.

Trois anticorps polyclonaux ont été réalisés afin de permettre la révélation des protéines culline 1 et culline 3 d'Arabidopsis et IMA/MIF2 de tomate et d'Arabidopsis respectivement. Ces anticorps sont obtenus à partir d'un programme d'immunisation de lapin en 28 jours effectué par la société Eurogentec et sont dirigés contre deux peptides pour chaque protéine concernée. Ces peptides sont en notés en gras et en italique sur les séquences peptidiques ci-dessous:

AtCUL1:

MERKTIDLEQGWDYMQTGITKL***KRILEGLNEPAFDSE***QYMMLYTTIYNMCTQKPPHDYSQQLYDKYREAFEEYIN STVLPALREKHDEFMLRELFKRWSNHKVMVRWLSRFFYYLDRYFIARRSLPPLNEVGLTCFRDLVYNELHSKVK

AtCUL3:

MSNQKKRNFQIEAFKHRVVVDPKYADKTWQILERAIHQIYNQDASGLSFEELYRNAYNMVLHKFGEKLYTGFIAT MTSHLKEKSKLIEAAQGGSF***LEELNKKWNEHNKAL***EMIRDILMYMDRTYIESTKKTHVHPMGLNLWRDNVVHFT K

SlIMA:

MKKVLRRNDYSRNSTNSS***FTMRRVRYVECQRNH***AASVGGYVIDGCREYMPEGTTSGTLNCAA***CGCHRNFHRREV ETD***VASECTSASSTTK

Les anticorps sont purifiés par la société sur une matrice contenant le peptide immunogène. D'autres anticorps ont été utilisés et sont listés dans le **tableau 4**.

Immunodétection des protéines sur membrane PVDF.

Le kit Invitrogen™ «WesternDot™ 625 Goat anti-rabbit or mouse Western Blot» a été utilisé au cours de cette étude. Il s'agit d'un système où l'anticorps secondaire de chèvre est

biotinylé et la révélation s'effectue grâce à l'ajout de nanocristaux ayant des caractéristiques spectrales particulières fixés à des molécules de streptavidine.

Après transfert des protéines sur la membrane de PVDF, une solution de saturation, la «WesternDot™ blocking buffer», ou une solution de TBS (Tris HCl 20 mM, NaCl 135 mM pH 7.6) supplémentée avec 3% (p/v) de lait écrémé en poudre et 0,2% (v/v) de Tween 20. L'ensemble est incubé durant 1 heure sous agitation et la membrane est rincée brièvement dans la solution de lavage du kit avant d'être incubée durant la nuit avec l'anticorps primaire dilué au 1000ème dans la solution de lavage, incubation se faisant sous agitation à 4°C. Suivent trois étapes successives de 5 min de lavage de la membrane avant l'incubation de celle-ci avec l'anticorps secondaire «Biotin-XX goat anti-rabbit/mouse IgG» dilué au 2000ème dans la solution de lavage. L'incubation de la membrane s'effectuera à température ambiante, sous agitation pendant 1 heure. La membrane est lavée 3 fois 5 min. La dernière étape consiste à incuber la membrane en présence des cristaux dilués au 2000ème dans la solution de saturation pendant 1 heure avec agitation. Après trois lavages de 5 min, la membrane est transférée dans de l'eau et visualisée sur un transilluminateur UV ayant un filtre de récupération permettant de recueillir le signal émis par les cristaux à 625 nm.

8. Analyse des protéines par chromatographie d'exclusion.

Les protéines des plantules d'*Arabidopsis thaliana* sont extraites tel que cela est décrit dans le **paragraphe IV.2** dans le tampon composé de 20 mM Tris HCl pH 7,4, 200 mM NaCl, 10% (p/v) glycérol, 1 mM PMSF et 1 mM β-mercaptoéthanol. Les protéines extraites sont séparées selon leur poids moléculaire sur une colonne Superdex™ 200 10/30 (Amersham Biosciences) composée d'une matrice composite d'agarose et de dextran. Cette colonne permet de séparer les protéines de poids moléculaire allant de 10 à 600 kDa. Après passage des 7 mL correspondant au volume mort de la colonne, les protéines contenues dans un volume d'environ 100 µL sont injectées dans la colonne et sont séparées selon un flux de 0,15 à 0,3 mL/min. En sortie de colonne, les densités optiques à 280 nm (absorption de l'acide aminé tryptophane), à 254 nm (absorption bases nucléotidiques) et à 215 nm (absorption liaison peptidique) sont enregistrées et permettent d'émettre un profil d'élution de l'extrait protéique. Les fractions sont collectées dans des plaques 96 puits à raison de 250 µL par puits.

Les fractions correspondant à chaque pic d'élution sont rassemblées et les protéines contenues dans ces fractions sont concentrées avec la résine StrataClean™ (Stratagene). La résine sur laquelle sont fixées les protéines est lavée deux fois, d'abord avec 200 µL de 20 mM Tris HCl pH 7,4 puis avec 200 µL de 50 mM bicarbonate d'ammonium. Les protéines fixées sur la résine sont analysées par la Plateforme Protéome CGFB (Bordeaux).

Après digestion par la trypsine diluée dans 50 mM bicarbonate d'ammonium durant une nuit à 37°C, les protéines sont séquencées par spectrométrie de masse.

V Méthodes de transgénèse et de sélection des plantes transgéniques.

1. Transgénèse et sélection des plantes d'*Arabidopsis thaliana*.

Transformation stable d'Arabidopsis.

Cette transformation est réalisée selon le protocole de Clough et Bent (1998). Les plants d'Arabidopsis Col-0 sont cultivés en terre jusqu'à l'obtention de hampes florales d'une dizaine de centimètres.

Les bactéries *A. tumefaciens*, contenant le plasmide recombinant d'intérêt, sont mises en culture jusqu'à ce qu'elles atteignent une DO_{600nm} entre 0,6 et 1. Ces cultures sont alors centrifugées à 5000 g pendant 10 min à 4°C et le surnageant est éliminé. Les culots bactériens sont alors repris dans une solution de transformation composée de milieu MS 1/2 et de glucose 5% (p/v) de façon à obtenir une DO_{600n}m de 0,8. La suspension bactérienne est additionnée de tensioactif Silwett L77 0,05% (v/v). Les hampes florales sont ensuite trempées pendant 30 secondes dans cette solution puis gardées en atmosphère humide et à l'obscurité durant 24h avant d'être remises en culture jusqu'à l'obtention des graines.

Etude de la ségrégation du transgène.

Les graines stérilisées des plantes transgéniques sont semées sur du milieu MS ½ additionné de 50 µg/mL de kanamycine. Les proportions respectives de plantules résistantes et de plantules sensibles permettent d'estimer le nombre de loci d'insertion du marqueur de sélection présent sur l'ADN-T. Les plantes étudiées ici ont présenté des descendances composées de ¾ de plantes résistantes pour ¼ de plantes sensibles indiquant la présence d'un seul loci d'insertion pour le marqueur de sélection.

Sélection des plantes transgéniques.

Les plantes transformées et sélectionnées sur antibiotique sont analysées par PCR et RT-PCR en temps réel pour vérifier respectivement l'insertion du transgène dans le génome de la plante et le niveau de transcription des ARNm correspondants.

2. Transformation transitoire des épidermes d'oignon et des hypocotyles de moutarde par biolistique.

Le protocole utilisé est issu de la méthode décrite par Varagona *et al*. (Varagona, et al. 1992). Pour cela, 5 µg d'ADN plasmidique sont mélangés à 25 µL d'une solution d'éthanol 50% contenant des microparticules d'or (1,6 µm de diamètre) à 0,25 mg/µL puis à 25 µL de $CaCl_2$ 2,5 M et à 10 µL de spermidine 0,1 M afin de précipiter l'ADN sur les billes d'or.

Milieu	Composition
Milieu K4	Gamborg B5 (Duchefa) 3,19 $g.L^{-1}$ saccharose 0,4M pH 5,7
Milieu K3	Gamborg B5[1] saccharose 0,3M pH 5,7
Solution W5	NaCl 154 mM $CaCl_2$ 125 mM KCl 5 mM Glucose 5 mM pH 5,7
Milieu MMM	Mannitol 0,5M MES 0,1% (p/v) $MgCl_2$ 15 mM

Tableau 5: Composition des solutions et milieux utilisés pour l'isolation et la transformation des protoplastes.

Cette préparation est vortexée 3 min puis abandonnée pendant 10 min afin que les particules sédimentent. Cette étape est complétée par une centrifugation très brève. Le surnageant est éliminé. Les particules d'or sont dispersées dans 200 µL d'éthanol 70%. L'étape de sédimentation est répétée puis les particules sont dispersées dans 200 µL d'éthanol absolu. Après une étape de sédimentation, les particules d'or sont dispersées dans 25 µL d'éthanol absolu. Huit microlitres de la suspension sont déposés au centre d'un disque «macrocarrier». Ce dernier est placé sous un flux d'air afin d'entrainer l'évaporation complète de l'éthanol.

Les épidermes d'oignon sont prélevés sur les écailles les plus internes du bulbe et déposés, face supérieure au contact avec le milieu MS supplémenté ou non avec 10 µM d'acide indole-acétique (AIA), ou 10 µM d'acide gibbérellique (GA_3), ou 10 µM d'acide abscissique (ABA) ou avec 100 µM de MG 132 (Z-Leu-Leu-Leu-al, SIGMA-Aldrich, France). Les graines de moutarde sont mises à germer à l'obscurité sur 4 couches de papier Whatmann imbibées d'eau durant 3-4 jours. Les hypocotyles doivent mesurer de 2 à 3 cm et les plantules sont fixées sur une lame de verre grâce à une colle chirurgicale en ne collant sur la lame que les hypocotyles. Quatre à cinq plantules sont ainsi fixées par lame de manière rapprochée.

La transformation des cellules s'effectue par biolistique à l'aide du canon à particules PDE-1000He (Biorad) sous une pression de 710 mm Hg grâce à l'utilisation d'un disque de rupture correspondant à une pression d'hélium de 1100 psi et à une distance de 6 cm. Après cette étape, les épidermes d'oignon sont incubés à 28°C à l'obscurité pendant 12 à 24 h avant d'observer la fluorescence. Les hypocotyles de moutarde sont conservés verticalement dans l'eau de sorte à ce que les racines uniquement soient recouvertes d'eau et à l'obscurité. Les observations sur hypocotyles de moutarde s'effectuent 4 à 5 heures après transformation.

3. Transformation de protoplastes de tomate.

Les solutions utilisées pour l'isolement et la transformation des protoplastes sont détaillées dans le **tableau 5**. Durant les différentes étapes qui vont suivre, toutes les centrifugations sont effectuées durant 5 minutes à 80 *g*.

Isolement des protoplastes.

Les protoplastes sont obtenus en conditions stériles à partir de mésophylle de feuilles provenant de plantules de tomate cultivées en conditions axéniques et âgées de 6 semaines, selon le protocole modifié de Paszkowski *et al*. (1984). Pour cela, les folioles sont placées dans une boîte de Pétri contenant 15 mL de milieu de digestion enzymatique [milieu K4 contenant 1,2% (p/v) de cellulase Onozuka R10 (Duchefa Biochemie B.V., Haarlem, The

Nederlands) et de 0,6% (p/v) de Macerozyme® R10 (Yakult Pharmaceutical, Tokyo, Japan]; l'épiderme inférieur en contact avec la solution de digestion. Les folioles sont incisées à l'aide d'un scalpel. La préparation est placée à 28°C durant 18 heures sans agitation puis agitée très doucement durant 30 minutes à température ambiante. Le milieu de digestion est alors filtré (140 µm), et chaque boîte de Pétri est rincée à l'aide de 5 mL de milieu K4. Le filtrat ainsi obtenu est réparti dans plusieurs tubes de telle façon que le volume de filtrat ne dépasse pas les 2/3 du volume du tube, puis un mL de solution W5 est déposé très doucement à la surface du filtrat. Les tubes sont alors centrifugés afin que les protoplastes remontent à l'interface entre le filtrat et le W5. Les protoplastes sont délicatement prélevés et transférés dans de nouveaux tubes. Deux lavages successifs sont ensuite réalisés, à l'aide de 5 volumes de solution W5. Après le dernier lavage, le surnageant est éliminé, et 5 volumes de W5 sont ajoutés dans chaque tube. Les protoplastes sont incubés durant deux heures à 4°C à l'obscurité. Les protoplastes sont dénombrés en déposant 20 µL de la suspension dans une cellule de Malassez.

Transformation des protoplastes.

Les tubes contenant la suspension de protoplastes sont centrifugés. Après élimination du surnageant, la totalité des protoplastes est resuspendue dans du milieu MMM, de façon à obtenir une concentration finale de $2{,}5.10^6$ protoplastes/mL. Pour la transformation, 300 µL de protoplastes sont mis en présence de 10 µg d'ADN plasmidique et de 300 µL de la solution de transformation (PEG6000 40% (p/v), mannitol 0,4 M, $Ca(NO_3)_2$ 0,1 M pH8). Cette préparation est incubée durant 5 minutes à température ambiante. Deux mL de milieu K3 sont ensuite ajoutés très doucement au mélange précédent. La suspension de protoplastes est incubée durant deux heures à 26°C à l'obscurité puis additionnée de 5 volumes de milieu W5. Après centrifugation, le surnageant est éliminé, et les protoplastes sont resuspendus dans 3 mL de milieu K3 avant d'être incubé à 25°C pendant 16 heures à l'obscurité.

VI Méthodes d'analyse des plantes et tissus transgéniques.

1. Etude de la sensibilité des plantes d'Arabidopsis vis-à-vis de divers régulateurs de croissance.

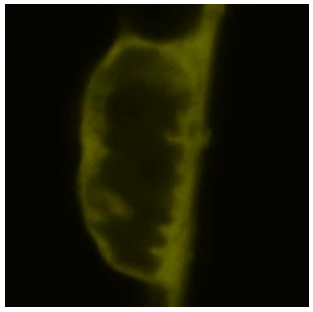
Cela consiste à observer les caractéristiques morphologiques de plantules âgées de 7 jours issues de graines ayant germées sur divers milieux. Les conditions testées sont: absence/présence de lumière et présence d'auxine (AIA) ou d'acide gibbérellique (GA_3) à une concentration de 10 µM. Les paramètres mesurés sont la taille des hypocotyles et des racines. Pour chaque lignée transgénique, une cinquantaine d'individus ont été étudiés.

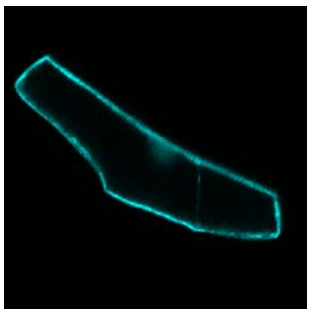
2. Observation de la localisation subcellulaire, et de l'interaction *in vivo* par BiFC en microscopie.

Les épidermes d'oignon et les protoplastes de mésophylle de tomate sont déposés entre lame et lamelle dans de l'eau en ce qui concerne l'oignon et les observations se font à l'aide d'un microscope à balayage laser confocal (Leica).

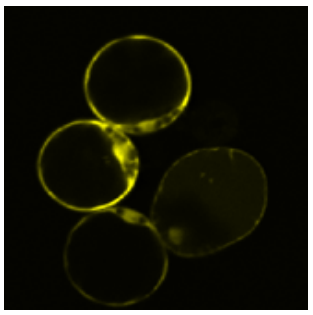
Les longueurs d'onde d'excitation de la CFP et de la YFP sont respectivement 458 et 514 nm. Les fenêtres d'émission de ces deux fluorochromes se situent entre 465 et 500 nm pour la CFP et entre 525 et 600 nm pour la YFP.

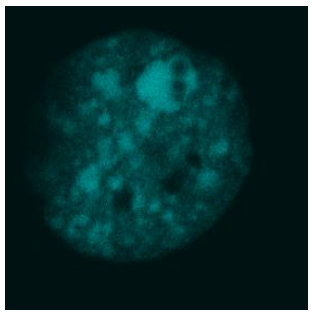






BIBLIOGRAPHIE







BIBLIOGRAPHIE

Abe, M., et al.

2005 FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex. Science 309(5737):1052-6.

Achard, P., et al.

2006 Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals. Science 311(5757):91-4.

Aida, M., T. Ishida, and M. Tasaka

1999 Shoot apical meristem and cotyledon formation during Arabidopsis embryogenesis: interaction among the CUP-SHAPED COTYLEDON and SHOOT MERISTEMLESS genes. Development 126(8):1563-70.

Alabadi, D., et al.

2008 Gibberellins modulate light signaling pathways to prevent Arabidopsis seedling de-etiolation in darkness. Plant J 53(2):324-35.

Amasino, R.

2010 Seasonal and developmental timing of flowering. Plant J 61(6):1001-13.

Ambroggio, X. I., D. C. Rees, and R. J. Deshaies

2004 JAMM: a metalloprotease-like zinc site in the proteasome and signalosome. PLoS Biol 2(1):E2.

Balanza, V., et al.

2006 Patterning the female side of Arabidopsis: the importance of hormones. J Exp Bot 57(13):3457-69.

Baurle, I., and T. Laux

2003 Apical meristems: the plant's fountain of youth. Bioessays 25(10):961-70.

Bech-Otschir, D., M. Seeger, and W. Dubiel

2002 The COP9 signalosome: at the interface between signal transduction and ubiquitin-dependent proteolysis. J Cell Sci 115(Pt 3):467-73.

Beveridge, C. A., J. J. Ross, and I. C. Murfet

1996 Branching in Pea (Action of Genes Rms3 and Rms4). Plant Physiol 110(3):859-865.

Blazquez, M. A., et al.

1998 Gibberellins promote flowering of arabidopsis by activating the LEAFY promoter. Plant Cell 10(5):791-800.

Brand, U., et al.

2000 Dependence of stem cell fate in Arabidopsis on a feedback loop regulated by CLV3 activity. Science 289(5479):617-9.

Brewer, P. B., et al.

2004 PETAL LOSS, a trihelix transcription factor gene, regulates perianth architecture in the Arabidopsis flower. Development 131(16):4035-45.

Brukhin, V., et al.

2003 Flower development schedule in tomato Lycopersicon esculentum cv. sweet cherry. Sex Plant Reprod 15:311-320.

Buechel, S., et al.

2010 Role of A-type ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATORS in meristem maintenance and regeneration. Eur J Cell Biol 89(2-3):279-84.

Burkle, L., et al.

2003 Transport of cytokinins mediated by purine transporters of

the PUP family expressed in phloem, hydathodes, and pollen of Arabidopsis. Plant J 34(1):13-26.

Calderon-Villalobos, L. I., et al.

2010 Auxin perception--structural insights. Cold Spring Harb Perspect Biol 2(7):a005546.

Carles, C. C., and J. C. Fletcher

2003 Shoot apical meristem maintenance: the art of a dynamic balance. Trends Plant Sci 8(8):394-401.

Chae, E., et al.

2008 An Arabidopsis F-box protein acts as a transcriptional co-factor to regulate floral development. Development 135(7):1235-45.

Chamovitz, D. A.

2009 Revisiting the COP9 signalosome as a transcriptional regulator. EMBO Rep 10(4):352-8.

Chamovitz, D. A., et al.

1996 The COP9 complex, a novel multisubunit nuclear regulator involved in light control of a plant developmental switch. Cell 86(1):115-21.

Cheminant, S., et al.

2011 DELLAs regulate chlorophyll and carotenoid biosynthesis to prevent photooxidative damage during seedling deetiolation in Arabidopsis. Plant Cell 23(5):1849-60.

Chen, H., et al.

2010 Arabidopsis CULLIN4-damaged DNA binding protein 1 interacts with CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC1-SUPPRESSOR OF PHYA complexes to regulate photomorphogenesis and flowering time. Plant Cell 22(1):108-23.

Chen, H., et al.

2006 Arabidopsis CULLIN4 Forms an E3 Ubiquitin Ligase with RBX1 and the CDD Complex in Mediating Light Control of Development. Plant Cell 18(8):1991-2004.

Chuang, H. W., W. Zhang, and W. M. Gray

2004 Arabidopsis ETA2, an apparent ortholog of the human cullin-interacting protein CAND1, is required for auxin responses mediated by the SCF(TIR1) ubiquitin ligase. Plant Cell 16(7):1883-97.

Clough, S. J., and A. F. Bent

1998 Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. Plant J 16(6):735-43.

Collett, C. E., N. P. Harberd, and O. Leyser

2000 Hormonal interactions in the control of Arabidopsis hypocotyl elongation. Plant Physiol 124(2):553-62.

Cope, G. A., and R. J. Deshaies

2006 Targeted silencing of Jab1/Csn5 in human cells downregulates SCF activity through reduction of F-box protein levels. BMC Biochem 7:1.

Cope, G. A., et al.

2002 Role of predicted metalloprotease motif of Jab1/Csn5 in cleavage of Nedd8 from Cul1. Science 298(5593):608-11.

Corbesier, L., et al.

2003 Cytokinin levels in leaves, leaf exudate and shoot apical meristem of Arabidopsis thaliana during floral transition. J Exp Bot 54(392):2511-7.

Corbesier, L., et al.

2007 FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of

Arabidopsis. Science 316(5827):1030-3.

Cortina, C, and F.A Culianez-Macia

2004 Tomato Transformation and Transgenic Plant Production. Plant Cell, tissue and organ culture 76(3):269-275.

Cowling, R.J., and N. P. Harberd

1999 Gibberellins control Arabidopsis hypocotyl growth via regulation of cellular elongation. J Exp Bot 50:1351-1357.

D'Aloia, M., et al.

2011 Cytokinin promotes flowering of Arabidopsis via transcriptional activation of the FT paralogue TSF. Plant J 65(6):972-9.

Davis, S. J.

2009 Integrating hormones into the floral-transition pathway of Arabidopsis thaliana. Plant Cell Environ 32(9):1201-10.

de Lucas, M., et al.

2008 A molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation. Nature 451(7177):480-4.

Depuydt, S., and C. S. Hardtke

2011 Hormone signalling crosstalk in plant growth regulation. Curr Biol 21(9):R365-73.

Dessau, M., et al.

2008 The Arabidopsis COP9 signalosome subunit 7 is a model PCI domain protein with subdomains involved in COP9 signalosome assembly. Plant Cell 20(10):2815-34.

Dharmasiri, N., S. Dharmasiri, and M. Estelle

2005a The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. Nature 435(7041):441-5.

Dharmasiri, N., et al.

2005b Plant development is regulated by a family of auxin receptor F box proteins. Dev Cell 9(1):109-19.

Di Sansebastiano, G.P, et al.

1998 Specific accumulation of GFP in a non-acidic vacuolar compartment via a C-terminal propeptide-mediated sorting pathway. The Plant Journal 15(4):449-457.

Dielen, A. S., et al.

2010 The ubiquitin/26S proteasome system in plant-pathogen interactions: a never-ending hide-and-seek game. Mol Plant Pathol 11(2):293-308.

Dill, A., et al.

2004 The Arabidopsis F-box protein SLEEPY1 targets gibberellin signaling repressors for gibberellin-induced degradation. Plant Cell 16(6):1392-405.

Dohmann, E. M., C. Kuhnle, and C. Schwechheimer

2005 Loss of the CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC9 signalosome subunit 5 is sufficient to cause the cop/det/fus mutant phenotype in Arabidopsis. Plant Cell 17(7):1967-78.

Dohmann, E. M., et al.

2008a The Arabidopsis COP9 signalosome is essential for G2 phase progression and genomic stability. Development 135(11):2013-22.

Dohmann, E. M., et al.

2008b Auxin responses in mutants of the Arabidopsis CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC9 signalosome. Plant Physiol 147(3):1369-79.

Dohmann, E. M., C. Nill, and C. Schwechheimer

2010 DELLA proteins restrain germination and elongation growth in Arabidopsis thaliana COP9

signalosome mutants. Eur J Cell Biol 89(2-3):163-8.

Doronkin, S., I. Djagaeva, and S. K. Beckendorf

2003 The COP9 signalosome promotes degradation of Cyclin E during early Drosophila oogenesis. Dev Cell 4(5):699-710.

Dreher, K., and J. Callis

2007 Ubiquitin, hormones and biotic stress in plants. Ann Bot 99(5):787-822.

Edwards, K., C. Johnstone, and C. Thompson

1991 A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. Nucleic Acids Res 19(6):1349.

Enchev, R. I., et al.

2010 Structural insights into the COP9 signalosome and its common architecture with the 26S proteasome lid and eIF3. Structure 18(4):518-27.

Favaro, R., et al.

2003 MADS-box protein complexes control carpel and ovule development in Arabidopsis. Plant Cell 15(11):2603-11.

Feng, S., et al.

2008 Coordinated regulation of Arabidopsis thaliana development by light and gibberellins. Nature 451(7177):475-9.

Feng, S., et al.

2004 Arabidopsis CAND1, an unmodified CUL1-interacting protein, is involved in multiple developmental pathways controlled by ubiquitin/proteasome-mediated protein Degradation. Plant Cell 16(7):1870-82.

Fleet, C. M., and T. P. Sun

2005 A DELLAcate balance: the role of gibberellin in plant morphogenesis. Curr Opin Plant Biol 8(1):77-85.

Furutani, M., et al.

2004 PIN-FORMED1 and PINOID regulate boundary formation and cotyledon development in Arabidopsis embryogenesis. Development 131(20):5021-30.

Gillaspy, G, H Ben-David, and W Gruissem

1993 Fruits: A Developmental Perspective. The Plant Cell 5:1439-1451.

Glickman, M. H., et al.

1998 A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3. Cell 94(5):615-23.

Gomez-Mena, C., et al.

2005 Transcriptional program controlled by the floral homeotic gene AGAMOUS during early organogenesis. Development 132(3):429-38.

Gomez-Roldan, V., et al.

2008 Strigolactone inhibition of shoot branching. Nature 455(7210):189-94.

Gomi, K., et al.

2004 GID2, an F-box subunit of the SCF E3 complex, specifically interacts with phosphorylated SLR1 protein and regulates the gibberellin-dependent degradation of SLR1 in rice. Plant J 37(4):626-34.

Gordon, S. P., et al.

2009 Multiple feedback loops through cytokinin signaling control stem cell number within the Arabidopsis shoot meristem. Proc Natl Acad Sci U S A 106(38):16529-34.

Gray, W. M., et al.

2001 Auxin regulates SCF(TIR1)-dependent degradation of AUX/IAA proteins. Nature 414(6861):271-6.

Griffiths, J., et al.

2006 Genetic characterization and functional analysis of the GID1 gibberellin receptors in Arabidopsis. Plant Cell 18(12):3399-414.

Groisman, R., et al.

2003 The ubiquitin ligase activity in the DDB2 and CSA complexes is differentially regulated by the COP9 signalosome in response to DNA damage. Cell 113(3):357-67.

Guilfoyle, T. J., and G. Hagen

2007 Auxin response factors. Curr Opin Plant Biol 10(5):453-60.

Gusmaroli, G., S. Feng, and X. W. Deng

2004 The Arabidopsis CSN5A and CSN5B subunits are present in distinct COP9 signalosome complexes, and mutations in their JAMM domains exhibit differential dominant negative effects on development. Plant Cell 16(11):2984-3001.

Gusmaroli, G., et al.

2007 Role of the MPN subunits in COP9 signalosome assembly and activity, and their regulatory interaction with Arabidopsis Cullin3-based E3 ligases. Plant Cell 19(2):564-81.

Halimi, Y., et al.

2011 COP9 signalosome subunit 7 from Arabidopsis interacts with and regulates the small subunit of ribonucleotide reductase (RNR2). Plant Mol Biol.

Harari-Steinberg, O., and D. A. Chamovitz

2004 The COP9 signalosome: mediating between kinase signaling and protein degradation. Curr Protein Pept Sci 5(3):185-9.

Hardtke, C. S., et al.

2000 HY5 stability and activity in arabidopsis is regulated by phosphorylation in its COP1 binding domain. EMBO J 19(18):4997-5006.

Hay, A., et al.

2002 The gibberellin pathway mediates KNOTTED1-type homeobox function in plants with different body plans. Curr Biol 12(18):1557-65.

Heisler, M. G., et al.

2001 SPATULA, a gene that controls development of carpel margin tissues in Arabidopsis, encodes a bHLH protein. Development 128(7):1089-98.

Hirose, N., et al.

2005 Functional characterization and expression analysis of a gene, OsENT2, encoding an equilibrative nucleoside transporter in rice suggest a function in cytokinin transport. Plant Physiol 138(1):196-206.

Hochstrasser, M.

2000 Biochemistry. All in the ubiquitin family. Science 289(5479):563-4.

Hong, S. Y., et al.

2011 Nuclear import and DNA binding of the ZHD5 transcription factor is modulated by a competitive peptide inhibitor in Arabidopsis. J Biol Chem 286(2):1659-68.

Hotton, S. K., and J. Callis

2008 Regulation of cullin RING ligases. Annu Rev Plant Biol 59:467-89.

Hu, W., C. W. dePamphilis, and H. Ma

2008 Phylogenetic analysis of the plant-specific zinc finger-homeobox and mini zinc finger gene families. J Integr Plant Biol 50(8):1031-45.

Hu, W., B. Feng, and H. Ma

2011 Ectopic expression of the Arabidopsis MINI ZINC FINGER1 and MIF3 genes induces shoot meristems on leaf margins. Plant Mol Biol 76(1-2):57-68.

Hu, W., and H. Ma

2006 Characterization of a novel putative zinc finger gene MIF1: involvement in multiple hormonal regulation of Arabidopsis development. Plant J 45(3):399-422.

Hubbard, K. E., et al.

2010 Early abscisic acid signal transduction mechanisms: newly discovered components and newly emerging questions. Genes Dev 24(16):1695-708.

Irish, V. F.

2010 The flowering of Arabidopsis flower development. Plant J 61(6):1014-28.

Jaillais, Y., and J. Chory

2010 Unraveling the paradoxes of plant hormone signaling integration. Nat Struct Mol Biol 17(6):642-5.

Jasinski, S., et al.

2005 KNOX action in Arabidopsis is mediated by coordinate regulation of cytokinin and gibberellin activities. Curr Biol 15(17):1560-5.

Jiang, D., X. Gu, and Y. He

2009 Establishment of the winter-annual growth habit via FRIGIDA-mediated histone methylation at FLOWERING LOCUS C in Arabidopsis. Plant Cell 21(6):1733-46.

Jürgens, G., and U. Mayer

1994 A colour atlas of developing embryos. Bard J:7.21.

Kang, J., et al.

2010 PDR-type ABC transporter mediates cellular uptake of the phytohormone abscisic acid. Proc Natl Acad Sci U S A 107(5):2355-60.

Kaufmann, K., et al.

2009 Target genes of the MADS transcription factor SEPALLATA3: integration of developmental and hormonal pathways in the Arabidopsis flower. PLoS Biol 7(4):e1000090.

Kinoshita, A., et al.

2010 RPK2 is an essential receptor-like kinase that transmits the CLV3 signal in Arabidopsis. Development 137(22):3911-20.

Kondo, T., et al.

2006 A plant peptide encoded by CLV3 identified by in situ MALDI-TOF MS analysis. Science 313(5788):845-8.

Kumar, S., Y. Yoshida, and M. Noda

1993 Cloning of a cDNA which encodes a novel ubiquitin-like protein. Biochem Biophys Res Commun 195(1):393-9.

Kurakawa, T., et al.

2007 Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. Nature 445(7128):652-5.

Kuromori, T., et al.

2010 ABC transporter AtABCG25 is involved in abscisic acid transport and responses. Proc Natl Acad Sci U S A 107(5):2361-6.

Kwok, S. F., et al.

1998 Arabidopsis homologs of a c-Jun coactivator are present both in monomeric form and in the COP9 complex, and their abundance is differentially affected by the pleiotropic cop/det/fus mutations. Plant Cell 10(11):1779-90.

Lafarga, M., et al.

2002 Clastosome: a subtype of nuclear body enriched in 19S and 20S proteasomes, ubiquitin, and protein substrates of proteasome. Mol Biol Cell 13(8):2771-82.

Laux, T., et al.

1996 The WUSCHEL gene is required for shoot and floral

meristem integrity in Arabidopsis. Development 122(1):87-96.

Le Foll, M, et al.

2008 The plant CDK inhibitor NtKIS1a interferes with dedifferenciation, is specifically down regulated during development and interacts with a JAB1 homolog. Plant Science 175:513-523.

Lee, J. H., et al.

2008 Characterization of Arabidopsis and rice DWD proteins and their roles as substrate receptors for CUL4-RING E3 ubiquitin ligases. Plant Cell 20(1):152-67.

Lee, J. H., et al.

2010 DWA1 and DWA2, two Arabidopsis DWD protein components of CUL4-based E3 ligases, act together as negative regulators in ABA signal transduction. Plant Cell 22(6):1716-32.

Lee, J., and P. Zhou

2007 DCAFs, the missing link of the CUL4-DDB1 ubiquitin ligase. Mol Cell 26(6):775-80.

Lee, M. H., et al.

2011 Roles of COP9 signalosome in cancer. Cell Cycle 10(18):3057-66.

Leibfried, A., et al.

2005 WUSCHEL controls meristem function by direct regulation of cytokinin-inducible response regulators. Nature 438(7071):1172-5.

Leivar, P., et al.

2009 Definition of early transcriptional circuitry involved in light-induced reversal of PIF-imposed repression of photomorphogenesis in young Arabidopsis seedlings. Plant Cell 21(11):3535-53.

Lenhard, M., et al.

2001 Termination of stem cell maintenance in Arabidopsis floral meristems by interactions between WUSCHEL and AGAMOUS. Cell 105(6):805-14.

Li, H., et al.

2011 The Arabidopsis RING finger E3 ligase RHA2b acts additively with RHA2a in regulating abscisic acid signaling and drought response. Plant Physiol 156(2):550-63.

Liu, H., and S. L. Stone

2010 Abscisic acid increases Arabidopsis ABI5 transcription factor levels by promoting KEG E3 ligase self-ubiquitination and proteasomal degradation. Plant Cell 22(8):2630-41.

Lohmann, J. U., et al.

2001 A molecular link between stem cell regulation and floral patterning in Arabidopsis. Cell 105(6):793-803.

Lopez-Molina, L., et al.

2003 AFP is a novel negative regulator of ABA signaling that promotes ABI5 protein degradation. Genes Dev 17(3):410-8.

Lyapina, S., et al.

2001 Promotion of NEDD-CUL1 conjugate cleavage by COP9 signalosome. Science 292(5520):1382-5.

Lyndon, R.F.

1998 The shoot apical meristem. Its growth and development. Cambridge University Press.

Ma, Y., et al.

2009 Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. Science 324(5930):1064-8.

Mathieu-Rivet, E.

2009 Etude du rôle de l'activateur de l'APC/C CCS52 dans la

transition du cycle mitotique vers l'endocycle au cours du développement du fruit de tomate., Bordeaux 2.

McGinnis, K. M., et al.

2003 The Arabidopsis SLEEPY1 gene encodes a putative F-box subunit of an SCF E3 ubiquitin ligase. Plant Cell 15(5):1120-30.

Moon, J., G. Parry, and M. Estelle

2004 The ubiquitin-proteasome pathway and plant development. Plant Cell 16(12):3181-95.

Muller, R., A. Bleckmann, and R. Simon

2008 The receptor kinase CORYNE of Arabidopsis transmits the stem cell-limiting signal CLAVATA3 independently of CLAVATA1. Plant Cell 20(4):934-46.

Murase, K., et al.

2008 Gibberellin-induced DELLA recognition by the gibberellin receptor GID1. Nature 456(7221):459-63.

Murashige, T, and F. Skoog

1962 A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologica Plantarum 15(3):473-497.

Nafati, M., et al.

2010 Functional characterization of the tomato cyclin-dependent kinase inhibitor SlKRP1 domains involved in protein-protein interactions. New Phytologist 188:136-149.

Nakajima, M., et al.

2006 Identification and characterization of Arabidopsis gibberellin receptors. Plant J 46(5):880-9.

Nambara, E., and A. Marion-Poll

2005 Abscisic acid biosynthesis and catabolism. Annu Rev Plant Biol 56:165-85.

Ni, W., et al.

2004 Regulation of flower development in Arabidopsis by SCF complexes. Plant Physiol 134(4):1574-85.

Nordstrom, A., et al.

2004 Auxin regulation of cytokinin biosynthesis in Arabidopsis thaliana: a factor of potential importance for auxin-cytokinin-regulated development. Proc Natl Acad Sci U S A 101(21):8039-44.

Ohyama, K., et al.

2009 A glycopeptide regulating stem cell fate in Arabidopsis thaliana. Nat Chem Biol 5(8):578-80.

Osterlund, M. T., L. H. Ang, and X. W. Deng

1999 The role of COP1 in repression of Arabidopsis photomorphogenic development. Trends Cell Biol 9(3):113-8.

Osterlund, M. T., et al.

2000 Targeted destabilization of HY5 during light-regulated development of Arabidopsis. Nature 405(6785):462-6.

Park, H. C., et al.

2007 Pathogen-induced binding of the soybean zinc finger homeodomain proteins GmZF-HD1 and GmZF-HD2 to two repeats of ATTA homeodomain binding site in the calmodulin isoform 4 (GmCaM4) promoter. Nucleic Acids Res 35(11):3612-23.

Park, S. Y., et al.

2009 Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. Science 324(5930):1068-71.

Payne, T., S. D. Johnson, and A. M. Koltunow

2004 KNUCKLES (KNU) encodes a C2H2 zinc-finger protein that regulates development of basal

pattern elements of the Arabidopsis gynoecium. Development 131(15):3737-49.

Peng, Z., G. Serino, and X. W. Deng

2001a Molecular characterization of subunit 6 of the COP9 signalosome and its role in multifaceted developmental processes in Arabidopsis. Plant Cell 13(11):2393-407.

—

2001b A role of Arabidopsis COP9 signalosome in multifaceted developmental processes revealed by the characterization of its subunit 3. Development 128(21):4277-88.

Peng, Z., et al.

2003 Evidence for a physical association of the COP9 signalosome, the proteasome, and specific SCF E3 ligases in vivo. Curr Biol 13(13):R504-5.

Pick, E., K. Hofmann, and M. H. Glickman

2009 PCI complexes: Beyond the proteasome, CSN, and eIF3 Troika. Mol Cell 35(3):260-4.

Pozo, J. C., et al.

1998 The ubiquitin-related protein RUB1 and auxin response in Arabidopsis. Science 280(5370):1760-3.

Prunet, N., et al.

2008 REBELOTE, SQUINT, and ULTRAPETALA1 function redundantly in the temporal regulation of floral meristem termination in Arabidopsis thaliana. Plant Cell 20(4):901-19.

Razem, F. A., et al.

2006 The RNA-binding protein FCA is an abscisic acid receptor. Nature 439(7074):290-4.

Reinhardt, D., et al.

2003 Regulation of phyllotaxis by polar auxin transport. Nature 426(6964):255-60.

Rojo, E., et al.

2002 CLV3 is localized to the extracellular space, where it activates the Arabidopsis CLAVATA stem cell signaling pathway. Plant Cell 14(5):969-77.

Ryu, M. Y., S. K. Cho, and W. T. Kim

2010 The Arabidopsis C3H2C3-type RING E3 ubiquitin ligase AtAIRP1 is a positive regulator of an abscisic acid-dependent response to drought stress. Plant Physiol 154(4):1983-97.

Saijo, Y., et al.

2003 The COP1-SPA1 interaction defines a critical step in phytochrome A-mediated regulation of HY5 activity. Genes Dev 17(21):2642-7.

Sakai, H., et al.

2000 Regulation of SUP expression identifies multiple regulators involved in arabidopsis floral meristem development. Plant Cell 12(9):1607-18.

Sakakibara, H.

2006 Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. Annu Rev Plant Biol 57:431-49.

Santner, A., L. I. Calderon-Villalobos, and M. Estelle

2009 Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. Nat Chem Biol 5(5):301-7.

Schoof, H., et al.

2000 The stem cell population of Arabidopsis shoot meristems in maintained by a regulatory loop between the CLAVATA and WUSCHEL genes. Cell 100(6):635-44.

Schroeder, D. F., et al.

2002 De-etiolated 1 and damaged DNA binding protein 1 interact to regulate Arabidopsis photomorphogenesis. Curr Biol 12(17):1462-72.

Schwechheimer, C.

2004 The COP9 signalosome (CSN): an evolutionary conserved proteolysis regulator in eukaryotic development. Biochim Biophys Acta 1695(1-3):45-54.

—

2008 Understanding gibberellic acid signaling--are we there yet? Curr Opin Plant Biol 11(1):9-15.

Schwechheimer, C., and X. W. Deng

2001 COP9 signalosome revisited: a novel mediator of protein degradation. Trends Cell Biol 11(10):420-6.

Schwechheimer, C., et al.

2001 Interactions of the COP9 signalosome with the E3 ubiquitin ligase SCFTIRI in mediating auxin response. Science 292(5520):1379-82.

Schwechheimer, C., G. Serino, and X. W. Deng

2002 Multiple ubiquitin ligase-mediated processes require COP9 signalosome and AXR1 function. Plant Cell 14(10):2553-63.

Serino, G., and X. W. Deng

2003 The COP9 signalosome: regulating plant development through the control of proteolysis. Annu Rev Plant Biol 54:165-82.

Serino, G., et al.

2003 Characterization of the last subunit of the Arabidopsis COP9 signalosome: implications for the overall structure and origin of the complex. Plant Cell 15(3):719-31.

Shackleford, T. J., and F. X. Claret

2010 JAB1/CSN5: a new player in cell cycle control and cancer. Cell Div 5:26.

Shan, X., J. Yan, and D. Xie

2011 Comparison of phytohormone signaling mechanisms. Curr Opin Plant Biol.

Sharon, M., et al.

2009 Symmetrical modularity of the COP9 signalosome complex suggests its multifunctionality. Structure 17(1):31-40.

Shen, H., P. Luong, and E. Huq

2007 The F-box protein MAX2 functions as a positive regulator of photomorphogenesis in Arabidopsis. Plant Physiol 145(4):1471-83.

Shimizu-Sato, S., and H. Mori

2001 Control of outgrowth and dormancy in axillary buds. Plant Physiol 127(4):1405-13.

Sicard, A.

2007 Etude du rôle du gène *INHIBITOR OF MERISTEM ACTIVITY* au cours du développement de la fleur et des ovules chez la tomate., Bordeaux 2.

Sicard, A., M. Hernould, and C. Chevalier

2008a The INHIBITOR OF MERISTEM ACTIVITY (IMA) protein: The nexus between cell division, differentiation and hormonal control of development. Plant Signal Behav 3(10):908-10.

Sicard, A., et al.

2008b Meristem activity during flower and ovule development in tomato is controlled by the mini zinc finger gene INHIBITOR OF MERISTEM ACTIVITY. Plant J 55(3):415-27.

Singh, M. B., and P. L. Bhalla

2006 Plant stem cells carve their own niche. Trends Plant Sci 11(5):241-6.

Skoog, F., and C. O. Miller

1957 Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. Symp Soc Exp Biol 11:118-30.

Sohlberg, J. J., et al.

2006 STY1 regulates auxin homeostasis and affects apical-basal patterning of the Arabidopsis gynoecium. Plant J 47(1):112-23.

Sorefan, K., et al.

2009 A regulated auxin minimum is required for seed dispersal in Arabidopsis. Nature 459(7246):583-6.

Spinelli, S. V., et al.

2011 A mechanistic link between STM and CUC1 during Arabidopsis development. Plant Physiol.

Stals, H., and D. Inze

2001 When plant cells decide to divide. Trends Plant Sci 6(8):359-64.

Stirnberg, P., I. J. Furner, and H. M. Ottoline Leyser

2007 MAX2 participates in an SCF complex which acts locally at the node to suppress shoot branching. Plant J 50(1):80-94.

Stirnberg, P., K. van De Sande, and H. M. Leyser

2002 MAX1 and MAX2 control shoot lateral branching in Arabidopsis. Development 129(5):1131-41.

Stone, S. L., et al.

2006 KEEP ON GOING, a RING E3 ligase essential for Arabidopsis growth and development, is involved in abscisic acid signaling. Plant Cell 18(12):3415-28.

Stuttmann, J., et al.

2009 COP9 signalosome- and 26S proteasome-dependent regulation of SCFTIR1 accumulation in Arabidopsis. J Biol Chem 284(12):7920-30.

Sun, B., et al.

2009 A timing mechanism for stem cell maintenance and differentiation in the Arabidopsis floral meristem. Genes Dev 23(15):1791-804.

Suzuki, G., et al.

2002 Arabidopsis COP10 is a ubiquitin-conjugating enzyme variant that acts together with COP1 and the COP9 signalosome in repressing photomorphogenesis. Genes Dev 16(5):554-9.

Szymkowiak, E. J., and I. M. Sussex

1996 What Chimeras Can Tell Us About Plant Development. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 47:351-376.

Takeda, S., and M. Aida

2011 Establishment of the embryonic shoot apical meristem in Arabidopsis thaliana. J Plant Res 124(2):211-9.

Takei, K., et al.

2001 Nitrogen-dependent accumulation of cytokinins in root and the translocation to leaf: implication of cytokinin species that induces gene expression of maize response regulator. Plant Cell Physiol 42(1):85-93.

Tan, Q. K., and V. F. Irish

2006 The Arabidopsis zinc finger-homeodomain genes encode proteins with unique biochemical properties that are coordinately expressed during floral development. Plant Physiol 140(3):1095-108.

Tan, X., et al.

2007 Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. Nature 446(7136):640-5.

Tao, L. Z., et al.

2005 RAC GTPases in tobacco and Arabidopsis mediate auxin-induced formation of proteolytically active nuclear protein bodies that contain AUX/IAA proteins. Plant Cell 17(8):2369-83.

Theissen, G., and H. Saedler

2001 Plant biology. Floral quartets. Nature 409(6819):469-71.

To, J. P., and J. J. Kieber

2008 Cytokinin signaling: two-components and more. Trends Plant Sci 13(2):85-92.

Traas, J., and T. Vernoux

2002 The shoot apical meristem: the dynamics of a stable structure. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 357(1422):737-47.

Tran, L. S., et al.

2007 Co-expression of the stress-inducible zinc finger homeodomain ZFHD1 and NAC transcription factors enhances expression of the ERD1 gene in Arabidopsis. Plant J 49(1):46-63.

Tromas, A., I. Paponov, and C. Perrot-Rechenmann

2010 AUXIN BINDING PROTEIN 1: functional and evolutionary aspects. Trends Plant Sci 15(8):436-46.

Tsuge, T., M. Matsui, and N. Wei

2001 The subunit 1 of the COP9 signalosome suppresses gene expression through its N-terminal domain and incorporates into the complex through the PCI domain. J Mol Biol 305(1):1-9.

Ueguchi-Tanaka, M., et al.

2005 GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 encodes a soluble receptor for gibberellin. Nature 437(7059):693-8.

Uhle, S., et al.

2003 Protein kinase CK2 and protein kinase D are associated with the COP9 signalosome. EMBO J 22(6):1302-12.

Umehara, M., et al.

2008 Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. Nature 455(7210):195-200.

Umezawa, T., et al.

2010 Molecular basis of the core regulatory network in ABA responses: sensing, signaling and transport. Plant Cell Physiol 51(11):1821-39.

Valverde, F., et al.

2004 Photoreceptor regulation of CONSTANS protein in photoperiodic flowering. Science 303(5660):1003-6.

Vanneste, S., and J. Friml

2009 Auxin: a trigger for change in plant development. Cell 136(6):1005-16.

Varagona, M. J., R. J. Schmidt, and N. V. Raikhel

1992 Nuclear localization signal(s) required for nuclear targeting of the maize regulatory protein Opaque-2. Plant Cell 4(10):1213-27.

Varaud, E., et al.

2011 AUXIN RESPONSE FACTOR8 regulates Arabidopsis petal growth by interacting with the bHLH transcription factor BIGPETALp. Plant Cell 23(3):973-83.

Verma, R., et al.

2002 Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. Science 298(5593):611-5.

Wang, H., et al.

1998 ICK1, a cyclin-dependent protein kinase inhibitor from Arabidopsis thaliana interacts with both Cdc2a and CycD3, and its expression is induced by abscisic acid. Plant J 15(4):501-10.

Wang, L., et al.

2011 Auxin Response Factor2 (ARF2) and Its Regulated Homeodomain Gene HB33 Mediate Abscisic Acid Response in Arabidopsis. PLoS Genet 7(7):e1002172.

Wang, X., et al.

2003 The COP9 signalosome interacts with SCF UFO and participates in Arabidopsis flower development. Plant Cell 15(5):1071-82.

Wang, X., et al.

2009 Regulation of COP1 nuclear localization by the COP9 signalosome via direct interaction with CSN1. Plant J 58(4):655-67.

Wang, Y. H., and H. R. Irving

2011 Developing a model of plant hormone interactions. Plant Signal Behav 6(4):494-500.

Wei, N., D. A. Chamovitz, and X. W. Deng

1994 Arabidopsis COP9 is a component of a novel signaling complex mediating light control of development. Cell 78(1):117-24.

Wei, N., and X. W. Deng

1999 Making sense of the COP9 signalosome. A regulatory protein complex conserved from Arabidopsis to human. Trends Genet 15(3):98-103.

—

2003 The COP9 signalosome. Annu Rev Cell Dev Biol 19:261-86.

Wei, N., G. Serino, and X. W. Deng

2008 The COP9 signalosome: more than a protease. Trends Biochem Sci 33(12):592-600.

Weigel, D., and E. M. Meyerowitz

1994 The ABCs of floral homeotic genes. Cell 78(2):203-9.

Wigge, P. A., et al.

2005 Integration of spatial and temporal information during floral induction in Arabidopsis. Science 309(5737):1056-9.

Windhovel, A., et al.

2001 Characterization of a novel class of plant homeodomain proteins that bind to the C4 phosphoenolpyruvate carboxylase gene of Flaveria trinervia. Plant Mol Biol 45(2):201-14.

Woodward, A. W., and B. Bartel

2005 Auxin: regulation, action, and interaction. Ann Bot 95(5):707-35.

Wu, J. T., Y. R. Chan, and C. T. Chien

2006 Protection of cullin-RING E3 ligases by CSN-UBP12. Trends Cell Biol 16(7):362-9.

Yadav, R. K., M. Tavakkoli, and G. V. Reddy

2010 WUSCHEL mediates stem cell homeostasis by regulating stem cell number and patterns of cell division and differentiation of stem cell progenitors. Development 137(21):3581-9.

Yahalom, A., et al.

2008 Arabidopsis eIF3e is regulated by the COP9 signalosome and has an impact on development and protein translation. Plant J 53(2):300-11.

Yamaguchi, S.

2008 Gibberellin metabolism and its regulation. Annu Rev Plant Biol 59:225-51.

Yamamoto, T., et al.

2003 Interaction between proliferating cell nuclear antigen and JUN-activation-domain-binding protein 1 in the meristem of rice, Oryza sativa L. Planta 217(2):175-83.

Yan, H., et al.

2007 Rice tillering dwarf mutant dwarf3 has increased leaf longevity during darkness-induced senescence or hydrogen peroxide-induced cell death. Genes Genet Syst 82(4):361-6.

Yanai, O., et al.

2005 Arabidopsis KNOXI proteins activate cytokinin biosynthesis. Curr Biol 15(17):1566-71.

Yang, X., et al.

2002 The COP9 signalosome inhibits p27(kip1) degradation and impedes G1-S phase progression via deneddylation of SCF Cul1. Curr Biol 12(8):667-72.

Yu, H., et al.

2004 Floral homeotic genes are targets of gibberellin signaling in flower development. Proc Natl Acad Sci U S A 101(20):7827-32.

Zhang, W., et al.

2008a Genetic analysis of CAND1-CUL1 interactions in Arabidopsis supports a role for CAND1-mediated cycling of the SCFTIR1 complex. Proc Natl Acad Sci U S A 105(24):8470-5.

Zhang, Y., et al.

2008b Arabidopsis DDB1-CUL4 ASSOCIATED FACTOR1 forms a nuclear E3 ubiquitin ligase with DDB1 and CUL4 that is involved in multiple plant developmental processes. Plant Cell 20(6):1437-55.

Zhang, Y., et al.

2007 SDIR1 is a RING finger E3 ligase that positively regulates stress-responsive abscisic acid signaling in Arabidopsis. Plant Cell 19(6):1912-29.

Zhao, D., et al.

2001 The ASK1 gene regulates B function gene expression in cooperation with UFO and LEAFY in Arabidopsis. Development 128(14):2735-46.

Zhao, Y.

2010 Auxin biosynthesis and its role in plant development. Annu Rev Plant Biol 61:49-64.

Zhao, Z., et al.

2010 Hormonal control of the shoot stem-cell niche. Nature 465(7301):1089-92.

Zheng, J., et al.

2002 CAND1 binds to unneddylated CUL1 and regulates the formation of SCF ubiquitin E3 ligase complex. Mol Cell 10(6):1519-26.

Zhou, M., et al.

2008 Mass spectrometry reveals modularity and a complete subunit interaction map of the eukaryotic translation factor eIF3. Proc Natl Acad Sci U S A 105(47):18139-44.

COMMUNICATIONS

I Communications orales

Leblond, J., Sicard, A., Delmas, F., Hernould, M. and Chevalier C. (2009) IMA gene encodes an adapter Mini Zinc Finger protein regulating floral meristem development in Tomato.

8ème colloque national de la Société Française de Biologie Végétale (SFBV), Strasbourg (France), 8-10 juillet 2009.

Chevalier, C., Sicard, A., Leblond, J., Delmas, F., Hernould, M. (2010) INHIBITOR OF MERISTEM ACTIVITY (IMA), a new regulator of plant growth and development: Connecting flower and fruit development.

Institut des Sciences Végétales, Gif-sur-Yvette (France), 26 mars 2010.

Chevalier, C., Leblond, J., Sicard, A., Delmas, F., Hernould, M. (2010) The IMA gene encodes an adapter Mini Zinc Finger protein regulating the development of floral meristem in Tomato.

International workshop on tomato researches, Tsukuba University (Japon), 14 décembre 2010.

II Posters

Leblond, J., Sicard, A., Delmas, F., Hernould, M. and Chevalier C. (2009) IMA gene encodes an adapter Mini Zinc Finger protein regulating floral meristem development in Tomato.

8e colloque national de la Société Française de Biologie Végétale (SFBV), Strasbourg (France), 8-10 juillet 2009.

Leblond, J., Sicard, A., Delmas, F., Chevalier C., Hernould, M. (2010) The IMA gene encodes an adapter Mini Zinc Finger protein regulating the development of floral meristem in Tomato.

Journée de l'Ecole Doctorale de Bordeaux, Arcachon (France), 8 avril 2010.

Leblond, J., Sicard, A., Delmas, F., Chevalier C., Hernould, M. (2010) The IMA gene encodes an adapter Mini Zinc Finger protein regulating the development of floral meristem in Tomato.

20th International Conference on Plant Growth Substances (IPGSA), Tarragona (Espagne), 28 juin-2 juillet 2010.

Leblond, J., Sicard, A., Delmas, F., Chevalier C., Hernould, M. (2010) The IMA gene encodes an adapter Mini Zinc Finger protein regulating the development of floral meristem in Tomato.

Plant Biology Meeting of the American Society of Plant Biologists, Québec (Canada), 31 juillet-4 août 2010.

Leblond, J., Sicard, A., Delmas, F., Chevalier C., Hernould, M. (2011) The IMA gene encodes an adapter Mini Zinc Finger protein regulating the development of floral meristem in Tomato.

Journée de l'Ecole Doctorale de Bordeaux, Arcachon (France), 7 avril 2011.

RESUME

Les plantes ont la capacité à former de nouveaux organes grâce à une croissance continue assurée par une réserve de cellules souches au sein de structures spécifiques, les méristèmes. Les méristèmes floraux diffèrent des méristèmes végétatifs par leur caractère déterminé aboutissant à la production des fleurs. Le gène *IMA* (*INHIBITOR OF MERISTEM ACTIVITY*) code une protéine contenant un motif «doigt à zinc» (MIF) régulant les processus développementaux de la fleur et des ovules chez la tomate. En effet, IMA inhibe la prolifération cellulaire au cours de la terminaison florale en agissant sur l'expression du gène *WUSCHEL*, responsable du maintien du pool de cellules souches et contrôle le nombre de carpelles (Sicard et al., 2008). De plus, les protéines IMA et son orthologue chez Arabidopsis, MIF2, modulent la réponse à certaines phytohormones. De manière identique à la protéine MIF1 (Hu and Ma, 2006), IMA/MIF2 régule négativement la réponse aux brassinostéroïdes, à l'auxine, aux cytokinines et aux gibbérellines mais positivement la réponse à l'acide abscissique suggérant une fonction commune des protéines MIF dans les voies de réponse aux phytohormones. Un criblage d'une banque d'ADNc par la technique de double hybride a permis de révéler l'interaction entre les protéines IMA/MIF2 et une sous-unité du complexe signalosome, CSN5. De façon intéressante, les plantes mutantes *csn5* d'Arabidopsis montrent de nombreuses altérations phénotypiques telles qu'un aspect buissonnant résultant de la perte de la dominance apicale, et une altération de la réponse à l'obscurité et à l'auxine. Ces phénotypes sont fortement ressemblants aux phénotypes des plantes $MIF1^{OE}$ d'Arabidopsis (Hu and Ma, 2006) et des plantes IMA^{OE} de tomate (Sicard et al., 2008). Les résultats obtenus au cours de ce projet montrent que la protéine IMA inhibe la fonction du complexe signalosome grâce à son interaction avec la protéine CSN5.

Mots clés: méristème floral, Mini zinc finger, signalosome, phytohormones.

ABSTRACT

Plants have the ability to form new organs as a result of indeterminate growth ensured by specific regions of pluripotent cells, called meristems. Flowers are produced by the activity of floral meristems which differ from vegetative meristems in their determinate fate. The *INHIBITOR OF MERISTEM ACTIVITY* (*IMA*) gene encoding a Mini Zinc Finger (MIF) protein from tomato (*Solanum lycopersicum*) regulates the processes of flower and ovule development. IMA inhibits cell proliferation during floral termination, controls the number of carpels during floral development and acts as a repressor of the meristem organizing centre gene *WUSCHEL* (Sicard et al., 2008). We demonstrated that IMA and its Arabidopsis ortholog MIF2 is also involved in a multiple hormonal signalling pathway, as a putative conserved feature for plant MIF proteins (Hu and Ma, 2006). Alike Arabidopsis MIF1, IMA/MIF2 regulates negatively BR, auxin, cytokinin and gibberellin signalling and positively ABA signaling. Using yeast two-hybrid screening experiments, we identified a strong protein-protein interaction between IMA and the signalosome subunit 5 (CSN5). Interestingly the *csn5* mutant in Arabidopsis displays pleiotropic developmental defects such as a bushy phenotype originating from the loss of apical dominance and the alteration in sensitivity to darkness and auxin signals. These phenotypes are strikingly similar to what was described for Arabidopsis MIF1 (Hu and Ma, 2006) and tomato IMA overexpressors plants (Sicard et al., 2008), respectively. Taken together our data strongly suggest that IMA may act as an inhibitor of CSN function through its physical interaction with SlCSN5. The observed converse effects of *IMA/MIF2* overexpression or deregulation on plant development and the abundance of developmental marker genes further support the notion of a CSN inhibitory control, since the COP9 signalosome through the specific deneddylation activity of the CSN5 subunit regulates plant hormone signalling.

Key words: floral meristem, Mini zinc finger, signalosome, phytohormones.

UMR 1332, Biologie du Fruit et Pathologie, INRA, 71 avenue Edouard Bourlaux, 33883 VILLENAVE d'ORNON