

THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Caractérisation des récepteurs de la famille WAK chez *A.thaliana*

Massaux, Julien

Award date:
2010

Awarding institution:
Université de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des Sciences

Caractérisation des récepteurs de la famille WAK chez *A.thaliana*

**Mémoire présenté pour l'obtention
du grade académique de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire**

Julien Massaux

Janvier 2010

En premier lieu, je tiens à remercier le Professeur Van Custem de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire.

Je remercie également le Professeur Messiaen de m'avoir encadré et d'avoir consacré une partie de son temps à la lecture et à la correction de ce mémoire.

Je remercie les 4 membres du Jury pour le temps qu'ils ont consacré à la lecture de ce manuscrit.

Merci à Aurélien pour sa disponibilité quotidienne, l'encadrement et le sérieux dont il a fait preuve durant ces 10 mois. Merci également d'avoir pris de ton temps pour corriger ce manuscrit. Je te souhaite également beaucoup de réussite pour la suite de ta thèse.

Merci à Nicolas pour le prêt quotidien de sa P2 et pour m'avoir si souvent bien conseillé pour des petites choses pratiques.

Merci à Pierre et Catherine pour la bonne humeur, le sourire et les judicieux conseils fournis. Même la « corvée » vaisselle est un plaisir en compagnie de Pierre !!!

Merci à Françoise pour sa disponibilité, son sourire et les conseils fournis pour la mise en page de ce mémoire. Je te souhaite également de retrouver une excellente santé, tu le mérites !!!

Je remercie Céline, Juan Carlos, Raphaël, Houda et Roland d'avoir participé à cette expérience de fin d'étude.

Je remercie Adrien pour les bons moments passés ensemble dans et en dehors du laboratoire. J'espère qu'on restera encore en contact après la fin de ce mémoire.

Enfin, je remercie mes parents de m'avoir permis de réaliser des études et d'avoir supporter mes sautes d'humeur durant ces 5 ans. Merci également à mon frère, mes grand-parents, ma copine et mes amis pour leur soutien tout au long de ce mémoire.

Un grand merci à tous ceux qui ont égayés ces 5 ans d'études ...

Julien

Table des matières

I. Introduction 1

A. La paroi cellulaire.....	1
A.1. Structure pariétale	1
A.1.1. Les polysaccharides.....	1
A.1.1.1. Cellulose.....	1
A.1.1.2. Hémicellulose.....	1
A.1.1.3. Pectine	2
A.1.2. Les protéines pariétales	4
A.1.2.1. Les protéines structurales	4
A.1.2.2. Les protéines à activité enzymatique :.....	4
B. Protéines impliquées dans le pontage entre la paroi cellulaire et la membrane plasmique	5
B.1. Les arabinogalactanes ou AGPs.....	5
B.2. Les cellulose-synthases	5
B.3. Les récepteurs kinases (RLK)	6
B.3.1. Le récepteur SRK.....	6
B.3.2. Le récepteur CLAVATA.....	7
B.3.3. Le récepteur FLS2.....	8
B.3.4. Le récepteur BRI1	8
B.3.5. Les kinases associées à la paroi ou WAKs	9
B.3.5.1. Généralités	9
B.3.5.2. Expression des WAKs	10
B.3.5.3. Fonctions des WAKs	10
B.3.5.3.1. Elongation cellulaire : Implication des protéines WAK2 et WAK4	10
B.3.5.3.2. Réponses de défense cellulaire : Implication de la protéine WAK1	11
B.3.5.4. Interactions entre WAK1 et les éléments pariétaux	12
B.3.5.4.1. Interaction WAK1-AtGRP3	12
B.3.5.4.2. Interaction WAK1- Pectine	13
C. Implication des fragments pectiques dans la signalisation cellulaire	15
C.1. Les réponses de défense	15
C.2. Les réponses morphogénétiques.....	16
D. Détermination de l'activation de WAK1 par les fragments pectiques : concept du récepteur hybride.....	18
E. Objectifs du mémoire	19

II. Matériel et Méthodes..... 20

A. Les vecteurs utilisés.....	20
A.1. Le vecteur pCRII.....	20
A.2. Le vecteur pBI121	21
B. Les cultures de bactéries :	21
B.1. Les cultures d' <i>Escherichia coli</i>	21
B.1.1. Milieu LB	21
B.1.2. Milieu NZY ⁺ Broth	21
B.1.3. Préparation de <i>E.coli</i> TOP 10F' thermocompétentes.....	22
B.1.4. Transformation de <i>E.coli</i> TOP 10F' par choc thermique.....	22

B.2.	Les cultures d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (LBA4404)	23
B.2.1.	Préparation d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i> électrocompétentes	23
B.2.2.	Electroporation d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	23
C.	Les cultures d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	23
C.1.	Stérilisation des graines.....	23
C.2.	Milieux de germination	24
C.3.	Transformation d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	24
C.3.1.	Obtention de plantules.....	24
C.3.2.	Transformation florale via <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	24
D.	Méthodes relatives aux acides nucléiques.....	25
D.1.	Minipreparation d'ADN plasmidique	25
D.2.	Maxipreparation d'ADN plasmidique.....	25
D.3.	Electrophorèse sur gel d'agarose.....	26
D.4.	Purification d'ADN sur colonne « Nucleospin »	26
D.5.	Purification d'ADN sur colonne « Microcon ».....	27
D.6.	Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	27
D.7.	Mutagenèse dirigée (figure 3) :	28
D.8.	Réaction de ligation.....	29
D.9.	Extraction d'ARN totaux de plantules <i>A. thaliana</i>	30
D.10.	Rétro-transcription	31
D.11.	Réaction de séquençage	31

III. Résultats 33

A.	Approche théorique	33
A.1.	Détermination des acides aminés à muter	33
A.1.1.	Versions mutées au niveau du domaine extracellulaire de WAK1	33
A.1.2.	Versions mutées au niveau des domaines transmembranaire et juxtamembranaire de WAK1.....	34
B.	Approche expérimentale	36
B.1.	Construction du récepteur WAKJUX1-BRI1 en pCRII.....	36
B.1.1.	Clonage de la séquence WAKJUX1 en pCRII.....	36
B.1.1.1.	Définition des amorces PCR et amplification du gène WAK1	36
B.1.1.2.	Obtention de la séquence WAKJUX1 à partir de WAK1-pCRII.....	37
B.1.2.	Clonage de la séquence intracellulaire kinase de BRI1	38
B.1.2.1.	Définition des amorces PCR.....	38
B.1.2.2.	Clonage de la séquence intracellulaire kinase <i>Bri1</i> dans le plasmide pCRII	38
B.1.3.	Fusion des séquences WAKJUX1 et BRI1	39
B.1.4.	Séquençage et correction du récepteur hybride WAKJUX1-BRI1	40
B.1.4.1.	Séquençage de WAKJUX1-BRI1	40
B.1.4.2.	Correction du récepteur WAKJUX1-BRI1	40
B.1.4.2.1.	Définition des amorces PCR.....	41
B.1.4.2.2.	Première correction du récepteur WAKJUX1-BRI1	41
B.1.4.2.3.	Deuxième correction du récepteur WAKJUX1-BRI1	42
B.1.4.2.4.	Troisième correction du récepteur WAKJUX1-BRI1	42
B.2.	Conception de versions mutées en pCRII	43
B.2.1.	Définition des amorces PCR	43
B.2.2.	Conception des versions mutées	44
B.3.	Transfert des constructions hybrides en pBI121	44

B.4.	Transformation d'Agrobacterium tumefaciens et de plantules d'Arabidopsis thaliana	45
B.5.	Sélection des <i>Arabidopsis thaliana</i> transformées	46

IV. Conclusion et perspectives..... 48

V. Bibliographie..... 51

I. Introduction

A. La paroi cellulaire

La paroi cellulaire est un compartiment composé de 90% de polysaccharides, 10 % de glycoprotéines et d'éléments en plus faible quantité tels que les esters phénoliques et divers minéraux (Ca^{2+} , H^+ , Na^+ , ...). Le volume total pariétal est composé de plus de 60 % d'eau.

En plus de constituer un support structural entourant, reliant et protégeant la cellule végétale, la paroi cellulaire est également impliquée dans un grand nombre d'autres fonctions telles que l'adhésion et la croissance cellulaire, la morphogénèse, la communication inter-cellulaire (via les plasmodesmes), les mécanismes de défense contre les pathogènes ou encore la résistance à la pression de turgescence (**Carpita et Mc Cann, 2000**).

A.1. Structure pariétale

A.1.1. Les polysaccharides

La paroi cellulaire est composée de 3 principaux polysaccharides à savoir la cellulose, l'hémicellulose et la pectine (**Carpita et Gibeaut, 1993**) (**figure 1**).

A.1.1.1. Cellulose

La cellulose est un polymère de β 1,4 D-glucose qui représente 30 % de la totalité des polysaccharides présents dans la paroi cellulaire. Les monomères de la cellulose sont initialement présents sous la forme de précurseur d'UDP-glucose et sont synthétisés à partir de sucroses synthases (glycosyltransférases). Ensuite, des complexes de cellulose-synthases associés en rosette permettent la synthèse de la cellulose directement au niveau de la membrane plasmique. Finalement, ces polymères celluloseux s'associent en microfibrille via des ponts hydrogènes et forment ainsi un réseau cristallin responsable de la forme et la rigidité de la paroi cellulaire (**Delmer, 1999**).

A.1.1.2. Hémicellulose

Le terme hémicellulose est généralement utilisé pour décrire un groupe très hétérogène de polysaccharides. Ceux-ci présentent une armature linéaire composée de monomères liés en β 1-4 auxquels sont branchés de nombreuses structures secondaires. Les hémicelluloses constituent à elles seules 30 % de la totalité des polysaccharides de la paroi cellulaire. Ces polysaccharides, de par leur structure branchée, sont capables de former des ponts hydrogènes avec les microfibrilles celluloseux, ce qui permet la création d'un lien avec la matrice de la paroi cellulaire

Les hémicelluloses sont subdivisées en 3 sous-groupes distincts : les xyloglycanes, les xylanes et les glucomannanes.

Les xyloglucanes, hémicelluloses les plus abondantes, sont composées de β -D-glucoses liés en β 1-4 pouvant présenter des chaînes secondaires de xyloses, galactoses et de L-fucoses (**Carpita et Gibeaut, 1993**).

Les xylanes présentent une ossature principale composée de β 1-4 xyloses auxquelles sont reliées des chaînes secondaires souvent constituées d'arabinoses, de xyloses ou de galactoses (**Ridley et al, 2001**).

Enfin, les glucomannanes sont composés d'une chaîne principale de mannoses et de mannoses-glucoses liés en β 1-4. Par ailleurs, ces armatures linéaires de mannoses présentent, dans 2 à 4% des cas, des ramifications constituées de résidus galactoses (**Carpita et Gibeaut, 1993**).

A.1.1.3. Pectine

La pectine est un polysaccharide plus ou moins hydrophile constitué de monomères d'acide α -D-galacturonique en liaison α 1-4 (**Willats et al, 2001**). Ce polysaccharide, représentant 35 % du poids sec de la paroi cellulaire, est fortement variable au niveau de ces chaînes latérales. En effet, celles-ci peuvent se composer de galactoses, d'arabinoses ou de chaînes constituées de plusieurs monosaccharides différents (**Cosgrove 1997**). La pectine est considérée comme un polysaccharide complexe présentant 3 domaines structuraux différents à savoir les homogalacturonanes (HG) et les rhamnogalacturonanes I et II (RG I et II) (**figure 2**).

Le rhamnogalacturonane I est le polysaccharide pectique le plus abondant de la paroi cellulaire. Il présente une ossature linéaire constituée à la fois d'acides galacturoniques et de rhamnoses. Les résidus de rhamnose présents en C-4 peuvent parfois être substitués par d'autres monomères tels que l'arabinose ou le galactose. De plus, le rhamnogalacturonane I présente souvent des branchements constitués d'arabinanes et d'arabinogalactanes (**Ridley et al, 2001**).

Le rhamnogalacturonane II présente une chaîne principale composée d'acides galacturoniques liés en β 1-4 sur lesquels peuvent être additionnés 4 types de chaînes secondaires. Ces chaînes peuvent être constituées d'arabinoses, d'acides galacturoniques, d'acides acétiques, d'apioses ou encore d'acides 2-kéto-3-déoxy-D-manno-octulosonique (KDO) (**Ridley et al, 2001 ; Willats et al, 2001**). Par ailleurs, un pontage entre 2 molécules de rhamnogalacturonane II est possible en présence d'ions bore (**Ishii et Matsunaga, 2001**).

L'homogalacturonane est un homopolymère composé d'acides galacturoniques liés en β 1-4. Lors du processus d'élongation cellulaire, l'homogalacturonane est capable de subir plusieurs modifications chimiques influençant directement les propriétés physiques de la paroi cellulaire (**Willats et al, 2001**).

Ainsi, les homogalacturonanes sont d'abord synthétisés au niveau de l'appareil de golgi sous une forme hautement méthyl-estérifiée avant d'être empaquetés dans des vésicules de sécrétion.

Pas moins de 67 transférases sont impliquées dans le processus de méthyl-estérification des homogalacturonanes dont la plus part sont des glycosyl-, acetyl- et méthyltransférases (Mohnen, 2008). Cette synthèse pectique permet au réseau pectique de s'insérer de manière efficace entre les microfibrilles de cellulose et les polymères d'hémicellulose (Carpita et Gibeaut, 1993). De plus, il est important de signaler que les polymères pectiques déposés dans la paroi cellulaire peuvent changer au cours du temps. Les modifications chimiques qui y sont apportées sont directement en relation avec le stade de développement de la plante (O'Neil et York, 2003).

Par ailleurs, les homogalacturonanes hautement méthyl-estérifiés servent également de substrat à des pectinases méthyl-estérases. Ces enzymes vont retirer les groupements méthylesters, ce qui va permettre de charger négativement les chaînes d'homogalacturonanes et ainsi favoriser leur pontage par au moins 5 ions calcium (Liners *et al*, 1992) (figure 3).

Le modèle d'association de 2 chaînes antiparallèles d'homogalacturonanes dé-estérifiés porte le nom de conformation en « egg-box » ou « boîte à œuf » (Liners *et al*, 1992). Liners et ses collègues ont montré que différents paramètres pouvaient réguler la formation des « egg-box » à savoir le degré de polymérisation (DP) et d'estérification des chaînes d'homogalacturonanes ainsi que le pH de la paroi cellulaire.

Par ailleurs, les chaînes d'homogalacturonanes de DP <9 ne peuvent pas adopter une conformation en « egg-box » (Vincken *et al*, 2003) et ne pourront pas par la même occasion initier des réponses de défenses en cas d'attaque de la paroi cellulaire par un pathogène. Ainsi, la possibilité qu'à le végétal à initier des réponses de défense est en relation directe avec la formation de chaînes d'homogalacturonanes en conformation en « egg-box » (Liners *et al*, 2001 ; Messiaen et Van Custem, 1994 ; Ridley *et al*, 2001).

Liners et ses collègues ont également développé un anticorps monoclonal nommé 2F4, capable de reconnaître spécifiquement les dimères d'homogalacturonanes en conformation « egg-box » (Liners *et al*, 1992).

A l'heure actuelle, deux modèles existent pour tenter de décrire la façon dont les différents polymères de pectine s'associent entre eux. Le premier modèle suggère que l'homogalacturonane et le rhamnogalacturonane I sont les constituants majeurs de l'ossature principale. Ceux-ci formeraient deux régions distinctes appelées « région lisse » et « région hérissée » (Ridley *et al*, 2001). La région « lisse » serait constituée de polymères d'homogalacturonanes tandis que la région « hérissée » serait constituée de rhamnogalacturonane I. L'inconvénient de ce modèle est l'absence d'une position précise du rhamnogalacturonane II (Ridley *et al*, 2001) (figure 4).

Dès lors, un second modèle a été élaboré prenant en compte le positionnement des rhamnogalacturonanes II. Dans ce modèle, l'ossature principale du réseau pectique (région lisse) serait composée de rhamnogalacturonanes I à partir desquels partirait des chaînes latérales d'homogalacturonanes (région hérissée) pouvant dimériser via des ions calcium. Les rhamnogalacturonanes II liés aux chaînes d'homogalacturonanes s'associeraient entre eux via des ions bores ce qui permettrait le pontage des différentes macromolécules pectiques (Vincken *et al*, 2003) (figure 5).

A.1.2. Les protéines pariétales

Les protéines pariétales sont subdivisées en deux groupes distincts : les protéines structurales et les protéines présentant des activités enzymatiques (**José-Estanyol *et al*, 2000**).

A.1.2.1. Les protéines structurales

Les principales protéines structurales que l'on retrouve dans la paroi cellulaire sont des glycoprotéines. Selon leur composition en acides aminés, ces glycoprotéines sont subdivisées en plusieurs sous-types de glycoprotéines. Des glycoprotéines riches en hydroxyprolines (HRPG) impliquées dans la rigidification de la paroi cellulaire lors d'une attaque par un pathogène (**José-Estanyol *et al*, 2000**) et des glycoprotéines riches en prolines (PRP) également impliquées dans la rigidification de la paroi cellulaire et répondant au stress oxydatif en devenant insoluble en présence de H_2O_2 (**Cosgrove, 1997**). Nous retrouvons également des arabinogalactanes (AGP) impliqués à la fois dans l'adhésion cellulaire (via leur liaison spécifique à la pectine) et dans plusieurs processus de développement du végétal (**Cosgrove, 1997**). La présence d'expansines déstructurant la paroi cellulaire et permettant la croissance de la cellule végétale (**Cosgrove, 1997**) ainsi que des glycoprotéines riches en glycines (GRP) est également fréquent.

A.1.2.2. Les protéines à activité enzymatique :

La paroi cellulaire est bien plus qu'une simple armature mécanique entourant et protégeant les cellules végétales. En effet, la paroi contient une panoplie d'enzymes différentes, montrant qu'il s'agit d'un compartiment métaboliquement actif (**Cosgrove, 1997**). Des enzymes telles que les endoglucanases, les xylosidases, les pectinases, les pectin méthyl esterases ou les xyloglucanes endotransglycosylases sont présentes. Ces enzymes modifient les propriétés des polysaccharides de la paroi cellulaire. D'autres enzymes telles que les peroxydases et les oxydases sont également présentes et interviennent dans la dégradation de la paroi cellulaire. Enfin, des enzymes de défense contre les pathogènes telles que les chitinases et les β -glucanases sont présentes (**Fry, 1995**).

Par ailleurs, il existe au sein de la paroi cellulaire des protéines n'agissant pas directement sur les polymères pariétaux en modifiant leurs propriétés physico-chimiques mais en permettant un pontage entre la paroi cellulaire et la membrane plasmique. Ce type de protéines permet la transmission et l'intégration d'informations exogènes par la cellule végétale.

B. Protéines impliquées dans le pontage entre la paroi cellulaire et la membrane plasmique

Afin de pouvoir répondre de manière efficace et rapide aux signaux issus de son environnement, la cellule possède de nombreux récepteurs qui potentiellement peuvent réaliser un pontage entre la paroi cellulaire et la membrane plasmique.

De récentes études ont pu mettre en évidence 3 types de protéines membranaires pouvant être impliquées dans le pontage entre la paroi cellulaire et la membrane plasmique : les arabinogalactanes (AGPs), les celluloses synthases et les récepteurs kinases (RLK) (**Kohorn *et al*, 2000**).

B.1. Les arabinogalactanes ou AGPs

Les AGPs constituent une famille de protéines hautement glycosylées, pouvant être localisées dans de nombreux tissus et sous différentes formes (**Cosgrove 1997 ; Kohorn *et al*, 2001**). La protéine est synthétisée au niveau du système endomembranaire et contient un signal de sécrétion N-terminal, un domaine central riche en proline/hydroxyproline de longueur variable et une ancre glycosyl phosphatidyl inositol (GPI) hydrophobe en C-terminal. Vu la grande quantité d'AGPs présents au niveau des vésicules golgiennes, plusieurs auteurs ont émis l'hypothèse que ces protéines pourraient être impliquées dans le transport de polymères pariétaux en les solubilisant depuis leur synthèse au niveau de l'appareil de golgi jusqu'à leur arrivée dans la paroi cellulaire (**Gibeau et Capita, 1991 ; Cosgrove 1997**).

L'ancre GPI permet également aux AGPs de se fixer en membrane plasmique, ce qui en font de bons candidats pour initier une voie de transduction du signal entre la matrice extracellulaire et la cellule végétale (**Oxley et Basic, 1999 ; Shi *et al*, 2003**).

Par ailleurs, vu leur expression tissu spécifique et leur perte d'activité en présence d'un inhibiteur de croissance végétal, il a été postulé que les AGPs pourraient aussi être impliqués dans différents processus biologiques tels que la croissance et le développement végétal, la prolifération, l'expansion et l'adhésion cellulaire, l'embryogenèse et la croissance du tube pollinique (**Willats *et al*, 1996 ; Cosgrove, 1997 ; Kohorn *et al*, 2000**).

B.2. Les cellulose-synthases

Les cellulose-synthases font partie d'une large famille de gènes codants pour plusieurs isoformes remplissant différentes fonctions. Ces protéines impliquées dans la synthèse de la cellulose sont connues pour former des complexes en forme de rosettes (regroupement de plusieurs cellulose-synthases formant ainsi un complexe actif) associées à des sucrose-synthases (Susy) présents sur la face cytoplasmique de la membrane plasmique (**Kohorn *et al*, 2000**).

Par ailleurs, lorsque les cellulose-synthases sont reliées aux sucrose-synthases, un lien physique est établi entre la paroi et le cytoplasme, ce qui pourrait permettre une modification

de l'architecture pariétale. En effet, le contact entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette permet à la cellule de s'adapter en modifiant la nature des dépôts pariétaux ultérieurs, ce qui est le cas par exemple lors du processus de croissance et d'élongation cellulaire (**Kohorn et al, 2000**).

B.3. Les récepteurs kinases (RLK)

Tout comme les cellules animales, les cellules végétales sont capables de percevoir et de répondre aux signaux émanant de leur environnement. Cette perception se fait via des récepteurs kinases présents à l'interface paroi/membrane cellulaire. Ces récepteurs kinases peuvent activer des voies de transduction du signal permettant à la cellule de s'adapter en cas de besoin (**Shiu et Bleecker, 2001**).

Le séquençage du génome d'*Arabidopsis thaliana* (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000) a permis de mettre en évidence pas moins de 610 gènes codant pour des récepteurs kinases (**Shiu et Bleecker, 2001 ; Becraft, 2002**). Cependant, la plupart d'entre eux restent doublement orphelins, c'est à dire qu'on ne connaît ni leur ligand, ni leur voie de transduction du signal.

Les RLK présentent 3 domaines principaux ayant chacun une fonction spécifique : un domaine extracellulaire N-terminal impliqué dans la perception de signaux extracellulaire, un domaine transmembranaire hydrophobe permettant l'ancrage en membrane plasmique et un domaine intracellulaire kinase impliqué dans l'activation d'une voie de transduction du signal.

La classification des RLK peut se faire suivant 2 critères. Le premier est basé sur le type de domaines et de sous-domaines constituant le domaine extracellulaire du récepteur (**Shiu et al, 2001**). En effet, il existe de nombreux domaines tels que les domaines riches en leucines (LRR), les domaines PAN (Plasma-Appel-nematode), les domaines leucines ou encore les domaines EGF (Epithelium Growth Factor) (**figure 6**).

Le deuxième critère prend uniquement en compte la nature du domaine kinase intracellulaire. La majorité des RLK végétaux présentent un domaine intracellulaire de type sérine/thréonine kinase malgré la récente découverte de plusieurs récepteurs à domaine tyrosine kinase, peu connu jusqu'alors dans le règne végétal (**Sugiyama et al, 2008**).

Malgré la découverte d'un grand nombre de fonctions biologiques associées aux récepteurs à domaine sérine/thréonine kinase, les ligands et voies de transduction du signal de ceux-ci restent très souvent méconnus. Cependant, certains de ces récepteurs sont maintenant mieux caractérisés. C'est le cas des 5 récepteurs kinases présentés ci-dessous.

B.3.1. Le récepteur SRK

Certaines plantes, comme *Brassica*, ont développé au cours de l'évolution un mécanisme visant à empêcher l'autofécondation. C'est le récepteur SRK (S-locus receptor kinase) qui est responsable de la régulation de ce mécanisme.

Le récepteur est situé dans la membrane plasmique des cellules composant le pistil et possède un allèle S, spécifique à chaque individu. Le grain de pollen possède lui aussi un

allèle S spécifique, déterminé par la petite protéine SP11 (S locus protein 11) présente dans son manteau. Ainsi, lorsqu'un grain de pollen et le pistil de la plante portent le même allèle S, le récepteur SRK déclenche des mécanismes visant à inhiber l'hydratation, la germination et la croissance du tube du pollen, empêchant ainsi l'autofécondation (**Haffani et al, 2004**).

Le mécanisme d'action du récepteur SRK est le suivant (**figure 7**) :

- En présence de grains de pollen génétiquement différents au pistil de la plante (SP11 et SRK présentant un allèle S différent), 2 thiorédoxines intracellulaires (thiorédoxin-H-like-1 et thiorédoxin-H-like-2) inhibent la phosphorylation du domaine sérine/thréonine kinase de SRK en maintenant les résidus cystéines sous forme réduite (**Cabrillac et al, 2001**). La fécondation de la plante peut dès lors se réaliser.
- En présence de grains de pollen génétiquement identiques au pistil de la plante (SP11 et SRK présentant un allèle S identique), la protéine SP11 du pollen va se fixer sur le récepteur SRK et l'activer. Le récepteur SRK s'autophosphoryle et phosphoryle à son tour un interactant intracellulaire nommé ARC1 (arm-repeat-containing-1). ARC1 est une ubiquitine ligase E3 qui va ubiquitiner les substrats responsables de l'incompatibilité (protéines encore inconnues à ce jour), provoquant ainsi leurs destructions par le protéasome et menant au rejet du pollen (**Haffani et al, 2004**).

B.3.2. Le récepteur CLAVATA

Le récepteur CLAVATA, composé de 3 loci au sein du génome d'*Arabidopsis thaliana*, est connu pour être impliqué dans l'organogenèse et la morphogenèse en contrôlant la prolifération des cellules souches au niveau du méristème apical (**Haffani et al, 2004**). En effet, Torii et son équipe ont montré qu'une mutation *clv* cause un élargissement du méristème et une augmentation du nombre d'organes floraux et de verticilles (**Torii et al, 2000**).

Le récepteur CLAVATA est composé de 2 protéines, CLV1 et CLV2 liées entre elles par des ponts disulfures. En présence du ligand CLV3 sécrété par les cellules méristématiques, le récepteur CLAVATA forme un dimère (**Fletcher et al, 1999**). CLV1 est un récepteur à domaine sérine/thréonine kinase, constitué d'un domaine extracellulaire présentant des répétitions riches en leucines. CLV2 est un récepteur CLV1 exempt du domaine intracellulaire kinase (**Haffani et al, 2004**).

En présence de CLV3, le complexe CLV1/CLV2 dimérise, ce qui induit la transphosphorylation du récepteur. Cette transphosphorylation va permettre le recrutement de ROP (Rho-GTPase-related protein), une petite protéine liant le GTP. Cette GTPase, agissant en aval du récepteur, va initier une cascade de MAP kinases menant à la répression du gène *wuschel* impliqué dans la croissance des cellules souches du méristème apical (**Haffani et al, 2004**) (**figure 8**).

Plusieurs régulateurs négatifs sont associés au fonctionnement de ce récepteur à savoir la protéine KAPP qui va déphosphoryler CLV1 après son activation et la protéine POL

(POLTERGEIST) codant pour une PP2C (protein phosphatase 2C) agissant sur la voie de transduction du signal de CLAVATA (Yu *et al*, 2003 ; Haffani *et al*, 2004).

B.3.3. Le récepteur FLS2

Le récepteur FLS2 (FLAGELLIN SENSING 2) est un récepteur à domaine sérine/thréonine kinase impliqué dans la réponse immunitaire innée via la reconnaissance d'un domaine très conservé de 15 acides aminés présent sur la flagelline des bactéries gram négatives (Gomez-Gomez, 2001). Ainsi, lors d'une interaction FLS2/Flagelline, le récepteur dimérise, s'autophosphoryle et initie l'activation d'une cascade de MAPK menant à la libération des facteurs de transcription WRKY 22 et 29. Ces derniers, retenu dans le cytoplasme en absence de pathogènes, se dirigent vers le noyau et induisent l'expression de gènes impliqués dans la réponse immunitaire innée du végétal (Haffani *et al*, 2004) (figure 9).

B.3.4. Le récepteur BRI1

Le récepteur BRI1 (BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1) est un récepteur à domaine sérine/thréonine kinase composé d'un domaine extracellulaire constitué de 25 répétitions riches en leucines (LRRs) dans lesquelles est intercalé (entre les 21 et 22 ème LRRs) un îlot de 70 acides aminés indispensables au bon fonctionnement du récepteur (Becraft, 2002). Ce domaine extracellulaire perçoit des brassinolides (BR) et induit à la fois l'expression de gènes impliqués dans la division et l'élongation cellulaire tels que les gènes *CycD3* et *TCH4* mais aussi la répression d'autres gènes tels que le gène *BRH1* (Becraft, 2002 ; Haffani *et al*, 2004).

Le mécanisme d'action du récepteur est le suivant :

- En présence de brassinostéroïdes (BR), c'est-à-dire lorsque la protéine BRS1 (BRI1 suppressor dominant) clive la protéine liant le stéroïde (SBP) et la rend active, le domaine extracellulaire du récepteur BRI1 est capable de lier le complexe SBP-BR (brassinostéroïde) (Clouse *et al*, 2002). Ensuite le récepteur BRI1 est capable de former un hétérodimère avec un second récepteur nommé BAK1 (BRI1-associated receptor kinase 1). Ce récepteur BAK1 ne possède que 5 répétitions riches en leucines et est dépourvu de l'îlot de 70 acides aminés présent chez BRI1 (Tichtinsky *et al*, 2003).

La formation de cet hétérodimère mène à la transphosphorylation du domaine kinase de BAK1 conduisant à la phosphorylation du premier interactant intracellulaire, BIN2 (Brassinosteroid insensitive 2). BIN2 est une protéine kinase agissant comme un régulateur négatif sur l'activation de facteurs de transcription. En effet, lorsque la protéine BIN2 est phosphorylée, elle est rendue inactive et ne peut pas phosphoryler les facteurs de transcription BES1 (BRI1-EMS-suppressor 1) et BZR1 (Brassinazole-resistant 1), ce qui empêche leurs destructions par le protéasome. Dès lors, ceux-ci sont capables de se rendre dans le noyau grâce à leur séquence NLS et activent la transcription des gènes *Cyc D3* (cycline D3 impliquée dans la division cellulaire), *TCH4* (gène codant pour une xyloglucane endoglycosyltransférase impliquée dans l'élongation cellulaire) et répriment le gène *BRH1* (Molnar *et al*, 2002) (figure 10).

En absence de brassinostéroïdes (BR), la dimérisation de BRI1 et BAK1 ne se produit pas, ce qui permet à la protéine kinase BIN2 de rester active et de phosphoryler les facteurs de transcription BES1 et BZR1. La phosphorylation de ces 2 facteurs est perçue comme un signal de destruction par le protéasome (He *et al*, 2000 ; Becraft *et al*, 2002).

B.3.5. Les kinases associées à la paroi ou WAKs

B.3.5.1. Généralités

Les WAKs sont des récepteurs à domaine sérine/thréonine kinase et font partie d'une des 16 sous-familles de récepteurs sérine/thréonine présentes chez les végétaux. Les WAKs, de part leur activité kinase, apparaissent comme étant de très bons candidats pour effectuer un pontage signalétique entre la paroi cellulaire et la membrane plasmique. Cependant aucune voie de transduction du signal sous-jacente à l'activation de ce récepteur n'a pu être mise en évidence à ce jour.

Chez *Arabidopsis thaliana*, les gènes codant pour les récepteurs de la famille WAK sont au nombre de 5 (WAK1 à WAK5) et sont regroupés sur une petite portion de 30 kb au niveau du chromosome 1 (He *et al*, 1996 ; He *et al*, 1999). Verica et son équipe ont agrandi la famille des récepteurs WAKs en y ajoutant 21 autres gènes nommés WAKL (WAK-Like) qui, à la différence des gènes WAKs précédemment découvert, sont localisés sur l'ensemble des 5 chromosomes d'*Arabidopsis thaliana* et encodent pour une forme tronquée du récepteur (Verica *et al*, 2002).

Le domaine extracellulaire des WAKs, situé au niveau de la paroi cellulaire, est peu conservé entre les différentes isoformes (40-64 % d'homologie), ce qui laisse penser qu'il serait responsable de la spécificité de fonction de l'isoforme. Ce domaine extracellulaire contient également deux sous-domaines EGF (EGF-Ca et EGF₂) présents chez toutes les isoformes de WAKs (Cosgrove, 2001 ; Lally *et al*, 2001). Chaque isoforme possède au niveau de ses sous-domaines EGF, une petite région de 6 résidus de cystéines conservés dans laquelle s'intercale des acides aminés variables (He *et al*, 1999 ; Kohorn, 2001 ; Verica *et al*, 2002).

Les sous-domaines EGF, qui peuvent lier le calcium (EGF-Ca) ou pas (EGF₂) sont connus pour être impliqués dans les interactions de type protéine-protéine (Kohorn, 2001 ; Park *et al*, 2001).

De plus, le domaine extracellulaire contient des séquences en acides aminés partiellement homologues à des protéines que l'on retrouve dans la matrice extracellulaire des mammifères (He *et al*, 1999 ; Kohorn 2001). En effet, des séquences faisant référence à celles du collagène, de la neurexine et la tenascine ont été identifiées (figure 11). Le rôle de ces sous-domaines n'est pas encore connu mais une hypothèse suggère qu'ils favoriseraient les interactions de type protéine-protéine et l'oligomérisation (He *et al*, 1999).

Le domaine transmembranaire est composé de résidus hydrophobes permettant l'insertion du récepteur en membrane plasmique (He *et al*, 1999, Verica *et al*, 2002). Il existe également un domaine juxtamembranaire cytoplasmique situé juste en aval du domaine transmembranaire.

Enfin, le domaine kinase intracellulaire, responsable de l'initiation de la transduction du signal, est quant à lui très bien conservé entre les différentes isoformes (86 % d'homologie) (**He et al, 1996 ; He et al, 1999**).

En ce qui concerne les voies de transduction du signal initiées après activation de ce domaine kinase, elles sont encore inconnues à ce jour. Cependant, un groupe de recherche a quand même réussi à isoler par des tests doubles hybrides en levure et des expériences d'immunoprécipitation, un premier interactant intracellulaire, la protéine OEE2 (Oxygen-evolving enhancer 2) (**Yang et al, 2003**). OEE2 favorise l'oxydation de 2 molécules d'H₂O en 4 H⁺, 4^e et une molécule O₂, permettant ainsi le maintien d'un taux suffisant d'O₂, accepteur final de la chaîne d'électrons chloroplastique. OEE2 modulerait ainsi le rapport H₂O₂/O₂⁻, molécules connues pour jouer un rôle dans la lutte contre les pathogènes (**Ridley et al, 2001 ; Yang et al, 2003**).

B.3.5.2. Expression des WAKs

Afin de quantifier le niveau d'expression et de déterminer la localisation de chaque isoforme, plusieurs études prônant des techniques différentes ont été réalisées. He et son équipe ont montrés, par l'utilisation de sondes anti-WAK, que les isoformes WAK1 et WAK2 étaient les formes les plus abondantes et se localisaient essentiellement au niveau de la tige et des feuilles (**He et al, 1999**).

Wagner et Kohorn ont confirmés ces résultats grâce à l'utilisation de plantules d'*Arabidopsis thaliana* transformées avec le gène rapporteur GUS (β -glucuronidase) sous contrôle d'un promoteur WAK spécifique à chaque isoforme (WAK1-5) (**Wagner et Kohorn, 2001**). Ils montrèrent que WAK1 et WAK2 étaient exprimés dans les tissus vasculaires du pétiole, dans le méristème apical, dans les racines et dans les bourgeonnements floraux. De plus, les isoformes WAK1 et WAK2 peuvent être exprimées en même temps dans un même organe mais à un endroit différent (**Wagner et Kohorn, 2001**).

En ce qui concerne le gène WAK3, il semblerait qu'il soit exprimé dans la tige et les feuilles mais également au niveau de micro-lésions induites par les pathogènes (**He et al, 1999 ; Wagner et Kohorn, 2001**). Enfin, WAK4 serait uniquement exprimé au niveau des siliques (**Wagner et Kohorn, 2001**) tandis que WAK5 serait détectable dans les tiges, les feuilles et les racines (**He et al, 1999 ; Wagner et Kohorn, 2001**).

B.3.5.3. Fonctions des WAKs

B.3.5.3.1. Elongation cellulaire : Implication des protéines WAK2 et WAK4

La paroi cellulaire constitue une structure compacte et rigide encadrant la cellule végétale, lui conférant une forme particulière et une protection contre les éléments exogènes. Cependant la robustesse des éléments constitutifs de la paroi cellulaire doit être modifiée pour permettre l'élongation de la cellule. De par leur localisation en membrane plasmique, les WAKs sont de sérieux candidats régulateurs de cette élongation cellulaire.

Ainsi, Wagner et Kohorn ont montré que l'expression d'anti-sens d'ARNm WAK2 sous le contrôle d'un promoteur inductible au dexaméthasone réduisait de 50 % le niveau d'expression de WAK2, inhibant ainsi l'élongation cellulaire (Wagner et Kohorn, 2001). En effet, la majorité des plantules transgéniques exprimaient un phénotype nain (Wagner et Kohorn, 2001).

Une étude plus récente vient confirmer l'implication de WAK2 dans la croissance cellulaire (Kohorn *et al*, 2006). Une réduction de l'activité de l'invertase vacuolaire est détectable dans les plantules d'*Arabidopsis thaliana* exprimant une version mutée du gène WAK2. Il semblerait donc que WAK2 régule la transcription de l'invertase vacuolaire. Cette invertase joue un rôle direct dans la croissance cellulaire en agissant sur le métabolisme des sucres et dans la régulation des mécanismes de turgescence à travers la mobilisation de solutés (Kohorn *et al*, 2006).

De façon assez similaire à WAK2, WAK4 semble aussi impliquée dans l'élongation cellulaire en régulant la quantité disponible de certaines extensines, protéines connues pour rompre les liens non-covalents entre les polysaccharides pariétaux (Lally *et al*, 2001). En effet, des plantules d'*Arabidopsis thaliana* transformées avec une construction anti-sens WAK4 présentent un blocage dans l'élongation de l'hypocotyle, des racines et des feuilles (Lally *et al*, 2001).

B.3.5.3.2. Réponses de défense cellulaire : Implication de la protéine WAK1

He et son équipe furent les premiers à mettre en évidence l'implication de la protéine WAK1 dans les réponses contre les pathogènes (He *et al*, 1998). Ils ont montré que des plantules d'*Arabidopsis thaliana* traitées avec de l'acide salicylique (SA) ou avec son homologue synthétique l'acide 2,2- dichloroisonicotinique (INA) induisait l'augmentation du

nombre de transcrits de WAK1 et de PR1, PR2 et PR5. Le SA est une molécule naturellement produite au niveau du site d'infection après une attaque par un pathogène.

L'induction parallèle de WAK1 et des protéines PR laisse penser que WAK1 puisse elle-même être une protéine PR. Ceci fut vérifié via l'utilisation de plantules transgéniques possédant la mutation *npr1*. En présence de SA, NPR1 régule positivement la production de protéines PR. Les plantules mutées pour le gène *npr1* présentaient un niveau transcriptionnel de WAK1 nettement inférieur aux plantes non-mutées pour ce gène (He *et al*, 1998). Ceci suggère que WAK1 puisse être une protéine PR.

Ensuite, à travers l'utilisation de constructions mutantes de la protéine WAK1, les auteurs montrèrent que WAK1 ne participait pas à la réponse de défense en tant que telle mais en réduisant la toxicité de SA générée durant cette attaque (He *et al*, 1998).

Les 4 constructions mutantes suivantes furent produites :

- une construction sens (sWak) codant pour la protéine en entier.
- une construction antisens (aWak).
- une construction codant pour les domaines extracellulaire et transmembranaire de la protéine (nWak).
- une construction codant pour les domaines transmembranaire et kinase de la protéine (kWak).

Les plantes transformées avec la construction sWAK présentaient un taux de survie élevée en présence d'une plus forte concentration en SA (0,5 mM).

Les plantules transformées avec la construction antisens (aWak) présentaient un taux de survie relativement faible et ce même en présence d'une faible concentration en SA (0,1mM). Ces 2 résultats suggèrent une implication de la protéine WAK1 dans la détoxification du SA.

En rassemblant tous ces résultats ensemble, He et son équipe ont proposé un modèle de fonctionnement de WAK1 dans les réponses contre les pathogènes (**figure 12**).

Ils proposent que l'attaque de la paroi cellulaire par un pathogène induise une production de SA, molécule toxique en cas d'accumulation. Le SA permettrait l'activation du régulateur positif NPR1, qui stimulerait le taux de transcription de *WAK1* et des protéines *PR1*, 2 et 5. Les protéines PR et WAK1 seraient capables de réduire la toxicité de SA et d'induire un effet protecteur prolongé via la formation d'une boucle de rétroaction positive sur le régulateur NPR1 (**He et al, 1998**).

B.3.5.4. Interactions entre WAK1 et les éléments pariétaux

B.3.5.4.1. Interaction WAK1-AtGRP3

Park et son équipe ont montré par la technique de double hybride qu'une GRP, en l'occurrence l'AtGRP3, était capable de lier le domaine extracellulaire de WAK1 au niveau de son domaine EGF (**Park et al, 2001**). Les GRP présentent des domaines riches en glycine qui peuvent être de différents types : GGGX, GXGX ou GGXXXGG. Cependant il semblerait que WAK1 n'interagisse qu'avec l'AtGRP3, une GRP à domaine GGXXXGG (**Park et al, 2001**). De plus, en condition « in vivo », WAK1 et AtGRP3 forment un complexe multimérique de 500 kDa avec la phosphatase KAPP (**Park et al, 2001**).

Par ailleurs, les travaux réalisés par He et son équipe ont montré que l'expression des protéines WAK1 et AtGRP3 étaient induites par un traitement de SA (**He et al, 1998**). Etant donné que l'augmentation du taux d'expression des protéines WAK1 et AtGRP3 est associé avec l'augmentation du taux de transcription des protéines *PR* (**He et al, 1998**), il a été suggéré que les protéines WAK1 et AtGRP3 interagissaient en surface cellulaire et déclenchaient l'activation d'une voie de transduction du signal menant à la transcription de gènes impliqués dans la défense contre les pathogènes (**Park et al, 2001**).

B.3.5.4.2. Interaction WAK1- Pectine

En 1996, He fut le premier à mettre en évidence l'existence d'une association forte entre WAK1 et la pectine. Des digestions à la pectinase ou un bain bouillant dans une solution de SDS 4%- DTT 50 mM étaient les seuls moyens efficaces pour rompre la liaison existante entre la pectine et WAK1 (**He et al, 1996**). Dès lors, il fut proposé que la liaison entre WAK1 et la paroi cellulaire était de type covalente (**He et al, 1996 ; Wagner et Kohorn, 2001**).

Cependant la nature de cette liaison fut remise en question par Decreux et Messiaen qui démontrèrent qu'elle n'était pas de type covalente mais de type ionique (**Decreux et Messiaen, 2005**). Ils montrèrent que WAK1 interagissait seulement avec des chaînes d'OGAs présentant un degré de polymérisation (DP) > 9, DP minimal requis pour la formation de « egg-box » (**Liners et al, 1992 ; Messiaen et Van Custem, 1994 ; Ridley et al, 2001**). De plus, la liaison entre WAK1 et la pectine était inhibée lorsque les OGAs possédaient un degré d'estérification compris entre 65 et 90 %, suggérant une implication des charges négatives dans l'interaction WAK1-Pectine. Ceci renforce l'hypothèse de la liaison de type ionique (**Decreux et Messiaen, 2005**).

Decreux et Messiaen mirent en évidence que les OGAs de DP >9 en conformation « egg-box » interagissaient avec des résidus hydrophiles chargés positivement présents dans le domaine extracellulaire de WAK1 (**Decreux et Messiaen, 2006**).

Grâce à l'utilisation d'une méthode de prédiction basée sur l'analyse d'alignement de clusters hydrophobes et de structures secondaires du domaine extracellulaire de WAK1, ils montrèrent que les domaines compris entre le 90^{ème} et 105^{ème} et entre le 160^{ème} et 170^{ème} acide aminé étaient impliqués dans la liaison avec la pectine. Parmi les acides aminés présents dans ces domaines, ils décidèrent de muter les résidus arginines R91 et R166 et les résidus lysines K101 et K102. Ces résidus furent choisis car ce sont des résidus chargés positivement situés en périphérie du domaine extracellulaire de WAK1, ce qui font d'eux des candidats potentiels dans l'interaction avec les OGAs de DP>9 en conformation « egg-box » (**Decreux et Messiaen, 2006**).

Cette hypothèse fut rapidement confirmée puisque le remplacement par mutagenèse dirigée des résidus hydrophiles R166 et K101-102 par des résidus hydrophobes (R166Q ; K101-102T) inhibaient la liaison entre la pectine et WAK1 (**Decreux et Messiaen, 2006**). Une nouvelle fois, cela confirme la nature ionique de la liaison entre la pectine et le domaine extracellulaire de WAK1 est de type ionique (**Decreux et Messiaen, 2006**).

Par ailleurs, Cabrera montra, en condition « in vitro » et ce grâce à l'utilisation de l'anticorps monoclonal 2F4, que la liaison entre WAK1 et les OGAs était directement influencée par le niveau de maturation des chaînes d'OGAs (**Cabrera et al, 2008**). Ainsi, lorsque la conformation en « egg-box » est « mature », c'est-à-dire lorsque les chaînes d'OGAs sont associés en dimères parfaitement stables (**figure 13**), il y a une activation des réponses précoces de défense telle qu'une alcalinisation du milieu extracellulaire et dans une moindre mesure une activité peroxydase et un efflux d'ions K⁺ (**Cabrera et al, 2008**).

De plus, une modification de l'extrémité réductrice des OGAs visant à ajouter une fonction alcool (OH) en C-1 diminuait significativement l'alcalinisation du milieu extracellulaire et la

production d'H₂O₂ mais n'affectait pas l'efflux des ions K⁺ (Cabrera *et al*, 2008). Ceci suggère l'existence de 2 moyens de perception différents des OGAs.

Cabrera proposa 2 types de récepteurs différents (**figure 14**) : le premier reconnaît uniquement les jonctions en «egg-box» tandis que le deuxième reconnaît plutôt l'extrémité réductrice des OGAs. Ce dernier récepteur serait impliqué dans les réponses de défenses précoces des végétaux (Cabrera *et al*, 2008).

Les interactions entre les récepteurs à activité kinase et les éléments pariétaux, décrites ci-dessus, doivent conduire d'une façon ou d'une autre à une régulation de l'expression de certains gènes. Ainsi de nombreuses études ont été réalisées pour définir l'implication exacte des fragments pectiques dans la signalisation cellulaire.

C. Implication des fragments pectiques dans la signalisation cellulaire

En 1970, Albersheim fut le premier scientifique à découvrir que des fragments pariétaux de champignon étaient capables d'induire la production de phytoalexines, antibiotiques naturels intervenant dans les réactions de défense chez les végétaux. La notion d'« oligosaccharine » fut donnée à toute molécule signal (ou éliciteur) capable d'induire une réponse de défense chez les plantes (**Vorwerk *et al*, 2004**).

Les cellules végétales sont également capables de répondre à des molécules issues de leur propre paroi cellulaire. Durant une attaque, les pathogènes produisent des pectates lyases et des polygalacturonases, enzymes capables de digérer la paroi cellulaire. La digestion de la paroi permet de générer des fragments pectiques de différentes tailles (OGA de DP ≤ 9) (**Mellersh et Heath, 2001**) impliqués dans la mise en place d'une réponse de défense efficace chez la plante (**Ridley *et al*, 2001**). Ces OGAs déclenchent des réponses biologiques qui varient fortement selon l'espèce du végétal et leur degré de polymérisation (DP ≥ 9). Deux types de réponses sont possibles, à savoir des réponses de défense ou des réponses morphogénétiques, c'est-à-dire influençant la croissance et le développement du végétal (**Côté et Hahn, 1994**).

Par ailleurs, les réponses induites par les OGAs ne sont pas uniquement dépendantes du degré de polymérisation (DP $\geq$ ou < 9) mais également de la concentration à laquelle les OGAs sont présents. Ainsi, l'hypothèse de l'existence de 2 classes de récepteurs présentant une affinité différente a été avancée (**Ridley *et al*, 2001**).

En effet, il faut un récepteur de haute affinité reconnaissant les OGAs en faible quantité (10^{-7} M) pour uniquement induire des réponses morphogénétiques mais il faut également un récepteur à faible affinité activé uniquement en présence d'une forte concentration d'OGAs (10^{-4} M), concentration émanant d'une situation pathologique (**Ridley *et al*, 2001**).

C.1. Les réponses de défense

Pour faire face à une infection provoquée par une bactérie, un virus, un champignon ou tout autres pathogènes, les végétaux ont développé 2 types de réponses de défense à savoir la réponse dite « réponse hypersensible » (HR) et la réponse dite « réponse systémique acquise » (SAR) (**Montesano, 2003**).

La réponse hypersensible est une réponse de type locale, déclenchée par des OGAs de grandes tailles (OGAs de DP compris entre 9 et 16) ayant pour but de restreindre la propagation du pathogène au site infecté.

Ainsi, ces OGAs de grande taille vont activer des réponses mécaniques telles que la fermeture des stomates (chez la tomate), la lignification de la paroi cellulaire et l'induction de réponses de défense de type locale, c'est-à-dire limitée au site d'infection et conduisant à la mort programmée des cellules infectées (**Côté et Hahn, 1994 ; Reymond *et al*, 1995 ; Ridley *et al*, 2001**).

Ces réponses locales sont plus connues sous le nom de choc oxydatif et requièrent la synthèse de phytoalexines (antibiotiques des végétaux), de protéines PR (pathogenesis-related proteins), de peptides toxiques et de ROS (H_2O_2 et O_2^-). Toutes ces protéines ont un effet cytotoxique sur le pathogène, ce qui permet de limiter sa propagation au sein du végétal (**Côté et al, 1998 ; Ridley et al, 2001**). Ce choc oxydatif, déclenché seulement quelques minutes après l'attaque du pathogène, a été mis en évidence chez le soja, le tabac et la tomate (**Ridley et al, 2001**).

De plus, les OGAs initient des cascades traductionnelles menant à l'activation de gènes et à la production de protéines impliquées dans des réactions de défense (**Côté et Hahn, 1994**).

Ainsi, l'application d'OGAs chez la tomate induit l'expression d'inhibiteurs de protéases (inhibiteurs I et II) permettant de réduire la digestion de la paroi (en inhibant les protéases sécrétées par le pathogène) et du même coup la disponibilité en carbone, source de nourriture pour le pathogène (**Ridley et al, 2001**).

Les OGAs induisent également la production de phénylalanine ammonia-lyase (PAL), enzyme impliquée dans la production du phenylpropanoïde (molécule de défense) dans les cellules en suspension de carottes et de tomates (**Messiaen et Van Custem, 1994 ; Lapous et al, 1998**).

Une lignification de la paroi cellulaire est également induite par les OGAs. Ces OGAs induisent le remodelage de la paroi cellulaire via une accumulation d' H_2O_2 interagissant avec les protéines et les polymères pariétaux et via une accumulation de glycoprotéines riches en hydroxyproline (HRGPs) induisant un renforcement de la structure pariétale (**Boudart et al, 1995 ; Ridley et al, 2001**).

De plus, les OGAs régulent l'expression d'une série d'enzymes pariétales également impliquées dans le remodelage enzymatique de la paroi telles que l'endopolygalacturonase ou la PGIP (endogalacturonases inhibiting protein) (**Ridley et al, 2001**).

Enfin, une mobilisation du calcium cytosolique, une dépolarisation de la membrane cellulaire et une acidification du cytosol menant à la transcription de gènes de défense est également induite par les OGAs (**Messiaen et al, 1993 ; .Messiaen et Van Custem, 1994 ; Navazio et al, 2002 ; Ridley et al, 2001**).

Les végétaux sont également capables de développer une réponse systémique acquise (SAR). Il s'agit d'une réponse de type générale conférant une résistance à l'échelle de la plante entière. Par ailleurs, ce type de réponse peut être comparée à un vaccin naturel, dans le sens où la protection qu'elle engendre est post-posée dans le temps et permet une réponse défensive plus rapide et plus efficace en cas de nouveau contact avec un pathogène (**Montesano, 2003**).

C.2. Les réponses morphogénétiques

Les réponses morphogénétiques, c'est à dire les réponses régulant la croissance et le développement du végétal, sont généralement induites par des fragments pectiques de plus petites tailles ($DP < 9$) souvent compris entre 2 et 6 monomères. L'ensemble des réponses déclenchées par ce type d'OGAs ont un effet opposé à celui de l'auxine (hormone végétale

favorisant l'élongation cellulaire) sauf dans le cas du mûrissement des fruits (**Ridley *et al*, 2001**). Ainsi, nous savons que les OGAs de petite taille inhibent :

- les effets de l'auxine dans l'élongation de la tige du pin.
- la formation de racines chez des explants foliaires de tabac (**Ridley *et al*, 2001**).

Par contre, ces OGAs induisent un effet stimulateur dans le mûrissement des fruits via une production d'éthylène (chez la tomate) (**Campbell et Labavitch, 1991**).

D. Détermination de l'activation de WAK1 par les fragments pectiques : concept du récepteur hybride

La famille des WAKs comprend 5 membres différents, dont le mieux caractérisé est l'isoforme WAK1. Comme dit précédemment, WAK1 est un récepteur sérine/thréonine kinase impliqué dans les réponses de défense chez les végétaux et dont les deux seuls ligands extracellulaires connus à ce jour sont l'AtGRP3 et la pectine. Par ailleurs, les voies de transduction du signal et les gènes cibles de WAK1 demeurent toujours non caractérisées. Nous avons donc optés pour la construction d'un récepteur hybride afin de déterminer si les fragments pectiques activaient le récepteur WAK1.

Une telle approche a déjà été utilisée avec succès dans le cadre de l'étude du récepteur aux brassinostéroïdes (BRI1). Dans cette étude, He et son équipe déterminèrent que les brassinostéroïdes (BR) étaient les ligands du récepteur BRI1. (He *et al*, 2000).

Pour ce faire, He et son équipe ont fusionné le domaine extracellulaire du récepteur BRI1 avec le domaine intracellulaire kinase du récepteur Xa21. En cas de liaison entre les BR et le domaine extracellulaire de BRI1, le récepteur était activé et conférait une résistance contre la bactérie *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*. Cette résistance se traduisait par une mort cellulaire programmée des cellules infectées, une production d'H₂O₂ et l'activation de plusieurs gènes de défense tels que la chitinase, la phénylalanine ammonia-lyase (PAL) et la catalase.

Afin de déterminer quels domaines de BRI1 étaient indispensables à la liaison avec les BR, 3 récepteurs hybrides furent construits (**figure 15**) :

- Le récepteur hybride NRG-1, composé du domaine LRR, transmembranaire (TM) et juxtamembranaire (JM) de BRI1 fusionné avec le domaine intracellulaire kinase (IC) de Xa21.
- Le récepteur hybride NRG-2, composé du domaine LRR de BRI1 fusionné avec les domaines TM, JM et IC de Xa21.
- Le récepteur hybride NRG-3, composé du domaine LRR et TM de BRI1 fusionné avec les domaines JM et IC de Xa21.

Il s'avéra que seul le récepteur hybride NRG-1 était capable de lier les BR.

Les auteurs ont entrepris une expérience de mutagenèse dirigée sur le récepteur NRG-1 générant ainsi 2 nouveaux récepteurs (NRG1ml et NRG1mk), servant de contrôle négatif aux résultats enregistrés pour le récepteur NRG-1.

- NRG1ml contient une mutation au niveau 661^{ème} acide aminé du domaine extracellulaire de BRI1 (glycine changée en glutamate) et a pour but de rendre impossible la liaison BRI1/BR. Cette construction mutante a permis de confirmer l'importance du domaine extracellulaire BRI1 dans la liaison avec les BR.
- NRG1mk contient une mutation au niveau de la poche catalytique (lysine changée en glutamate) du domaine intracellulaire kinase de Xa21, ce qui inhibe les réponses menant à la résistance contre la bactérie *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*.

E. Objectifs du mémoire

Dans le cadre de ce mémoire, nous allons contribuer à la caractérisation du récepteur WAK1 en étudiant son activation lors d'une interaction avec des fragments pectiques en conformation « egg-box ».

Etant donné que les voies de transduction du signal et les gènes cibles de WAK1 sont inconnus, il est impossible de déterminer si le récepteur WAK1 est actif ou non en présence de fragments pectiques en conformation « egg-box ».

Nous allons donc construire deux récepteurs hybrides inspirés de celui-ci utilisé par He et son équipe (**He et al, 2000**).

Ces 2 récepteurs hybrides nommés WAK1-BRI1 et WAKJUX1-BRI1 divergeront l'un de l'autre par la présence ou non du domaine juxtamembranaire de WAK1. Par contre, ils seront tout les deux composés du domaine extracellulaire et transmembranaire de WAK1 fusionné avec le domaine intracellulaire kinase de BRI1. BRI1 a été choisi car 3 de ces gènes cibles sont connus : *CycD3*, *TCH4* et *BRH1*. A travers la mesure du niveau d'expression de ces 3 gènes, il sera possible de déterminer si le récepteur hybride est activé en présence de fragments pectiques en conformation « egg-box ».

Dans un premier temps, il faudra cloner les séquences codant pour les domaines extracellulaire, transmembranaire (et juxtamembranaire) du gène *WAK1* et la séquence codant pour le domaine intracellulaire kinase du gène *BRI* dans le plasmide pCRII. Ces séquences seront ensuite fusionnées pour former une séquence hybride.

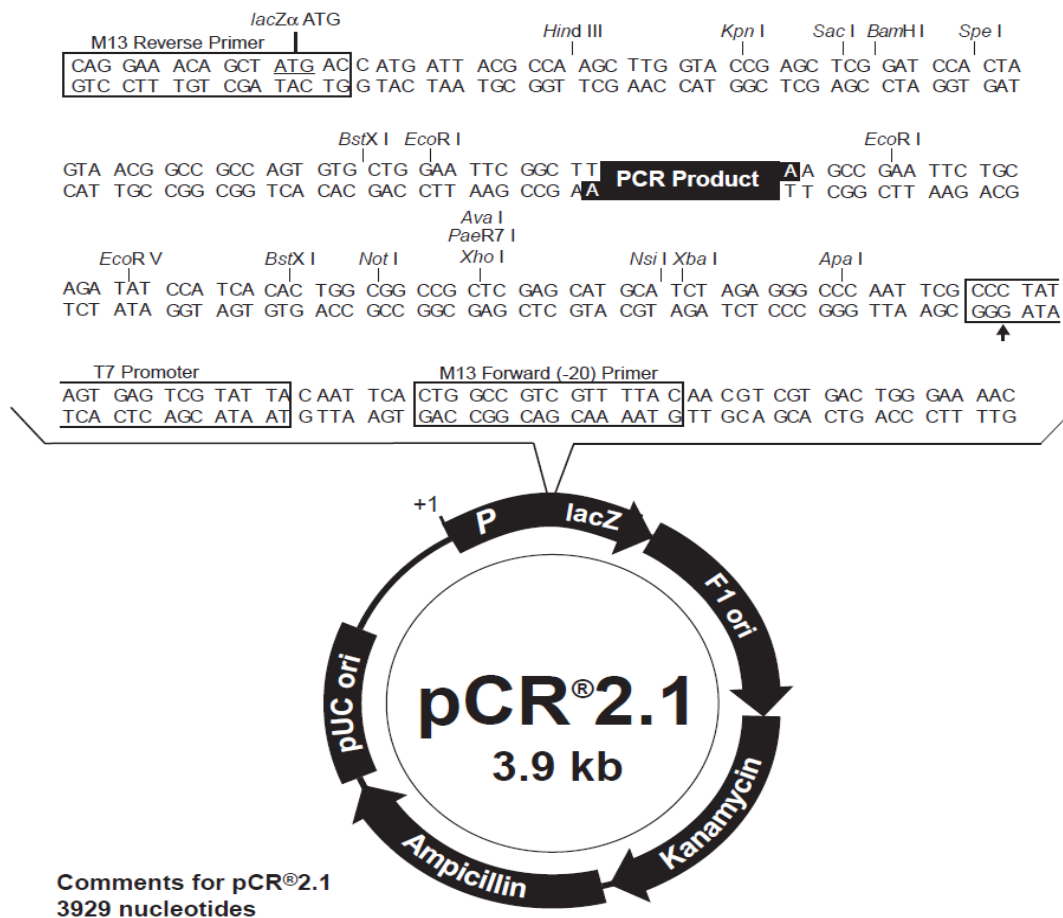
Dans un second temps, cette séquence hybride servira de base à la conception de versions mutées servant de contrôle négatif à l'activation du récepteur hybride. La séquence hybride et ses versions mutées seront transférées dans le plasmide pBI121 et intégrées dans le génome d'*Arabidopsis thaliana* par transformation florale avec *Agrobacterium tumefaciens*.

Dans un dernier temps, il faudra isoler des plantules transformées et tester l'activation ou non du récepteur hybride muté ou non lors en présence de fragments pectiques en conformation « egg-box ». Cette activation sera évaluée en quantifiant le niveau d'expression des ARNm des gènes *CycD3*, *TCH4* et *BRH* par la technique de RT-PCR semi-quantitative.

II. Matériel et Méthodes

A. Les vecteurs utilisés

A.1. Le vecteur pCRII



Comments for pCR®2.1
3929 nucleotides

LacZα gene: bases 1-545
M13 Reverse priming site: bases 205-221
T7 promoter: bases 362-381
M13 (-20) Forward priming site: bases 389-404
f1 origin: bases 546-983
Kanamycin resistance ORF: bases 1317-2111
Ampicillin resistance ORF: bases 2129-2989
pUC origin: bases 3134-3807

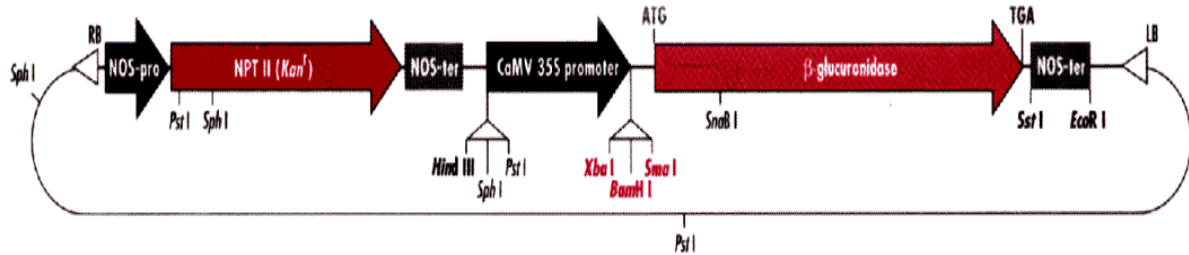
Figure 1 : le vecteur pCRII (invitrogen).

Le vecteur pCRII, d'une longueur de 3929 pb, contient un gène de résistance à la kanamycine et à l'ampicilline sous contrôle du promoteur T7, permettant la sélection de bactéries permettant de diagnostiquer l'insertion d'une séquence d'intérêt.

Le gène *lacZ* contient un site de clonage TA pour un produit PCR.

La présence de séquences complémentaires aux amorces Reverse et Forward offre un second moyen de vérifier par amplification PCR si l'insertion du produit PCR s'est bien déroulée.

A.2. Le vecteur pBI121



pBI121

Sma I
 TCT AGA GGA TCC CCG GGT GGT CAG TCC CTT ATG
Xba I BamH I

from Clontech
catalogue 1996 / 97

Figure 2 : le vecteur pBI121 utilisé pour la transformation des plantules d'*Arabidopsis thaliana* (clontech). Ce vecteur pBI121, d'une taille de 12000 pb, contient un T-DNA composé du gène β -glucuronidase (GUS) et d'un gène de résistance à la kanamycine.

Le T-DNA, délimité par des bords gauche (LB) et droit (RB), est transféré et intégré dans le génome d'*Arabidopsis thaliana* par transformation avec *Agrobacterium tumefaciens*.

Le gène *GUS* est sous contrôle du promoteur constitutif de la mosaïque du flou fleur tandis que le gène de résistance à la kanamycine est sous contrôle du promoteur de la nopaline synthase, tous deux inductibles en plante. La présence des sites de restriction *Xba*I et *Sst*I en amont et en aval du gène *GUS* permettent, par restriction enzymatique, de substituer ce dernier par un gène d'intérêt.

B. Les cultures de bactéries :

B.1. Les cultures d'*Escherichia coli*

B.1.1. Milieu LB

- Dissoudre 20 g de BactoYeast Extract (bactotryptone, NaCl, extrait de levure) dans 900 ml d'eau désionisée.
- Ajouter 15 g d'Agar (Fluka) pour réaliser un milieu LB solide.
- Ajuster à pH 7,0 et porter la solution à 1 litre.
- Autoclaver.

B.1.2. Milieu NZY⁺ Broth

- Dissoudre 10 g de caséine hydrolysée, 5 g de NaCl et 5 g d'extrait de levure dans 965 ml d'eau désionisée.
- Ajuster à pH 7,5 et autoclaver.
- Ajouter 10 ml de glucose 2M et 12,5 ml de MgCl₂ 1M et de MgSO₄ 1M stérile juste avant utilisation.

B.1.3. Préparation de *E.coli* TOP 10F' thermocompétentes

- Préparation du tampon CCMB80 avec les composants suivants filtrés (filtre 0,22 µm) (1 litre) :
 - 10 mM KOAc à pH 7,0
 - 80 mM CaCl₂.2H₂O
 - 20 mM MnCl₂.2H₂O
 - 10 mM MgCl₂.6H₂O
 - 10 % de glycérol
- Inoculer une pré-culture de *E.coli* TOP 10F' dans 200 ml de milieu LB liquide contenant 50 µg/ml de tétracycline, à 37°C overnight.
- Inoculer 400 ml de milieu LB liquide avec 10 ml de la pré-culture inoculée précédemment. Incuber à 170 rpm et 37°C jusqu'à atteindre une D.O._{590nm} de 0,3.
- Aliquoter 200 ml de la culture bactérienne dans 4 tubes de 50 ml stériles placés sur glace et sous hotte à flux laminaire vertical.
- Centrifuger à 4500 rpm à 4°C pendant 10 minutes puis éliminer le surnageant.
- Ajouter à chaque tube 20 ml de tampon CCMB80 stérile stocké à 4°C.
- Resuspendre les culots et pooler en 2 tubes de 50 ml.
- Incuber 20 minutes sur glace.
- Centrifuger à 4500 rpm pendant 10 minutes à 4°C puis éliminer le surnageant.
- Ajouter à chaque tube 2 ml de tampon CCMB80 stérile stocké à 4°C.
- Resuspendre les culots et pooler dans un tube de 50 ml.
- Tester la D.O._{590nm} en mélangeant 200 µl de bactéries avec 800 µl de milieu LB liquide jusqu'à atteindre 1-1,5.
- Incuber 20 minutes sur glace.
- Aliquoter en tubes eppendorf.
- Stocké à -80°C jusqu'à utilisation.

B.1.4. Transformation de *E.coli* TOP 10F' par choc thermique

- Dégeler sur glace un tube de 50 µl de cellules thermocompétentes.
- Ajouter 0,5 µg de produit de ligation dans le tube de cellules thermocompétentes et mélanger délicatement par inversion.
- Incuber 30 minutes sur glace.
- Procéder au choc thermique en incubant les cellules 30 secondes dans un bain à 42°C puis placées les 2 minutes sur glace.
- Ajouter 250 µl de milieu SOC stérile (2% tryptone ; 0,5% d'extrait de levure ; 10 mM de NaCl ; 2,5 mM de KCl ; 10 mM MgCl₂ ; 10 mM MgSO₄ ; 20 mM glucose)
- Transférer les cellules dans un tube de culture (Greiner) de 15 ml et incubé sous forte agitation (200 rpm) à 37°C pendant 1 heure.
- Etaler 150 µl de bactéries transformées sur un milieu LB solide sélectif.
- Incuber une nuit d'incubation à 37°C.

B.2. Les cultures d'*Agrobacterium tumefaciens* (LBA4404)

B.2.1. Préparation d'*Agrobacterium tumefaciens* électrocompétentes

- Incuber la souche d'*Agrobacterium tumefaciens* LBA4404/virG (invitrogen) dans 200 ml de milieu LB liquide contenant 25 µg/ml de streptomycine. Laisser agiter pendant 1 nuit à 28°C sous forte agitation (200 rpm).
- Diluer la culture jusqu'à obtention d'une D.O_{600nm} de 0,5-1.
- Centrifuger les bactéries à 4000 rpm pendant 10 minutes (Centrifugeuse Beckman J2-21) à 4°C.
- Eliminer le surnageant et resuspendre le culot bactérien dans 100 ml d'eau froide stérile.
- Centrifuger comme ci-dessus (de nouveau). Répéter les 2 dernières opérations deux fois.
- Resuspendre le culot bactérien dans 4 ml de glycérol 10 % stérile et froid. Transférer les bactéries dans un tube stérile de 15 ml et centrifuger à 4000 rpm à 4°C (Centrifugeuse Beckman Allegra X22-R).
- Eliminer le surnageant et resuspendre le culot bactérien dans 400 µl de glycérol 10% froid.
- Stocker les bactéries à -80°C jusqu'à utilisation.

B.2.2. Electroporation d'*Agrobacterium tumefaciens*

- Placer sur glace une cuvette d'électroporation 0,1 cm (Bio-rad) contenant 50 µl de cellules électrocompétentes.
- Ajouter 1 ng de produit de ligation.
- Electroporer (Electroporateur Biorad ; 25 µF et 2,2 kV, 200 Ohms).
- Ajouter immédiatement 1 ml de milieu YM stérile (0,04 % d'extrait de levure ; 1% de mannitol ; 1,7 mM de NaCl ; 0,8 mM de MgSO₄.6H₂O ; 2,2 mM de K₂HPO₄.3H₂O).
- Transférer les bactéries dans un tube de culture (Greiner) de 15 ml et incuber à 28°C pendant 2 à 3 heures sous forte agitation (200 rpm).
- Etaler 150 µl de bactéries sur un milieu LB solide sélectif.
- Incuber à 30°C 2 à 3 jours.

C. Les cultures d'*Arabidopsis thaliana*

C.1. Stérilisation des graines

- Mélanger 5 ml d'eau de javel dans 45 ml d'éthanol 95 %.
- Mettre 1 ml de la solution javel-éthanol dans un tube eppendorf contenant 20 mg de graines. Agiter par inversion et laisser agir 5 à 10 minutes.
- Eliminer le surnageant et rincer 2 fois à l'éthanol 95 %.
- Laisser sécher les graines pendant une nuit, tube ouvert, sous hotte à flux laminaire.

C.2. Milieux de germination

- Solubiliser 4,4 g de sels de Muraschige et Sckoog (SIGMA) et 30 g de sucrose dans 900 ml d'eau désionisée.
- Ajuster la solution à pH 5,8 avec du NaOH.
- Ajouter 0,8 % de Plant agar (Duchefa Biochemie) et porter le volume à 1 litre avec de d'eau désionisée.
- Autoclaver.
- Ajouter 50 µg/ml de kanamycine si un milieu sélectif est souhaité.
- Couler la gelose et, une fois cette dernière solidifiée, y déposer de façon individuelle les graines stérilisées d'*A.thaliana*.
- Incuber à 21 °C en présence de lumière.

C.3. Transformation d'*Arabidopsis thaliana*

C.3.1. Obtention de plantules

- Semer des graines stockées à 4°C en terreau.
- Incuber en chambre de culture à 22-24°C en conditions humides. Attendre que les plantules soient en fleur avant des les transformer.

C.3.2. Transformation florale via *Agrobacterium tumefaciens*

- Inoculer une culture d'*Agrobacterium tumefaciens* dans 15 ml de milieu LB liquide contenant 50 µg/ml de Kanamycine et de Streptomycine. Incuber 1 à 2 jours à 28°C sous forte agitation (200 rpm).
- Centrifuger les cultures (5 minutes à 4500 rpm, centrifugeuse Beckman Coulter Allegra X-22R).
- Resuspendre le culot dans une solution de sucrose 5% jusqu'à l'obtention d'une DO₆₀₀ de 0,8. Ajouter 0,05 % de Silwet L-77 (LEHLE Seeds).
- Immerger les fleurs d'*Arabidopsis thaliana* 2 à 3 secondes dans la préparation d'*Agrobacterium tumefaciens*.
- Maintenir les plantules utilisées en condition de forte humidité pendant un minimum de 24 heures.
- Répéter l'opération de transformation 2 à 3 fois dans un intervalle de 7 jours après la première transformation.
- Récupérer les graines présentes dans les siliques lorsque celles-ci commencent à s'ouvrir.
- Sélectionner les graines sur milieu de germination contenant 50 µg/ml de Kanamycine.

D. Méthodes relatives aux acides nucléiques

D.1. Minipreparation d'ADN plasmidique

(Roche High Pure Plasmid Isolation Kit)

- Inoculer une culture de bactéries dans 15 ml de milieu LB liquide sélectif. Incuber à température adéquate (température optimale de croissance de la bactérie) et sous forte agitation (200 rpm) pendant une nuit.
- Prélever 1,5 ml de milieu de culture bactérienne et réaliser une centrifugation à 13000 rpm (Centrifugeuse Heraeus Fresco 17) pendant 1 minute. Eliminer le surnageant et répéter 2 fois cette opération.
- Placer le « binding buffer » sur glace.
- Resuspendre délicatement le culot bactérien dans 250 µl de « Suspension Buffer + RNases » stocké à 4°C.
- Ajouter 250 µl de « Lysis Buffer », mélanger délicatement par inversion et incuber 5 minutes à température ambiante.
- Ajouter 350 µl de « Binding Buffer » froid, mélanger délicatement par inversion et incuber 5 minutes sur glace.
- Centrifuger l'échantillon à 13000 rpm pendant 10 minutes (Centrifugeuse Heraeus Fresco 17). Récupérer le surnageant et transférer le dans le réservoir de la colonne « High Pure ».
- Centrifuger la colonne à 13000 rpm (Centrifugeuse Heraeus Fresco 17) pendant 1 minute et éliminer le liquide filtré.
- Laver la colonne avec 500 µl de « Washing Buffer 1 » et centrifuger 1 minute à 13000 rpm (Centrifugeuse Heraeus Fresco 17). Eliminer le liquide filtré.
- Réaliser un second lavage de la colonne avec 700 µl de « Washing Buffer 2 » et centrifuger 1 minute à 13000 rpm (Centrifugeuse Heraeus Fresco 17). Eliminer le liquide filtré.
- Recentrifuger la colonne durant 2 minutes à 13000 rpm (Centrifugeuse Heraeus Fresco 17) afin d'éliminer la totalité du tampon de lavage.
- Transférer la colonne dans un nouveau tube eppendorf et ajouter 90 µl de « Elution Buffer » sur le filtre de la colonne.
- Centrifuger 1 minute à 13000 rpm (Centrifugeuse Heraeus Fresco 17) afin de récolter l'ADN plasmidique purifié et concentré sur la colonne.
- Stocker à – 20°C jusqu'à utilisation.

D.2. Maxipreparation d'ADN plasmidique

(QIAGEN MAXI KIT 10)

- Inoculer une pré-culture dans 15 ml de milieu LB liquide sélectif. Incuber une nuit à température adéquate (température optimale de croissance de la bactérie) et sous forte agitation (200rpm) pendant une nuit.
- Prélever 1,5 ml de la pré-culture et ensemer dans 500 ml de milieu LB liquide. Incuber entre 12 à 16 heures à bonne température (température de croissance de la bactérie) sous forte agitation (200 rpm).
- Centrifuger (Centrifugeuse Beckman Coulter JS-14) les bactéries à 6000g pendant 15 minutes à 4°C.

- Eliminer le surnageant et resuspendre le culot bactérien dans 10 ml de tampon P1.
- Ajouter 10 ml de tampon P2, mélanger délicatement par inversion et incubé 5 minutes à température ambiante.
- Ajouter 10 ml de tampon P3 refroidi, mélanger délicatement par inversion et incubé 20 minutes sur glace.
- Transvaser la solution dans un tube corex et centrifuger (Centrifugeuse Beckman Coulter JS-13,1) 45 minutes à 10000 rpm. Transférer le surnageant contenant l'ADN plasmidique dans un nouveau tube.
- Recentrifuger (Centrifugeuse Beckman Coulter JS-13,1) le surnageant 30 minutes à 10000 rpm à 4°C.
- Sur une colonne QIAGEN-tip 500, faire passer 10 ml de tampon QBT.
- Récupérer le surnageant de la centrifugation et le faire passer dans la résine.
- Laver la résine avec deux fois 30 ml de tampon QC.
- Eluer l'ADN plasmidique retenu dans la résine avec 15 ml de tampon QF.
- Précipiter l'ADN de l'éluat en y ajoutant 0,7 volume d'isopropanol.
- Centrifuger (Centrifugeuse Beckman Coulter JS-13,1) 30 minutes à 15000 g à 4°C. Enlever prudemment le surnageant.
- Laver le culot d'ADN avec 5 ml d'éthanol 70 % et centrifuger (Centrifugeuse Beckman Coulter JS-13,1) 10 minutes à 15000 g à 4°C.
- Eliminer délicatement le surnageant sans décrocher le culot. Laisser sécher le culot à l'air libre pendant 10 à 20 minutes.
- Redissoudre le culot d'ADN dans du tampon Tris HCl 10 mM à pH 8,5.
- Stocker à -20°C jusqu'à utilisation.

D.3. Electrophorèse sur gel d'agarose

- Préparer 50 ml d'agarose (Eurogentec) 1 % en tampon TAE 1× (4 mM de Tris-acétate ; 1 mM de EDTA, pH 8,0).
- Mélanger, chauffer et y ajouter 3 µl de Bromure d'éthidium (10 mg/ml, sigma) sous hotte chimique.
- Couler le gel et placer les peignes pour former les puits. Laisser durcir durant 45 minutes.
- Immerger le gel dans la cuve à électrophorèse (Pharmacia LKB GBS 200/400) contenant du tampon TAE 1×.
- Déposer dans les puits les échantillons auxquels un volume de solution de chargement a été ajouté (Tampon de charge ; promega). Dans un autre puit, ajouter 5 µl de standard de taille (Eurogentec ; 145 ng/µl).
- Faire migrer les échantillons pendant environ 1heure sous 90 mA à 150 V.
- Visualiser les bandes d'ADN sur un transilluminateur (302 nm-UV).

D.4. Purification d'ADN sur colonne « Nucleospin » (Machery-Nagel)

- Découper au scalpel la bande d'ADN présente dans le gel d'agarose.
- Déterminer la masse de la bande découpée. Ajouter 200 µl de « Buffer NT » par 100 mg de gel d'agarose.

- Incuber l'échantillon 5 à 10 minutes à 50°C afin de dissoudre le gel d'agarose. Mélanger par inversion toutes les 2 minutes.
- Charger l'échantillon dissout sur la colonne « Nucleospin Extract II » et centrifuger (Centrifugeuse Heraeus Fresco 17) 1 minute à 11000g. Eliminer le liquide récolté dans le tube collecteur.
- Laver avec 600 µl de « Buffer NT3 » et centrifuger (Centrifugeuse Heraeus Fresco 17) 1 minute à 11000g. Eliminer le surnageant récolté dans le tube collecteur.
- Recentrifuger (Centrifugeuse Heraeus Fresco 17) la colonne contenant l'ADN purifié 2 minutes à 11000g.
- Placer la colonne dans un nouveau tube eppendorf de 1,5 ml et éluer l'ADN retenu sur la colonne avec 20 µl de « Elution Buffer NE ». Incuber 1 minute à température ambiante et centrifuger (Centrifugeuse Heraeus Fresco 17) 1 minute à 11000g.
- Jeter la colonne et récupérer le tube eppendorf contenant l'ADN purifié.
- Stocker à -20°C jusqu'à utilisation.

D.5. Purification d'ADN sur colonne « Microcon » (Millipore)

- Introduire la colonne « Microcon » dans un tube collecteur.
- Déposer sur la colonne « Microcon » 400 µl d'H₂O désionisée et 50 µl d'échantillon à purifier.
- Centrifuger (Centrifugeuse Heraeus Fresco 17) à 7000 rpm pendant 15 minutes.
- Ajouter 20 µl d'H₂O désionisée sur la colonne et incuber à température ambiante durant 5 minutes.
- Retourner la colonne et placer la dans un nouveau tube eppendorf.
- Centrifuger à 4000 rpm (Centrifugeuse Heraeus Fresco 17) pendant 10 minutes. Jeter la colonne et récupérer le tube eppendorf contenant l'échantillon purifié.
- Stocker à -20°C jusqu'à utilisation.

D.6. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

- Mixer dans un tube à PCR les éléments suivants (50 µl) :

Tampon PCR 5× (Biolabs)	10µl
dNTP (10 mM) (Fermentas)	1 µl
Amorce gauche (10 pmoles)	1 µl
Amorce droite (10 pmoles)	1 µl
Taq polymerase (Biolabs)	0,5 µl
ADN ou colonie bactérienne	1 µl
H₂O	35,50 ul

- Amorces utilisées :

Nom des amorces	Séquences nucléotidiques (5' → 3')	T _m (°C)
Van Wak1g	TCTAGAATGAAGGTGCAGGAGGGTTTG	55
Van Wak1d	CCCGGGTTGTTCTCGGAGCTTGGTGTC	55
Van Bri1g	CCCGGGATAATGATAGTCTGATTGGT	55
Van Bri1d	GCGGCCGCGAGCTCTCATAATTTTCCTTCAGGAAC	55
Wakint1	GTAATGGTAGAGGTTGCTGC	66
Ab Wakint1	CGGGGAAGTGGTCGACGCAT	54,4
MUT CORR1g	CTTCTGAATCTGCGAAATGTCATGAGGTTCCCTGTG	63,9
MUT CORR1d	CACAGGGAACCTCATGACATTTTCGAGATTTCAGAAG	63,9
MUT CORR2g	GATGGCATGAAGAAAGCAACAAATGGTCCCCGGG	65,5
MUT CORR2d	CCCGGGACCATTGTTGCTTCTTCATGCCATC	65,5
MUT CORR3g	GCGGTTGCGTGTGTTGGATGATCGGGCTTGG	60
MUT CORR3d	CCAAGCCCGATCATCCAAACACGCAACCGC	60
SmaI (WAKJUXTA)408	CCCGGGACCATTGTTGCTTCTTCATGCCATC	65,5
(LL)349-350(QH)g	CGGCTTCTTGGTCATTTCAGCATGGCGTTGCCTG	78,6
(LL)349-350(QH)d	CAGGCAACGCCATGCTGAATGACCAAGAAGCCG	78,6
(P)389(A)g	CTCTCAGGAGCAGGGGCGTCAAATGTTGATGTC	80,4
(P)389(A)d	GACATCAACATTTGACGCCCTGCTCCTGAGAG	80,4
(FF)371-372(AA)g	CCGAGAACAAGCCGCCGAGCAAAATGGTGGCGGC	82,3
(FF)371-372(AA)d	GCCGCCACCATTTTGCTCGGCGGCTTGTCTCGG	82,3
(WAKTRANS)371-380g	CCAAGCTCCGAGAACAACACAACGACTCTCAGG	80,9
(WAKTRANS)371-380d	CCTGAGAGTCGTTGTGTTTGTCTCGGAGCTTGG	80,9
Reverse	CAGGAAACAGCTATGAC	68
Forward	CTGGCCGTCGTTTTAC	68

- Programmer l'appareil de la manière suivante (Programme PCR de base) :

Etape	Température	Durée du cycle	Nombre de cycles
Dénaturation	95°C	4 minutes	1
Dénaturation	95°C	1 minute	40
Hybridation	Suivant le T _m de l'amorce utilisée	1 minute	40
Elongation	72°C	2 minutes	40
Elongation finale	72°C	10 minutes	1

D.7. Mutagenèse dirigée (figure 3) :

(QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene))

- Design des amorces.
- Formule à utiliser : $T_m = 81,5 + 0,41(\%GC) - 675/N - \% \text{ mismatch}$.
N= longueur de l'amorce en paire de bases.

Considérations requises : - Amorces comprises entre 25 et 45 nucléotides.

- $T_m \geq 78^\circ\text{C}$.
- $\%GC \geq 40\%$.

- Mixer dans un tube PCR les éléments suivants (50 µl) :

Tampon PCR 10× (Stratagene)	5µl
dNTP mix (10mM Stratagene)	1 µl
Amorce mutagenese 1 (125 ng)	X µl
Amorce mutagenese 2 (125 ng)	Y µl
<i>PfuTurbo</i> DNA polymerase (Stratagene)	0,5 µl
QuikSolution (Stratagene)	3 µl
ADN double brins (10 ng)	Z µl
dd H₂O	W µl

- Programmer l'appareil de la manière suivante (Programme PCR de base) :

Etape	Température	Durée du cycle	Nombre de cycles
Dénaturation	95°C	1 minute	1
Dénaturation	95°C	50 secondes	18
Hybridation	60°C	50 secondes	18
Elongation	68°C	1 min/kb de plasmide	18
Elongation finale	72°C	10 minutes	1

- Ajouter 1 µl d'enzyme de restriction Dpn I (10 U/µl) par tube PCR (digestion des brins parentaux méthylés) et incubé à 37°C pendant 1 heure.
- Mélanger dans un tube de culture 45 µl de cellules ultracompétentes XL-10-Gold avec 2 µl de β-Mercaptoethanol. Agiter délicatement et placer les cellules sur glace durant 10 minutes.
- Transférer 2 µl du produit PCR traité avec l'enzyme de restriction Dpn I et incubé 30 minutes sur glace.
- Procéder au choc thermique en incubant les cellules 30 secondes dans un bain à 42°C puis placer les cellules sur glace pendant 2 minutes.
- Ajouter 500 µl de milieu NZY⁺ broth stérile préalablement chauffé à 42°C.
- Placer le tube sous forte agitation (225 rpm) à 37°C pendant 1 heure.
- Etaler 250 µl de cellules ultracompétentes sur un milieu LB solide sélectif durant la nuit.

D.8. Réaction de ligation

- Préparer le mélange réactionnel suivant (volume totale 10 µl):

Produit PCR (16,5ng)	X µl
Plasmide pCRII (50ng)	Y µl
Tampon de ligation 10 ×	1 µl
T4 DNA ligase (3U/µl)	1 µl
H₂O désionisée stérile	Z µl

Rem : - X et Y dépendent de la taille et de la quantité du matériel nucléotidique.

Ceux-ci peuvent être quantifiés via une électrophorèse sur gel d'agarose et via la formule suivante : $(Y \text{ pb produit PCR}) \times Z \text{ ng plasmide} / (\text{Taille en pb du vecteur})$.

- Z est le nombre de μl d' H_2O désionisée stérile à ajouter pour obtenir un volume total de 10 μl .

- Incuber la réaction de ligation à 14°C pendant la nuit.

D.9. Extraction d'ARN totaux de plantules *A. thaliana*

- Préparer sous hotte 0,1 % de DEPC dans de l'eau désionisée, incuber à 37°C pendant une nuit puis autoclaver.
- Stériliser les ustensiles en les autoclavant, lavant avec du NaOH 1N/SDS 1%, rinçant avec l'eau DEPC et en les passant au four pasteur (200°C) pendant une nuit.
- Broyer les plantules d'*A.thaliana* dans l'azote liquide sous hotte chimique.
- Pour 450 mg de matériel broyé, ajouter 4,5 ml de Tripure (Roche #) et homogénéiser.
- Après décongélation, transférer le liquide dans 3 tubes eppendorf de 1,5 ml.
- Agiter sur roue pendant 15 minutes à température ambiante.
- Centrifuger (Centrifugeuse Heraeus Fresco 17) à 12000 rpm pendant 10 minutes à 4°C.
- Transférer le surnageant dans un nouveau tube eppendorf et laisser reposer à température ambiante durant 5 minutes.
- Ajouter 225 μl de chloroforme par 1,5 ml de Tripure, mélanger vigoureusement pendant 15 secondes et laisser reposer 3 minutes à température ambiante.
- Centrifuger (Centrifugeuse Heraeus Fresco 17) à 12000 rpm pendant 15 minutes à 4°C puis prélever la phase supérieure.
- Ajouter 563 μl d'isopropanol par 1,5 ml de Tripure, mélanger vigoureusement pendant 15 secondes et laisser reposer 10 minutes à température ambiante.
- Centrifuger (Centrifugeuse Heraeus Fresco 17) à 12000 rpm pendant 10 minutes à 4°C et éliminer le surnageant.
- Laver le culot avec 1 ml d'EtOH 75 %.
- Vortexer et centrifuger (Centrifugeuse Heraeus Fresco 17) à 7500 rpm pendant 5 minutes à 4°C.
- Éliminer le surnageant et laisser sécher le culot à l'air libre durant 10 minutes.
- Resuspendre le culot dans 40 μl d'eau DEPC.
- Incuber à 55-60°C pendant 10 minutes, placer sur glace puis pooler les surnageants.
- Réaliser une électrophorèse sur gel d'agarose 2% en y déposant 1 μl d'ARN extrait.
- Mesurer immédiatement après la fin de l'extraction, l'absorbance à 260 nm et 280 nm (Spectromètre Shimadzu UV-1601 PC) (1 $\mu\text{l}/\text{ml}$ d'eau DEPC) et calculer le rapport D.O.260/D.O.280 (rapport idéal > 1,7).

D.10. Rétro-transcription

(Roche Transcriptor First-Strand cDNA Synthesis Kit)

- Autoclaver des tubes PCR.
- Ajouter par tube PCR : - 1 µl d'oligo(dT)₁₈ (50 µM)
 - 5 µg d'ARN
 - X µl d'H₂O du kit pour un volume total de 13 µl
- Incuber à 65°C durant 10 minutes afin de dénaturer les structures secondaires des ARN.
- Ajouter par tube PCR : - 4 µl de « Transcriptor RT Reaction buffer 5 × »
 - 0,5 µl de protecteur d'inhibiteur d'ARN (40 U/µl)
 - 2 µl de dNTPs (10 mM)
 - 0,5 µl « Transcriptor Reverse Transcriptase » (20 U/µl)
- Incuber 1 heure à 50°C.
- Inactiver la reverse transcriptase en laissant incuber le tube PCR à 85°C pendant 5 minutes.
- Transférer le tube PCR contenant le cDNA sur glace.
- Stocker à -20°C jusqu'à utilisation.
- Réaliser une PCR avec les amorces spécifiques pour amplifier le cDNA.

D.11. Réaction de séquençage

- Préparer un mélange contenant 1 µl d'amorce (10 pmoles/µl) et 10 ng de produit PCR ou 400 ng de produit miniprep. Ajuster le volume à 12 µl avec de l'eau désionisée.
- Mettre le mélange à 95°C pendant 15 minutes puis 3 minutes sur glace.
- Rajouter 4 µl de CEQ DTCS quick start kit, 1 µl de CEQ Sequencing reaction buffer kit et 5 µl d'eau milliQ.
- Lancer la réaction de séquençage avec le programme suivant :

Température (°C)	Temps	Nombre de cycles
92	1 minute 30 secondes	1
96	20 secondes	40
50	20 secondes	40
60	4 minutes	40

- Ajouter 5 µl de Stop solution et 60 µl d'éthanol 96% froid.
- Centrifuger 15 minutes à 13000 g et éliminer le surnageant.
- Laver avec 200 µl d'éthanol 76 %, centrifuger 15 minutes à 13000 g et éliminer le surnageant.
- Répéter cette étape une seconde fois.
- Faire sécher l'ADN au speedvac pendant 15 minutes.
- Resuspendre l'échantillon dans 40 µl de SLS CEQ.
- Placer l'échantillon dans un puit et préparer une autre plaque contenant 8 gouttes de SEQ sequencing separation buffer.
- Lancer la méthode de séparation LFR-a (CEQ 8000 Genetic analysis system) avec les paramètres suivants : - T° des capillaires : 50°C.
 - T° de dénaturation : 90°C pendant 2 minutes.

- injection : voltage 2 kV pendant 15 secondes.
- Séparation voltage 4 kV pendant 110 minutes.

- Analyser les séquences.

III. Résultats

A. Approche théorique

Dans le cadre de ce mémoire, nous avons opté pour une approche similaire à celle utilisée par He et son équipe. Nous avons utilisé 2 récepteurs hybrides différents nommés WAK1-BRI1 et WAKJUX1-BRI1 (**figure 1**).

Le récepteur WAK1-BRI1 est composé des domaines extracellulaire et transmembranaire du récepteur WAK1, fusionné avec le domaine intracellulaire kinase du récepteur BRI1. Ce récepteur était déjà présent au laboratoire mais ne comportait pas de domaine juxtamembranaire, ce qui pourrait poser problème dans la signalisation cellulaire sous jacente à l'activation du récepteur. Un second récepteur hybride, en l'occurrence WAKJUX1-BRI1, a donc été conçu.

Le récepteur WAKJUX1-BRI1 est composé des domaines extracellulaire, transmembranaire et juxtamembranaire du récepteur WAK1, fusionné avec le domaine intracellulaire kinase du récepteur BRI1.

Le domaine intracellulaire kinase de BRI1 a été choisi car les gènes qu'il régule sont maintenant connus : *CycD3*, *TCH4* et *BRH1* (**Hu et al, 2000 ; Molnar et al, 2002**). Ainsi, si l'interaction entre des fragments pectiques et le domaine extracellulaire de WAK1 active le récepteur hybride, l'expression des gènes *CycD3*, *TCH4* et *BRH1* sera modulée et quantifiable par la technique RT-PCR semi-quantitative (**figure 2**).

Tout comme dans le travail portant sur l'étude du récepteur BRI1-Xa21 réalisé par He et son équipe (**He et al, 2000**), la conception de versions mutantes des récepteurs hybrides a été réalisée. Celles-ci serviront de contrôle négatif et ne devront pas initier de voie de transduction du signal relative à l'activation du domaine extracellulaire WAK1 par des fragments pectiques.

A.1. Détermination des acides aminés à muter

A.1.1. Versions mutées au niveau du domaine extracellulaire de WAK1

Le récepteur hybride WAK1-BRI1 a été utilisé pour concevoir des versions mutées au niveau du domaine extracellulaire de WAK1. Ces versions mutées devront rendre impossible la liaison entre le domaine extracellulaire du récepteur hybride et les fragments pectiques. Le choix des acides aminés à muter a été influencé par les travaux de Decreux et Messiaen (**Decreux et Messiaen, 2005 et 2006**).

Lors de ces travaux, Decreux et Messiaen ont isolé et cloné la partie du domaine extracellulaire de WAK1 codant pour les résidus aminés 67 à 254, domaine qu'ils dénommèrent WAK₆₇₋₂₅₄.

Via l'utilisation de test ELISA compétitif et non-compétitif, ils montrèrent que ce domaine WAK₆₇₋₂₅₄ interagissait avec des fragments pectiques en conformation « egg-box » tels que les polygalacturonides (PGAs) et les oligogalacturonides (OGAs).

Dès lors, ils cherchèrent des acides aminés présents dans ce domaine WAK₆₇₋₂₅₄ qui pourraient potentiellement interagir avec les PGAs en conformation « egg-box ». Pour cela, ils utilisèrent une méthode de prédiction basée sur l'analyse d'alignement de clusters hydrophobes et de structures secondaires du domaine WAK₆₇₋₂₅₄. Cette prédiction *in silico* suggéra que les résidus R166 et K101-102 pourraient intervenir dans la liaison avec les PGAs en conformation « egg-box ».

Pour vérifier cela, WAK₆₇₋₂₅₄ fut muté soit au niveau du résidu R166, soit au niveau des résidus K101-102T ou soit au niveau des 2 en même temps par mutagenèse dirigée. Le résidu arginine (R166) fut muté en glutamine (R166Q) et les résidus lysines (K101-102) en thréonines (K101-102T).

Des tests d'ELISA compétitifs et non-compétitifs furent réalisés et révélèrent une absence de liaison des PGAs chez ces mutants. Cette expérience confirme donc l'importance des résidus R166 et K101-102 dans la liaison du domaine extracellulaire de WAK1 avec les fragments pectiques.

Ces mêmes mutations, en l'occurrence R166Q et K101-102T, ont été utilisées pour générer nos constructions hybrides mutées au niveau du domaine extracellulaire de WAK1 (**figure3**).

A.1.2. Versions mutées au niveau des domaines transmembranaire et juxtamembranaire de WAK1

Dans un premier temps, il a fallu rechercher des acides aminés transmembranaires et juxtamembranaires potentiellement importants dans la signalisation cellulaire sous-jacente à l'activation de WAK1.

Pour cela, un alignement des séquences aminés des domaines transmembranaire et juxtamembranaire des 5 isoformes existantes de WAKs (WAK1-5) a été réalisé (**figure 4**).

L'alignement a permis de mettre en évidence des acides aminés conservés entre les 5 isoformes. Ces acides aminés pourraient jouer un rôle important dans la structure ou la fonction des domaines transmembranaire et juxtamembranaire et se présentent donc comme de bons candidats à muter.

L'utilisation du programme « Predict Protein » a également permis de mettre en évidence la présence d'une hélice alpha à la jonction entre le domaine transmembranaire et juxtamembranaire de WAK1. Les acides aminés composant cette hélice alpha pourront également faire l'objet de mutations.

Quatre récepteurs hybrides mutés soit au niveau du domaine transmembranaire, soit au niveau du domaine juxtamembranaire ont donc été construits (**figure 5**).

La première construction, nommée (LL)349-350(QH), est mutée au niveau de l'hélice alpha du récepteur. Elle consiste en la substitution de 2 résidus leucines hydrophobes (LL) par 2 résidus neutres, une glutamine et une histidine (QH). Ces résidus leucines ont été

sélectionnés car ils sont connus pour exercer une influence sur la stabilité de la structure hélicoïdale de l'hélice alpha (**Branden et Tooze, 1996**).

La seconde construction, nommée (FF)371-372(AA), est mutée au niveau du domaine juxtamembranaire du récepteur. Elle consiste en la substitution de 2 résidus aromatiques par 2 résidus hydrophobes alanines (AA). Ces résidus phénylalanines ont été sélectionnés car ils sont souvent impliqués dans les processus de dimérisation entre les récepteurs (**Stoke, 2008**) en adoptant des structures en formes de « zipper » (**Dhe-Paganon et al, 2004 ; Stoke, 2008**).

La troisième construction, nommée (P)389(A), est mutée au niveau du domaine juxtamembranaire du récepteur. Elle consiste à remplacer un résidu proline (P) par un résidu alanine (A). Les résidus prolines sont connus pour induire une structure en forme de coude dans la structure tridimensionnelle des protéines (**Branden et Tooze, 1996**). Dès lors, si nous substituons cet acide aminé par un autre, il y a de forte chance que la structure 3D du récepteur soit altérée.

Enfin la dernière construction, nommée (WAKTRANS)371-380 a pour but de délèter un cluster transmembranaire conservé de 10 acides aminés (FFEQNGGML) présent chez les 5 isoformes de WAKs.

Les différentes mutations réalisées sont reprises sur la figure A en annexe.

B. Approche expérimentale

Dans un premier temps, il a fallu construire et cloner le récepteur hybride WAKJUX1-BRI1 dans le plasmide pCRII. Le récepteur WAK1-BRI1 était, quant à lui, déjà disponible au laboratoire.

Dans un deuxième temps, des versions mutées du récepteur WAK1-BRI1 et WAKJUX1-BRI1 ont été construites sur base des mutations choisies au point 3.1.

Dans un troisième temps, les séquences codant pour les récepteurs mutés ou non ont été transférées dans le plasmide pBI121. La bactérie *Agrobacterium tumefaciens* a ensuite été transformée avec le plasmide pBI121.

Dans un quatrième temps, des plantules d'*Arabidopsis thaliana* ont été transformées par l'intermédiaire des *A. tumefaciens* transformés.

Finalement, les graines de ces plantules ont été récoltées et sélectionnées sur un milieu de germination sélectif, ne permettant la pousse que des graines transformées.

Le schéma expérimental suivi est résumé sur la figure 6.

B.1. Construction du récepteur WAKJUX1-BRI1 en pCRII

B.1.1. Clonage de la séquence *WAKJUX1* en pCRII

B.1.1.1. Définition des amorces PCR et amplification du gène *WAK1*

Dans un premier temps, et ce grâce à la banque de données de « NCBI », la séquence nucléotidique de *WAK1* a pu être déterminée (AT1G21250). Une analyse « in silico » a ensuite permis d'identifier et de délimiter les différents domaines présents dans cette séquence (**figure B en annexe**).

Des amorces PCR permettant d'isoler et d'amplifier le gène *WAK1* ont été conçues sur base de cette séquence nucléotidique. L'amorce Van Wak1g contient au niveau de son extrémité 5' (en bleu) une séquence codant pour le site de restriction XbaI (T↓CTAGA) qui servira pour le transfert de la construction hybride WAKJUX1-BRI1 dans le plasmide pBI121.

Van Wak1g : 5' **TCTAGA**ATGAAGGTGCAGGAGGGTTTG 3'
Van Wak1d : 5' CCCGGGTTGTTCTCGGAGCTTGGTGTC 3'

Dans un second temps, une extraction des ARN totaux présents dans les feuilles de plantules d'*Arabidopsis thaliana* a été réalisée. Ces ARN totaux ont été rétro-transcrits en ADNc grâce à une amorce oligo(dT)₁₈.

Une PCR utilisant les amorces Van Wak1g et Van Wak1d a ensuite été réalisée pour isoler et amplifier le gène *WAK1*. Ce produit d'amplification (2211 pb) a finalement été déposé sur gel agarose 1% (**figure 7**).

Le fragment amplifié du gène *WAK1* a ensuite été récupéré et purifié du gel. L'utilisation d'une T4 DNA ligase a permis la ligation du fragment *WAK1* dans le plasmide pCRII en utilisant un rapport vecteur/insert de 1/3.

Des bactéries *E.coli DH 5α* électrocompétentes ont été transformées par électroporation avec le produit de ligation *WAK1*-pCRII, étalées sur un milieu LB contenant 60 µg/ml d'ampicilline et incubées pendant 1 nuit à 37°C.

Afin de discriminer les clones possédant un plasmide pCRII vide (sans l'insert *WAK1*) de ceux possédant le plasmide *WAK1*-pCRII, une PCR diagnostic utilisant les amorces Forward et Reverse a été réalisée. Ces amorces sont conçues pour s'hybrider en amont et en aval du site d'insertion de *WAK1* dans pCRII (**voir figure 1 dans matériel et méthode**). Ainsi, seuls les clones possédant une bande d'amplification de 2401 pb possèdent le plasmide *WAK1*-pCRII (**figure 8**).

Sur 21 colonies testées, 6 clones étaient positifs. Une miniprep a finalement été réalisée afin d'isoler le plasmide *WAK1*-pCRII (**figure 9**). Ce plasmide *WAK1*-pCRII servira de matrice de départ au clonage de la séquence *WAKJUX1*.

B.1.1.2. Obtention de la séquence *WAKJUX1* à partir de *WAK1*-pCRII

Pour cloner uniquement la séquence *WAKJUX1* dans le plasmide pCRII, la conception d'une nouvelle amorce s'hybridant au niveau du domaine juxtamembranaire du gène *WAK1* a été nécessaire (**figure 10**). Cette amorce nommée SmaI (*WAKJUXTA*)408 contient au niveau de son extrémité 5' (en bleu) un site de restriction SmaI (CCC↓GGG) qui permettra plus tard la fusion avec le domaine intracellulaire de BRI1.

SmaI (*WAKJUXTA*)408 : 5' **CCCGGG**ACCATTGTGCTTTCTTCATGCCATC 3'

Grâce à l'utilisation du produit miniprep de *WAK1*-pCRII réalisé à l'étape précédente (**figure 9**) et aux amorces Van *WAK1*g et SmaI (*WAKJUXTA*)408, le fragment *WAKJUX1* (1230 pb) a été amplifié et déposé sur gel agarose 1% (**figure 11**).

Ce fragment *WAKJUX1* a ensuite été excisé et purifié du gel. L'utilisation d'une T4 DNA ligase a permis la ligation du fragment *WAKJUX1* dans le plasmide pCRII en utilisant un rapport vecteur/insert de 1/3.

Des bactéries *E.coli DH 5α* électrocompétentes ont ensuite été transformées par électroporation avec le produit de ligation *WAKJUX1*-pCRII, étalées sur un milieu LB contenant 60 µg/ml d'ampicilline et incubées pendant 1 nuit à 37°C.

Une PCR diagnostic utilisant les amorces Forward et Reverse a été réalisée sur les clones positifs afin de sélectionner ceux possédant le plasmide *WAKJUX1*-pCRII (1420 pb) (**figure 12**).

Sur 13 colonies testées, 7 clones étaient positifs. Une miniprep a finalement été réalisée afin d'isoler le plasmide *WAKJUX1*-pCRII.

Le clonage de la séquence *WAKJUX1* dans le plasmide pCRII constitue la première étape dans la conception du récepteur hybride *WAKJUX1*-*BRI1* (**figure 6 : point 2**). Elle devra être fusionnée à la séquence intracellulaire kinase de *BRI1*.

B.1.2. Clonage de la séquence intracellulaire kinase de *BRI1*

B.1.2.1. Définition des amorces PCR

Les amorces PCR permettant l'amplification de la séquence intracellulaire kinase de *BRI1* ont été conçues à partir de la séquence nucléotidique de *BRI1* présente dans les banques de données de « NCBI » (AT4G39400) (**figure C en annexe**). Ces 2 amorces ont été nommées Van Bri1g et Van Bri1d.

Van Bri1g : 5' **CCCGGG**ATAATGATAGTCTGATTGGT 3'

Van Bri1d : 5' GCGGCCG**CGAGCTC**ATAATTTTCCTTCAGGAAC 3'

L'amorce Van Bri1g contient, au même titre que l'amorce SmaI (*WAKJUX1*)₄₀₈, un site de restriction SmaI (CCC↓GGG) (en bleu) qui permettra la fusion avec la séquence *WAKJUX1* par restriction enzymatique (**figure 13**). L'amorce Van Bri1d possède un site de restriction SstI (GAGCT↓C) (en bleu) qui a été ajouté pour permettre l'insertion du récepteur hybride *WAKJUX1*-*BRI1* dans le plasmide pBI121.

Grâce aux sites de restriction XbaI (à l'extrémité gauche de la séquence *WAKJUX1*) et SstI (à l'extrémité droite de la séquence de *BRI1*), il sera aisé d'insérer le récepteur hybride *WAKJUX1*-*BRI1* dans le plasmide pBI121 par restriction enzymatique.

B.1.2.2. Clonage de la séquence intracellulaire kinase *Bri1* dans le plasmide pCRII

Grâce au produit miniprep *WAK1*-*BRI1*-pCRII déjà présent au laboratoire (cfr point 3.3 et figure 6) et aux amorces Van Bri1g et Van Bri1d, la séquence intracellulaire kinase de *BRI1* (950 pb) a été amplifiée et déposée sur gel agarose 1% (**figure 14**).

Ce fragment *BRI1* a ensuite excisé, purifié et ligué dans le plasmide pCRII en utilisant un rapport vecteur/insert de 1/3.

Des bactéries *E.coli DH 5α* électrocompétentes ont ensuite été transformées par électroporation avec le produit de ligation *BRI1*-pCRII, étalées sur un milieu LB contenant 60 µg/ml d'ampicilline et incubées pendant 1 nuit à 37°C.

Une PCR diagnostic utilisant les amorces Forward et Reverse a été réalisée sur les clones positifs et a permis de sélectionner ceux possédant le plasmide *BRI1*-pCRII (1144 pb) (**figure 15**).

Sur 13 colonies testées, 9 clones possédaient la construction *BRI1*-pCRII. Une miniprep a finalement été réalisée afin d'isoler le plasmide *BRI1*-pCRII.

Le clonage de la séquence intracellulaire kinase de *BRII* dans le plasmide pCRII constitue la seconde étape dans la conception du récepteur hybride WAKJUX1-BRII (**figure 6 : point 3**).

A ce stade du travail, nous avons cloné le domaine WAKJUX1 et BRII dans le plasmide pCRII. La prochaine étape sera de les fusionner ensemble.

B.1.3. Fusion des séquences *WAKJUX1* et *BRII*

Maintenant que les séquences codant pour les domaines WAKJUX1 et BRII ont été clonées dans le plasmide pCRII, nous pouvons finaliser la construction du récepteur WAKJUX1-BRII en ligant les 2 domaines ensemble.

Grâce aux sites de restriction SmaI et SstI précédemment ajoutés aux extrémités des séquences *WAKJUX1* et *BRII*, nous pouvons restreindre les plasmides *WAKJUX1*-pCRII et *BRII*-pCRII en utilisant les enzymes de restriction SmaI et SstI (**figure 16**).

La restriction enzymatique avec SmaI et SstI a permis de cliver le plasmide *WAKJUX1*-pCRII en 2 fragments, d'une taille respective de 5085 pb et de 42 pb (**figure 17**). Seul le fragment de 5085 pb était visible sur le gel agarose 1 %.

La restriction enzymatique avec SmaI et SstI a permis de cliver le plasmide *BRII*-pCRII en 3 fragments, présentant des tailles respectives de 3858 pb, 950 pb et 42 pb (**figure 18**). Seuls les fragments de 3858 et 950 pb étaient visibles sur le gel agarose 1 %.

Parmi les produits de restriction obtenus, seuls deux nous intéressent. Le premier est le fragment de 5085 pb représentant le plasmide *WAKJUX1*-pCRII restreint (**figure 16 ; point A**) et le second est le fragment de 950 pb, correspondant au domaine intracellulaire kinase de BRII (**figure 16 ; point E**). Ces 2 fragments ont été excisés et purifiés du gel (**figure 19**) avant d'être ligués ensemble via l'utilisation d'une T4 DNA ligase.

Des bactéries *E. coli* Top 10⁺ thermocompétentes ont ensuite été transformées par choc thermique avec le produit de ligation *WAKJUX1-BRII*-pCRII, étalées sur un milieu LB contenant 60 µg/ml d'ampicilline et incubées une nuit à 37°C.

Une PCR diagnostic utilisant les amorces Van Wak1g et Van Bri1d a été réalisée afin d'identifier les clones possédant le plasmide *WAKJUX1-BRII*-pCRII (**figure 20**). Parmi les 20 colonies, 18 étaient positives. Une miniprep a finalement été réalisée afin d'isoler le plasmide *WAKJUX1-BRII*-pCRII (**figure 21**).

A ce stade du travail, nous possédons la séquence *WAKJUX1-BRII* codant pour le récepteur hybride en pCRII (**figure 6 : point 4**). Nous allons maintenant vérifier par séquençage si la séquence ne contient pas de mutations pour ensuite générer des versions mutées de ce récepteur par mutagenèse dirigée.

B.1.4. Séquençage et correction du récepteur hybride WAKJUX1-BRI1

B.1.4.1. Séquençage de *WAKJUX1-BRI1*

Une fois la construction du récepteur hybride WAKJUX1-BRI1 entièrement terminée, il a fallu vérifier l'absence de délétion et de mutations ponctuelles dans la séquence de *WAKJUX1-BRI1*. Une délétion peut provoquer un changement dans le cadre de lecture de la séquence tandis qu'une mutation peut conduire à la substitution d'un acide aminé par un autre. Dans les 2 cas, la protéine synthétisée peut présenter une structure 3D différente de la protéine native, ce qui peut modifier ou inhiber sa fonction d'origine.

Lors de la construction et du clonage du récepteur hybride WAKJUX1-BRI1 en pCRII, plusieurs amorces ont été synthétisées et peuvent maintenant servir à séquencer la séquence *WAKJUX1-BRI1* (**figure 22**).

Parmi ces amorces, celles décrites dans le tableau ci-dessous ont été sélectionnées.

Amorces	Séquences
Van wak1g	5'TCTAGAATGAAGGTGCAGGAGGGTTTG 3'
Van bri1g	5' CATAATGATAGTCTGATTGGTT 3'
Van bri1d	5' CTCGAGAGTATTAAGGAAGTCCTTG 3'
SmaI(WAKJUXTA)408	5' CCCGGGACCATTTGTTGCTTCTTCATGCCATC 3'
Wakint1	5' GTAATGGTAGAGGTTGCTGC 3'
Ab Wakint1	5'CGGGGAAGTGGTCGACGCAT 3'

Lors de ce séquençage, la présence de 3 mutations ponctuelles a été détectée.

B.1.4.2. Correction du récepteur WAKJUX1-BRI1

Le séquençage de *WAKJUX1-BRI1* a permis de mettre en évidence les 3 mutations ponctuelles suivantes (**figure D en annexe**) :

- La première mutation se situe dans le domaine extracellulaire du récepteur et se caractérise par le changement du codon CTG en CGG (leucine en arginine).
- La seconde mutation se situe dans le domaine juxtamembranaire du récepteur et se caractérise par le changement du codon ATG en CTG (méthionine en leucine).
- La dernière mutation se situe dans le domaine intracellulaire kinase du récepteur et se caractérise par le changement du codon GAT en GGT (glutamate en aspartate).

La correction du récepteur hybride WAKJUX1-BRI1 a été réalisée par mutagenèse dirigée (**voir matériel et méthodes : point E.7**).

Il est important de signaler qu'une seule mutation peut être corrigée à la fois. Nous sommes donc dans l'obligation de réaliser 3 mutagenèses dirigées successives pour entièrement corriger la séquence codant pour le récepteur hybride WAKJUX1-BRI1.

B.1.4.2.1. Définition des amorces PCR

Dans un premier temps, la conception de paires d'amorces nucléotidiques anti-complémentaires l'une à l'autre s'hybridant au niveau du site muté a été réalisée. Ces deux amorces, d'une longueur comprise entre 25 et 45 nucléotides, contiennent en leur centre les nucléotides permettant la correction de la séquence *WAKJUX1-BRII*. Les 3 paires d'amorces sont représentées ci-dessous:
(les nucléotides permettant la correction de la séquence apparaissent en vert):

MUT CORR1g: 5' CTTCTGAATCTGCGAAATGTCATGAGGTTCCCTGTG 3'
MUT CORR1d: 5' CACAGGGAACCTCATGACATTTCTGAGATTTCAGAAG 3'

→ Ces 2 amorces ont permis le remplacement du codon muté CGG en CTG, corrigeant ainsi la première mutation apparue dans le domaine extracellulaire du récepteur hybride *WAKJUX1-BRII*.

MUT CORR 2g: 5' GATGGCATGAAGAAAGCAACAAATGGTCCCGGG 3'
MUT CORR 2d: 5' CCCGGGACCATTGTGTGCTTTCTTCATGCCATC 3'

→ Ces 2 amorces ont permis le remplacement du codon muté CTG en ATG, corrigeant ainsi la seconde mutation apparue dans le domaine juxtamembranaire du récepteur hybride *WAKJUX1-BRII*.

MUT CORR 3g: 5' GCGGTTGCGTGTTTGATGATCGGGCTTGG 3'
MUT CORR 3d: 5' CCAAGCCCGATCATCCAAACACGCAACCGC 3'

→ Ces 2 amorces ont permis le remplacement du codon muté GGT en GAT, corrigeant ainsi la dernière mutation apparue dans le domaine intracellulaire kinase du récepteur hybride *WAKJUX1-BRII*.

B.1.4.2.2. Première correction du récepteur *WAKJUX1-BRII*

Afin de corriger la mutation apparue dans le domaine extracellulaire du récepteur *WAKJUX1-BRII*, une PCR utilisant les amorces *MUT CORR1g* et *MUT CORR1d* a été réalisée sur le produit miniprep *WAKJUX1-BRII*-pCRII précédemment isolé (**figure 21**).

L'amplification PCR a généré des plasmides *WAKJUX1-BRII*-pCRII néo-formés et corrigés qui diffèrent des plasmides *WAKJUX1-BRII*-pCRII parentaux non-corrigés par l'absence de méthylation. L'ajout de l'enzyme de restriction DpnI dans le produit d'amplification permet la digestion des plasmides parentaux non-corrigés en reconnaissant les sites méthylés 5'-GM⁶ATC-3'. Ainsi après 1 heure d'incubation à 37°C, le produit d'amplification ne contient plus que des plasmides *WAKJUX1-BRII*-pCRII corrigés.

Des bactéries *XL-10-Gold* ultracompétentes ont ensuite été transformées par choc thermique avec le produit d'amplification *WAKJUX1-BRII*-pCRII corrigé, étalées sur un milieu LB contenant 60 µg/ml d'ampicilline et incubées une nuit à 37°C.

Une PCR diagnostic utilisant les amorces *Van Wak1g* et *Van bri1d* a été réalisée afin d'identifier les colonies possédant le plasmide *WAKJUX1-BRII*-pCRII (**figure 23**). Parmi les

13 colonies, 12 étaient positives. Une miniprep a été réalisée afin d'isoler le plasmide *WAKJUX1-BRII*-pCRII corrigé.

Une étape de séquençage sur le produit miniprep a finalement été réalisée afin de s'assurer que la séquence *WAKJUX1-BRII* ne présentait plus la mutation.

B.1.4.2.3. Deuxième correction du récepteur WAKJUX1-BRII

Afin de corriger la seconde mutation apparue dans le domaine juxtamembranaire du récepteur *WAKJUX1-BRII*, une PCR utilisant les amorces MUT CORR2g et MUT CORR2d a été réalisée sur le produit miniprep *WAKJUX1-BRII*-pCRII corrigé et récolté à l'étape précédente.

L'ajout de l'enzyme de restriction DpnI dans le produit d'amplification a permis la digestion des plasmides parentaux non-corrigés. Ainsi après une heure d'incubation à 37°C, le produit d'amplification ne contient plus que des plasmides *WAKJUX1-BRII*-pCRII corrigés.

Des bactéries *XL-10-Gold* ultracompétentes ont ensuite été transformées par choc thermique avec le produit d'amplification *WAKJUX1-BRII*- pCRII corrigé, étalées sur un milieu LB contenant 60 µg/ml d'ampicilline et incubées une nuit à 37°C.

Une PCR diagnostic utilisant les amorces Van Wak1g et Van bri1d a été réalisée afin d'identifier les colonies possédant le plasmide *WAKJUX1-BRII*-pCRII (**figure 24**). Parmi les 6 colonies vérifiées, 5 étaient positives. Une miniprep a été réalisée afin d'isoler le plasmide *WAKJUX1-BRII*-pCRII corrigé.

Une étape de séquençage sur le produit miniprep a finalement été réalisée afin de s'assurer que la séquence *WAKJUX1-BRII* ne présentait plus la mutation.

B.1.4.2.4. Troisième correction du récepteur WAKJUX1-BRII

Afin de corriger la dernière mutation, présente dans le domaine intracellulaire kinase du récepteur *WAKJUX1-BRII*, une PCR utilisant les amorces MUT CORR3g et MUT CORR3d a été réalisée sur le produit miniprep *WAKJUX1-BRII*-pCRII corrigé et récolté à l'étape précédente.

L'ajout de l'enzyme de restriction DpnI dans le produit d'amplification a permis la digestion des plasmides parentaux non-corrigés. Ainsi après 1 heure d'incubation à 37°C, le produit d'amplification ne contient plus que des plasmides *WAKJUX1-BRII*-pCRII corrigés.

Des bactéries *XL-10-Gold* ultracompétentes ont ensuite été transformées par choc thermiques avec le produit d'amplification *WAKJUX1-BRII*- pCRII corrigé, étalées sur un milieu LB contenant 60 µg/ml d'ampicilline et incubées une nuit à 37°C.

Une PCR diagnostic utilisant les amorces Van Wak1g et Van bri1d a été réalisée afin d'identifier les colonies possédant le plasmide *WAKJUX1-BRII*-pCRII (**figure 25**). Parmi les 3 colonies vérifiées, les 3 étaient positives. Une miniprep a été réalisée afin d'isoler le plasmide *WAKJUX1-BRII*-pCRII corrigé.

Une étape de séquençage sur le produit miniprep a finalement été réalisée afin de s'assurer que la séquence *WAKJUX1-BRII* ne présentait plus la mutation.

B.2. Conception de versions mutées en pCRII

Les constructions R166Q et K101-102T conçues à partir du récepteur hybride WAK1-BRII étaient déjà disponibles au laboratoire. Elles n'ont donc pas été construites dans le cadre de ce travail (voir **figure 6**).

Les constructions (LL)349-350(QH), (FF)371-372(AA), (P)389(A) et (WAKTRANS)371-380 ont été construites à partir du récepteur hybride WAKJUX1-BRII (**figure 6 : point 5**).

B.2.1. Définition des amorces PCR

Les différentes amorces utilisées pour la conception et la mutagenèse dirigée du récepteur WAKJUX1-BRII sont reprises sur la figure A en annexe.

La création d'une paire d'amorces nucléotidiques anti-complémentaires l'une à l'autre s'hybridant au niveau du site à muter et contenant la mutation désirée a été réalisée pour chacune des versions à muter. Les amorces utilisées pour les expériences de mutagenèse dirigée sont décrites ci-dessous (les mutations ponctuelles sont représentées en vert) :

(LL)349-350(QH)g : 5'CGGCTTCTTGGTCATT**CAGCAT**TGGCGTTGCCTG 3'

(LL)349-350(QH)d : 5'CAGGCAACGCC**ATGCTG**AATGACCAAGAAGCCG 3'

➔ Ces 2 amorces ont permis le remplacement des codons CTG et CTT en CAG et CAT permettant ainsi de créer la construction mutante (LL)349-350(QH), altérée au niveau de l'hélice alpha transmembranaire. Cette altération devrait empêcher l'ancrage de (LL)349)350(QH) en membrane plasmique.

(FF)371-372(AA)g : 5' CCGAGAACA**AGCCGCC**GAGCAAAATGGTGGCGGC 3'

(FF)371-372(AA)d : 5' GCCGCCACCATTTTGCTC**GGCGG**CTTGTCTCGG 3'

➔ Ces 2 amorces ont permis le remplacement des codons TCC en GCC permettant ainsi de créer la construction mutante (FF)371-372(AA). Cette construction est mutée au niveau de résidus phénylalanine pouvant intervenir dans un hypothétique processus de dimérisation.

(P)389(A)g : 5' CTCTCAGGAGCAGGG**GCGT**CAAATGTTGATGTC 3'

(P)389(A)d : 5' GACATCAACATTTGA**CGCC**CTGCTCCTGAGAG 3'

➔ Ces 2 amorces ont permis le remplacement du codon CCG en GCG permettant ainsi de créer la construction mutante (P)389(A). La substitution du résidu proline par un résidu hydrophobe devrait fortement altérée le récepteur étant donné que les résidus prolines sont connus pour induire des structures en forme de coude dans la structure 3D des protéines.

(WAKTRANS)371-380g : 5' CCAAGCTCCGAGAACAAACACAACGACTCTCAGG 3'
(WAKTRANS)371-380d : 5' CCTGAGAGTCGTTGTGTTTGTTCCTCGGAGCTTGG 3'

➔ Ces 2 amorces ont permis la délétion d'un cluster transmembranaire de 10 acides aminés (FFEQNGGML) conservés chez les 5 isoformes de WAKs. Cette version mutée ne devrait plus permettre l'ancrage du récepteur en membrane plasmique.

B.2.2. Conception des versions mutées

La conception des 4 versions mutées a été réalisée par amplification PCR à partir du produit miniprep *WAKJUX1-BRI1*-pCRII corrigé et récolté à l'étape précédente.

Tout comme pour l'étape de correction du récepteur *WAKJUX1-BRI1*, l'amplification PCR a généré des plasmides *WAKJUX1-BRI1*-pCRII mutés qui diffèrent des plasmides *WAKJUX1-BRI1*-pCRII parentaux non-mutés par l'absence de méthylation. L'ajout de l'enzyme de restriction DpnI, reconnaissant les brins méthylés dans le produit d'amplification a permis la digestion des plasmides pCRII parentaux non-mutés. Ainsi après 1 heure d'incubation à 37°C en présence de l'enzyme, notre produit d'amplification ne contient plus que des plasmides *WAKJUX1-BRI1*-pCRII mutés.

Des bactéries *XL-10-Gold* ultracompétentes ont été transformées par choc thermique avec le produit d'amplification *WAKJUX1-BRI1*-pCRII mutés, étalées sur un milieu LB contenant 60 µg/ml d'ampicilline et incubées une nuit à 37°C.

Une PCR diagnostic utilisant les amorces Van Wak1g et Van bri1d a été réalisée afin d'identifier les colonies possédant le plasmide *WAKJUX1-BRI1*-pCRII muté de celles possédant un plasmide pCRII vide (**figure 26**).

Une miniprep a été réalisée sur chacune des 4 constructions mutantes afin de récupérer le plasmide *WAKJUX1-BRI1*-pCRII contenant la mutation désirée.

Une étape de séquençage a finalement été réalisée sur les 4 produits miniprep afin de s'assurer que la séquence *WAKJUX1-BRI1* possédait bien la mutation souhaitée.

A ce stade du travail, nous possédons le récepteur *WAKJUX1-BRI1* sauvage et quatre constructions mutées ((LL)349-350(QH) ; (FF)371-372(AA) ; (P)389(A) et (WAKTRANS)371-380) et dans le plasmide pCRII. Ces constructions devront être insérées dans le plasmide pBI121 permettant la transformation de plantules d'*Arabidopsis thaliana* par *Agrobacterium tumefaciens*.

B.3. Transfert des constructions hybrides en pBI121

A ce stade du travail, nous possédons les constructions *WAKJUX1-BRI1*, *WAK1-BRI1* et leurs versions mutées dans le plasmide pCRII. Actuellement, seules la construction *WAK1-BRI1* et ses deux versions mutées R166Q et K101-102T ont été transférées dans un vecteur pBI121, vecteur permettant la transformation en plante (**figure 6 : point 6**).

Ce plasmide d'une taille de 12000 pb contient un T-DNA codant pour le gène de la β -glucuronidase (GUS) sous contrôle du promoteur 35S constitutif du virus de la mosaïque du chou-fleur et d'un gène de résistance à la kanamycine sous contrôle du promoteur de la nopaline synthase. Ce T-DNA est délimité par deux régions répétées de 25 paires de bases appelées bord gauche et bord droit qui permettent le transfert du T-DNA dans le génome du végétal (**voir figure 2 matériel et méthodes**). Le marqueur de résistance à la Kanamycine permettra la sélection de plantes ayant intégrées le T-DNA dans leur génome.

Grâce aux sites de restriction XbaI et SstI présents à la fois sur le plasmide pBI121 et ajoutés aux extrémités de chacune de nos séquences d'intérêt, il sera possible d'exciser le gène *GUS* et d'y insérer la séquence de notre récepteur hybride (**figure 27**).

Dans un premier temps, la construction *WAK1-BRI1*-pCRII et ses 2 versions mutées ont été restreints avec les enzymes de restriction XbaI (T↓CTAGA) et SstI (GAGCT↓C) (**figure 28**). Cette restriction a généré 2 fragments d'une taille respective de 3902 pb et de 2068 pb. Les fragments de 2068 pb correspondant à la séquence *WAK1-BRI1* et ses versions mutées ont été déposés sur gel agarose 1% (**figure 29**).

Dans le même temps, le plasmide pBI121 a été restreint avec les mêmes enzymes de restriction (XbaI et SstI) et déposé sur gel agarose 1%. Cette étape de restriction a permis l'excision du gène *GUS* (1812 pb) du plasmide pBI121 (11000 pb). La bande de 11000 pb correspondant au plasmide pBI121 restreint a été excisée et purifiée du gel (**figure 29**).

Le fragment *WAK1-BRI1* et ses versions mutées R166Q et K101-102T ont ensuite été ligués dans le vecteur pBI121 restreint via une T4 DNA ligase.

B.4. Transformation d'*Agrobacterium tumefaciens* et de plantules d'*Arabidopsis thaliana*

Agrobacterium tumefaciens est une bactérie gram négative responsable de la maladie de la galle du collet. Cette bactérie, capable d'infecter les plantes, possède un plasmide Ti (Tumor induce) contenant un T-DNA inducteur de tumeur et des gènes *vir* (virulence) responsable de la virulence en permettant le transfert du T-DNA dans le génome de la plante (**figure 30**).

Les *A.tumefaciens* LBA4404 utilisées dans le cadre de ce travail contiennent un plasmide Ti désarmé, c'est-à-dire ne possédant plus le T-DNA codant pour les gènes capables d'induire des tumeurs chez la plante.

Par contre, la région *ori* et les gènes *vir* codant pour des protéines impliquées dans la mécanistique d'intégration du T-DNA dans le génome de la plante sont toujours présents.

En d'autres mots, le plasmide TI désarmé possède uniquement les outils moléculaires nécessaire à l'intégration du T-DNA dans le génome de la plante.

Des *A.tumefaciens* LBA4404 rendues électrocompétentes ont été transformées par électroporation avec le produit de ligation *WAK1-BRI1*-pBI121, étalées sur un milieu LB contenant 50 μ g/ml de kanamycine et incubées pendant une nuit à 28°C (**figure 6 : point 8**).

Une PCR diagnostic utilisant les amorces Van Wak1g et Van bri1d a été réalisée afin d'identifier les colonies possédant la construction *WAK1-BRI1*-pBI121.

Ces *A.tumefaciens* transformées avec la construction *WAK1-BRI1*-pBI121 ont ensuite été utilisées pour réaliser une transformation florale d'*Arabidopsis thaliana* (**figure 6 : point 8**).

La méthode de transformation utilisée est basée sur l'immersion de fleurs d'*Arabidopsis thaliana* dans une solution d'*A. tumefaciens* transformés. Ces agrobactéries sont resuspendues dans une solution contenant du Tween-20 0,05% et de sucrose 5%, ce qui permet d'augmenter l'efficacité de transformation (**Clough et Bent, 1998**). En effet, l'ajout de ce surfactant et du sucrose dans la solution de resuspension permet de passer d'un ratio de 1/1000 à 1/100 graines transformées.

Par ailleurs, cette manipulation a été répétée plusieurs fois à des intervalles de 2 jours afin d'augmenter d'efficacité de transformation.

Les plantules d'*A.thaliana* traitées sont ensuite maintenues dans des conditions humides durant 24 heures.

B.5. Sélection des *Arabidopsis thaliana* transformées

Lorsque les siliques des plantules transformées ont commencé à s'ouvrir, les graines ont été récupérées. Après une étape de stérilisation dans de l'éthanol 95% et de l'eau de javel, ces graines ont été placées sur un milieu de germination contenant du sucrose et 50 µg/ml de kanamycine, permettant de sélectionner uniquement les graines transformées. Ce milieu de germination a ensuite été placé à 4°C durant 2 jours afin de synchroniser et de stimuler la germination des graines. A l'heure actuelle, les graines sont en phase de croissance en chambre de culture (**figure 31**).

Au terme de ce travail, nous avons construit le récepteur hybride WAKJUX1-BRI1 dans le plasmide pCRII en ligant les domaines extracellulaire, transmembranaire et juxtamembranaire de WAK1 avec le domaine intracellulaire kinase de BRI1.

Ce récepteur WAKJUX1-BRI1 a ensuite été séquencé et corrigé par mutagenèse dirigée. Des versions mutées nommées (LL)349-350(QH) ; (FF)371-372(AA) ; (P)389(A) et (WAKTRANS)371-380 ont finalement été obtenues par mutagenèse dirigée et serviront de contrôle négatif à l'étude de l'activation du récepteur WAKJUX1-BRI1 en présence de fragments pectiques.

Parallèlement au récepteur WAKJUX1-BRI1, nous avons travaillé avec le récepteur hybride WAK1-BRI1. Ce récepteur, exempt du domaine juxtamembranaire de WAK1 et déjà inséré en pCRII avant le commencement de ce travail, a été utilisé pour obtenir des versions mutées au niveau du domaine extracellulaire de WAK1. Ces 2 versions mutées nommées R166Q et K101-102T ne peuvent plus interagir avec les fragments pectiques et serviront de contrôle négatif à l'activation du récepteur WAK1-BRI1.

La construction *WAK1-BRI1* et ses deux versions mutées R166Q et K101-102T ont ensuite été transférées dans le plasmide pBI121. Des *Agrobacterium tumefaciens* ont été transformées avec le plasmide pBI121 contenant notre insert *WAK1-BRI1* muté ou non. Une transformation de plantules d'*Arabidopsis thaliana* a ensuite été réalisée. Finalement, les graines issues de ces plantules transformées ont été placées sur un milieu sélectif afin de sélectionner celles possédant la séquence *WAK1-BRI1* muté ou non au sein de leur génome.

IV. Conclusion et perspectives

De précédentes études ont permis d'identifier la pectine et les fragments pectiques, comme premiers ligands du récepteur transmembranaire WAK1 (**Decreux et Messiaen, 2005 et 2006**). Cependant aucune étude n'a encore prouvé que la pectine et ses fragments pectiques étaient capables d'activer le récepteur WAK1. Ceci est principalement dû au fait que la caractérisation des voies de transduction du signal de WAK1 reste inconnue.

L'objectif de ce mémoire était de contribuer à l'étude de l'activation de WAK1 en créant un récepteur hybride capable de lier les fragments pectiques et d'initier l'activation d'une voie de transduction du signal menant à l'expression de gène connus. Le récepteur hybride WAKJUX1-BRI1 fut donc construit.

Dans la première partie du mémoire, nous avons entrepris la conception du récepteur hybride WAKJUX1-BRI1 à partir duquel nous avons généré plusieurs versions mutées, soit au niveau du domaine transmembranaire, soit au niveau du domaine juxtamembranaire de WAKJUX1. Toutes ces versions mutées sont des contrôles négatifs de l'activation du récepteur WAKJUX1-BRI1 en présence d'OGAs.

Au terme de ce mémoire, le récepteur WAKJUX1-BRI1 et ses versions mutées transmembranaire et juxtamembranaire sont présentes dans le plasmide pCRII et devront par la suite être insérées dans le plasmide pBI121 puis dans le génome d'*Arabidopsis thaliana* par transformation florale.

Il serait également intéressant de construire d'autres versions mutées du récepteur hybride WAKJUX1-BRI1. Par exemple, des versions mutées au niveau du domaine extracellulaire de WAKJUX1 pour inactiver la liaison à la pectine et d'autres mutés au niveau du domaine intracellulaire de BRI1 pour inactiver l'initiation des voies de transduction du signal dépendante de BRI1.

Dans la seconde partie du mémoire, nous avons transféré les constructions du récepteur WAK1-BRI1 (exempt du domaine juxtamembranaire de WAK1) et ses versions mutées au niveau du domaine extracellulaire de WAK1 du plasmide pCRII vers le plasmide pBI121.

Ces constructions ont ensuite été introduites dans le génome d'*A.thaliana* par transformation florale via *Agrobacterium tumefaciens*. En ce moment, les plantules potentiellement transformées sont en cours de croissance sur un milieu sélectif en chambre de culture.

Dans la continuation de ce mémoire, il faudra d'abord réaliser un screening PCR sur les plantules ayant poussées sur le milieu sélectif afin de s'assurer qu'il ne s'agit pas de faux positif et que les plantes possèdent bien la construction hybride *WAK1-BRI1* au sein de son génome. Cela pourrait être confirmé en utilisant des amorces s'hybridant de part et d'autre de la séquence hybride du récepteur (ex : Van Wak1g et Van Bri1d).

Il serait également intéressant de déterminer la localisation et de quantifier le niveau d'expression des récepteurs hybrides en membrane plasmique. Pour cela, nous pourrions soit coupler nos récepteurs hybrides à une protéine fluorescente (ex : GFP) et révéler au

microscope confocal, soit cloner une tag polyhistidine à la séquence et révéler avec un anticorps ciblant la tag. Dans les 2 cas, il faudrait synthétiser une nouvelle amorce nucléotidique contenant en 5' la séquence codante, soit pour une GFP, soit pour la tag polyhistidine. Cette amorce, en s'hybridant à l'une des 2 extrémités de la séquence du récepteur hybride, permettra par amplification PCR le clonage d'une nouvelle séquence hybride contenant la GFP ou la Tag.

Après cela, il faudra étudier si le récepteur WAK1-BRI1 est activé en présence d'OGAs de DP > 9. Pour ce faire, il faudra quantifier le niveau d'expression des ARNm des gènes *CycD3*, *TCH4* et *BRH1* par RT-PCR semi-quantitative et quantitative.

Par ailleurs, il serait intéressant de localiser le site d'insertion des séquences hybrides au sein du génome de la plante. Ainsi, nous pourrions déterminer si le lieu du site d'insertion dans le génome de la plante influence ou non les résultats enregistrés par RT-PCR semi-quantitative ou quantitative. En effet, nous pourrions imaginer que si la séquence codante pour le récepteur hybride s'intègre et perturbe un gène fonctionnellement important pour la plante, les résultats enregistrés soient faussés. Pour localiser ce site d'insertion, nous pourrions utiliser la technique du « génome walker ».

Dans les perspectives à plus long terme, l'étude d'un possible processus de dimérisation lors de l'activation du récepteur WAK1 pourrait également être envisagée. Des techniques telles que le FRET (Fluorescence resonance energy transfer) ou le BiFC (Biomolecular Fluorescence Complementation) pourraient être utilisées étant donné qu'elles permettent de mettre en évidence une interaction entre 2 protéines et donc entre 2 récepteurs.

Le FRET est une technique qui fait appel à 2 fluorochromes de couleur différente, l'un accepteur et l'autre récepteur, chacun couplé à une protéine différente. Lorsqu'il y a une interaction entre les 2 protéines, le fluorochrome accepteur est capable de transférer de l'énergie au fluorochrome récepteur, lui permettant ainsi d'émettre une fluorescence à sa propre longueur d'onde caractéristique (c'est-à-dire à la couleur du fluorochrome récepteur). Par contre, si les 2 protéines n'interagissent pas, les 2 fluorochromes ne sont plus en contact et c'est le fluorochrome accepteur qui émet une fluorescence à sa propre longueur d'onde caractéristique (couleur du fluorochrome accepteur) (**figure 1**)

Dans notre cas, nos récepteurs hybrides seraient soit couplés à une CFP (Cyan fluorescent protein) soit à une YFP (Yellow fluorescent protein). Dès lors, il suffirait d'exciter le fluorochrome accepteur (CFP) et de voir si il réémet dans le cyan ou le jaune. Ainsi, si nos récepteurs dimérisent, l'émission de fluorescence sera de couleur jaune car il y aurait transfert d'énergie entre nos 2 fluorochromes, tandis que s'il n'y a pas d'interaction, l'émission de fluorescence sera de couleur cyan.

La technique du BiFC fait également appel à la fluorescence pour mettre en évidence une interaction entre 2 protéines. Cette technique est basée sur l'utilisation de 2 plasmides, l'un codant pour l'extrémité C-terminal de la YFP fusionnée avec la protéine 1 et l'autre pour l'extrémité N-terminal de la YFP fusionnée avec la protéine 2.

Si il y a interaction entre la protéine 1 et 2 lorsqu'elles sont exprimées, il y a reconstitution de la protéine YFP fonctionnelle qui peut alors émettre une fluorescence dans le jaune lorsqu'elle est excitée à la longueur d'onde appropriée (**figure 2**).

Enfin, lorsque l'activation du récepteur WAK1 en présence d'OGAs aura été confirmée, nous pourrons alors tenter d'identifier des interactants interagissant spécifiquement avec le domaine intracellulaire kinase. Pour cela, nous pourrions utiliser le double hybride en levure ou des études de phosphoprotéomiques.

V. Bibliographie

Becraft, P. W. (2002). "Receptor kinase signaling in plant development". Annu. Rev. Cell Dev. Biol **18**: 163-192.

Boudart, G., Dechamp-Guillaume, G., LaFitte, C., Ricart, G., Barthe, J-P., Mazau, D., Esquerré-Tugayé, M-T., (1995). « Elicitors and suppressors of hydroxyprolin-rich glycoprotein accumulation are solubilized from plant cell walls by endopolygalacturonase ». Eur. J. Biochem **232**, 449-504.

Branden, Tooze, Lubochinsky, Janin. (1996). «Introduction à la structure des protéines » Deboeck université.

Cabrera J-C, Boland A, Messiaen J, Cambier P, Van Custem P. (2008). "Egg box conformation of oligogalacturonides: The time-dependent stabilization of the elicitor-active conformation increases its biological activity". Glycobiology **18**: 473-482.

Carpita N, Gibeaut D (1993). "Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth". The Plant Journal **3**: 1-30.

Carpita N, M. M. (2000). "The cell wall. In Biochemistry and Molecular Biology of Plants". Edited by Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL.: 52-108.

Clough SJ, Bent AF. (1998). "Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*". Plant Journal. **16**(6): 735-743.

Clouse S.D., (2002) "Brassinosteroid signal transduction : clarifying the pathway from ligand perception to gene expression" Molecular cell **10**: 973-982.

Cosgrove, D. J. (1997). "Assembly and enlargement of the primary cell wall in plants". Annu Rev. Cell Dev. Biol. **13**: 171-201.

Cosgrove, D. J. (2001). "Plant cell walls: wall-associated kinases and cell expansion". Current Biology **11**(14): R558-R559.

Côté, F. and M. G. Hahn (1994). "Oligosaccharins – Structures and Signal-Transduction". Plant Molecular Biology **26**(5): 1379-1411.

Decreux, A. and J. Messiaen (2005). "Wall-associated kinase WAK1 interacts with cell wall pectins in a calcium-induced conformation". Plant and Cell Physiology **46**(2): 268-278.

Decreux, A., A. Thomas, B. Spies, R. Brasseur, P. Van Custem and J. Messiaen (2006). "In vitro characterization of the homogalacturonan-binding domain of the wall-associated kinase WAK1 using site-directed mutagenesis". Phytochemistry **67**(11): 1068-1079.

Delmer D (1999). "Cellulose Biosynthesis : Exciting Times for A Difficult Field of Study". Plant Physiology. Plant Molecular Biology **50**: 245-276.

Dhe-Paganon, S., Werner, E., Nishi, M., Hansen, L., Chi, Y-I., Shoelson, S., (2004). “A phenylalanine Zipper mediates APS dimerization” Natural structural & molecular biology **11**: 968-974.

Fry, S. C., (1995). “Polysaccharide-Modifying Enzymes in the Plant-Cell Wall” Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **46** : 497-520.

Garrett, G., Lubochinsky (2000). “Biochimie” De Boeck Université.

Gomez-Gomez, L., Bauer, Z. and Boller, T. (2001). “Both the extracellular leucine-rich repeat domain and the kinase activity of FLS2 are required for flagellin binding and signaling in *Arabidopsis thaliana*” Plant Cell **13**: 1155-1163.

Haffani, Y.Z., Silva N.F., Goring D.R., (2004). “Receptor kinase signalling in plants” Canadian journal of botany **82** : 1-15.

He, Z.H., Fujiki, M., Kohorn, B.D. (1996). “A cell wall-associated kinases, receptor-like protein kinase. Journal of biological chemistry **271**: 19789-19793.

He, Z.H., He, D., Kohorn, B.D., (1998). “ Requirement for the induced expression of a cell wall associated receptor kinase for survival during the pathogen response” Journal of biological chemistry **14** : 55-63.

He, Z.H., Fujiki, M., Kohorn, B.D. (1999). “A cluster of five cell wall-associated kinases genes, Wak1-5, are expressed in specific organs of *Arabidopsis*”. Plant molecular biology **39**: 1189-1196.

He, Z., Wang, Z. Y., Li, J., Zhu, Q., Lamb, C., Ronald, P., Chory, J. (2000). “Perception of brassinosteroids by the extracellular domain of the receptor kinase BRI1”. Science **288**: 2360-2363.

Hu, Y., Bao, F., Li, J., (2000). “Promotive effect of brassinosteroids on cell division involves a distinct CycD3-induction pathway in *Arabidopsis*”. Plant Journal **24**: 693-701.

Ishii T, Matsunaga T, and Hayashi N. (2001). “ Formation of Rhamnogalacturonan II-Borate Dimer in Pectin Determines Cell Wall Thickness of Pumpkin Tissue”. Plant Physiology **126**(4): 1698-1705.

José-Estanyol, M., Puigdomènech, P., (2000). “Plant cell wall glycoproteins and their genes”. Plant physiology Biochemistry **38**: 97-108.

Kohorn Bruce D. (2000). “Plasma Membrane-Cell Wall Contacts”. Plant physiology **124**: 31-38.

Lally, D., P. Ingmire, H. Y. Tong and Z. H. He (2001). “Antisense expression of a cell wall-associated protein kinase, WAK4, inhibits cell elongation and alters morphology”. Plant cell **13**(6): 1317-1331.

Lapous, D., Mathieu, Y., Guern, J., Laurière, C., (1998). “Increase of defense gene transcripts by cytoplasmic acidification”. Planta **205**: 452-458.

Liners F. and Van Custem P. (1992). "Distribution of pectin polysaccharides throughout walls of suspension-cultured carrot cells". Protoplasma **170**: 10-21.

Mellersch, D.G., Heath, M.C., (2001). "Plasma membrane-cell wall adhesion is required for expression of plant defense responses during fungal penetration" Plant cell **13**: 413-424.

Messiaen, J., Read, N.D., Van Custem, P., Trewavas, A.J., (1993). "Cell wall oligogalacturonides increase cytosolic free calcium in carrot protoplasts" Journal of cell science **104** : 365-371.

Messiaen, J., Van Custem, P., (1994). "Pectin signal transduction in carrot cells : membrane, cytosolic and nuclear responses induced by oligogalacturonides" Plant cell physiology **35**, 677-689.

Mohnen D. (2008). "Pectin structure and biosynthesis". Current Opinion in Plant Biology **11**: 266-277.

Molnar, G., Bancos, S., Nagy, F., Szekeres, M., (2002). "Characterization of BRH1, a brassinosteroid-responsive RING-H2 gene from *Arabidopsis thaliana*" Planta **215**: 127-133.

Montesano, M., Brader, G., Tapio Palva, E., (2003). "Pathogen derived elicitors : searching for receptors in plants" Molecular plant pathology **4**: 73-79.

Navazio, L., Moscatiello, R., Bellincampi, D., Baldan, B., Meggio, F., Brini, M., Bowler, C., Mariani, P., (2002). "The role of calcium in oligogalacturonide-activated signalling in soybean cells. Planta **215** : 596-605.

Oxley, D., Bacic, A., (1999). " Structure of the glycosylphosphatidylinositol anchor of an arabinogalactan protein from *Pyrus communis* suspension-cultured cells" Proc. Natl.Ac.Sci **96**: 14246-14251.

O'Neil, M. A. and W. S. York. (2003). "The composition and structure of plant primary cell walls" Blackwell publishing Ltd, Oxford.

Park, S. K. C., Ui Jeong Yun, Mi Young Jin, Seoung Hyun Lee, Gilberto Sachetto-Martins, and Ohkmae K. Park. (2001). "Interaction of the *Arabidopsis* receptor protein kinase Wak1 with a glycine rich protein AtGRP3." Journal of Biology chemistry **276**: 26688-26693).

Pear, A.R., Kawagoe, Y., Schreckengost, W. E., Delmer, D. P., Stalker, D. M. (1993). "Hogher plants contain homologs of the bacterial *celA* genes encoding the catalytic subunit of cellulose synthase". Proc. Natl. Ac. Sci. USA **93**: 12637-12642.

Reymond, P., Grünberger, S., Paul, K., Müller, M., Farmer, E.E., (1995). "Oligogalacturonide defense signals in plants : large fragments interact with the plasma membrane in vitro" Proc.Natl.Ac.Sci USA **92** : 4145-4149.

Reymond, P., Kunz, B., Paul-Pletzer, K., Grimm; R., Eckerskorn, C., Farmer, E.E., (1996). "Cloning of a cDNA encoding a plasma membrane-associated, uronide binding phosphoprotein with physical properties similar to viral movement proteins " Plant cell **8** : 2265-2276.

Ridley, B. L., M. A. O'Neil and D. A. Mohnen (2001). "Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling". Phytochemistry **57**(6): 929-967.

Shiu and Bleecker (2001). "Receptor-like kinases from *Arabidopsis thaliana* form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases". Proc. Natl. Acad. Sci **98**: 10763-10768.

Shiu, S.H., Bleecker, A.B., (2003). " Expansion of the receptor-like kinases/pelle gene family and recepto-like proteins in *Arabidopsis*" Plant Physiology **132**: 530-543.

Simpson, S. D., D. A. Ashford, D. J. Harvey and D. J. Bowles (1998). "Short chain oligogalacturonides induce ethylene production and expression of the gene encoding aminocyclopropane 1-carboxylic acid oxidase in tomato plants". Glycobiology **8**: 579-583.

Spiro, M. D., B. L. Ridley, S. Eberhard, K. A. Kates, Y. Mathieu, M. A. O'Neill, D. Mohnen, J. Guern, A. Darvill and P. Albersheim (1998). "Biological activity of reducing-end-derivatized oligogalacturonides in tobacco tissue cultures". Plant Physiology **116**: 1289-1298.

Stockes K. D., Gururaj Rao A. (2008). "Dimerization properties of the transmembrane domains of *Arabidopsis* CRINKLY4 receptor-like kinase and homologs". Archives of Biochemistry and Biophysics **477**: 219-226.

Sugiyama, N., Nakagami, H., Mochida, K., Daudi, A., Tomita, M., Shirasu, K., and Ishihama, Y., (2008). "Large-scale phosphorylation mapping reveals the extent of tyrosine phosphorylation in *Arabidopsis thaliana*" Molecular Systems Biology **4**: 193-199.

Thibault J-F, Renard CMGC, Axelos MAV, Roger P, Crépeau M-J (1993). Carbohydr Res **238**: 271-286.

Tichtinsky, G., Vanoosthuyse, V., Cock, J.M., Gaude, T., (2003). "Making inroads into plant receptor kinase signalling pathways" Trends in plant science **8**: 231-237.

Torii, K.U., (2000). "Receptor kinase activation and signal transduction in plants : an emerging picture" Current opinion in plant biology **3**: 361-367.

Verica, J.A., He, Z.H. (2002). " The cell wall-associated kinase (WAK) and WAK-like kinase gene family". Plant physiology **129**: 455-459.

Vincken, J. P., H. A. Schols, R. J. F. Oomen, M. C. Mc Cann, P. Ulvskov, A. G. J. Voragen and R. G. F. Visser (2003). "If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell expansion". Plant Cell **132**: 1781-1789.

Vorwerk, S., Somerville, S., Somerville, C., (2004). "The role of plant cell polysaccharide composition in disease resistance" Trends in Plant science **9**: 203-209

Wagner and Kohorn (2001). "Wall-associated kinases are expressed throughout plant development and are required for cell expansion". Plant Cell **13**: 303-318.

Willats, W. G. T., L. McCartney, W. Mackie and J. P. Knox (2001). "Pectin: cell biology and prospects for functional analysis". Plant Molecular Biology **47**: 9-27.

Yu, Q., Hlavacka, A., Matoh, T., Volkmann, D., Menzel, D., Goldbach, H.E., Baluska, F., (2002). "Short-term boron deprivation inhibits endocytosis of cell wall pectins in meristematic cells of maize and wheat root apices" Plant Physiology **130**: 415-421.

VI. Annexes :

A. Introduction :

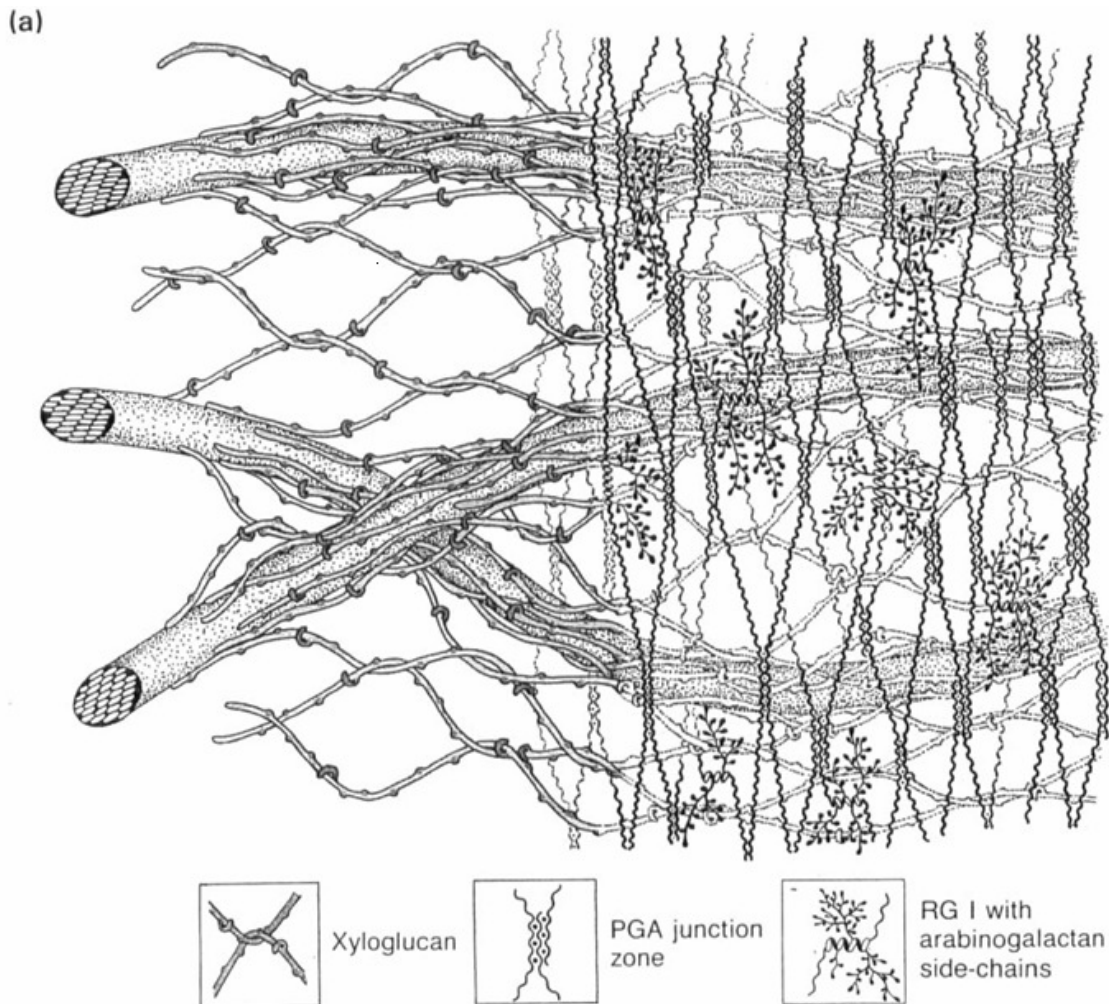


Figure 1: modèle d'organisation de la paroi cellulaire
(Carpita *et al*, 1993).

Les microfibrilles de cellulose s'associent avec des polymères de xyloglycanes via la formation de pont H et sont empaquetés dans une matrice de polysaccharides pectiques. Cette matrice est représentée par des zones d'association entre les chaînes d'homogalacturonanes et de rhamnogalacturonanes pouvant présenter des chaînes secondaires variables.

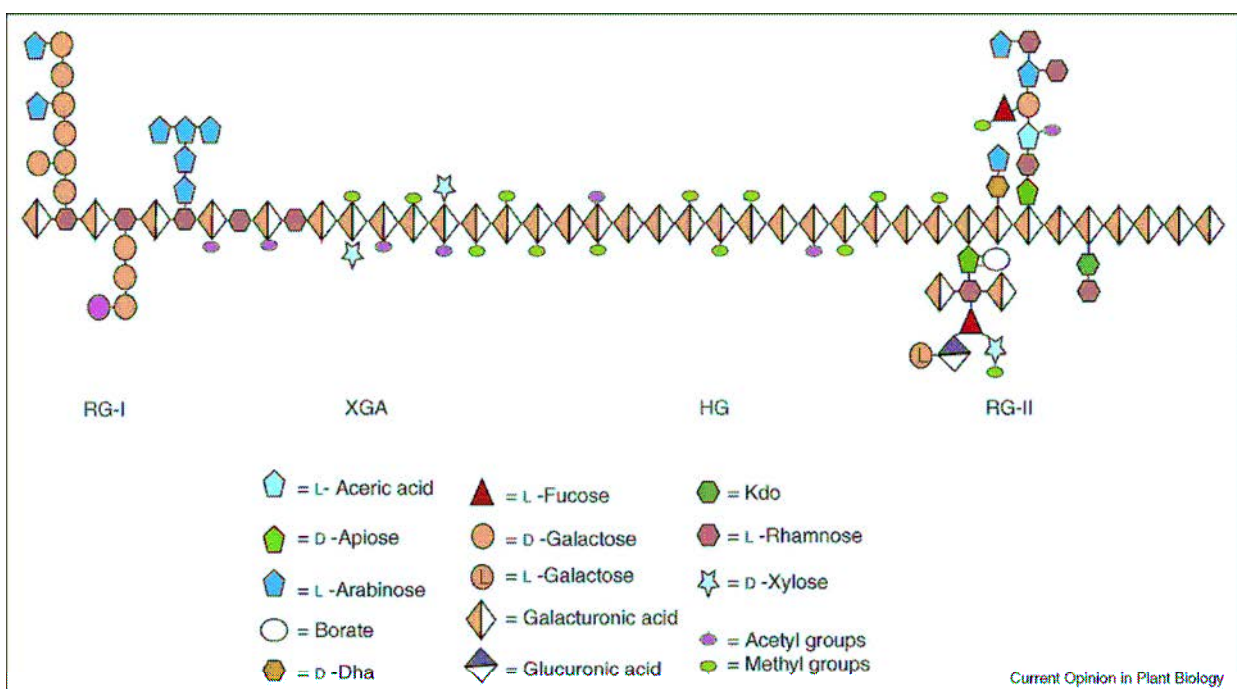


Figure 2: schématisation de l'association des différents domaines structuraux de la pectine (Mohnen, 2008).

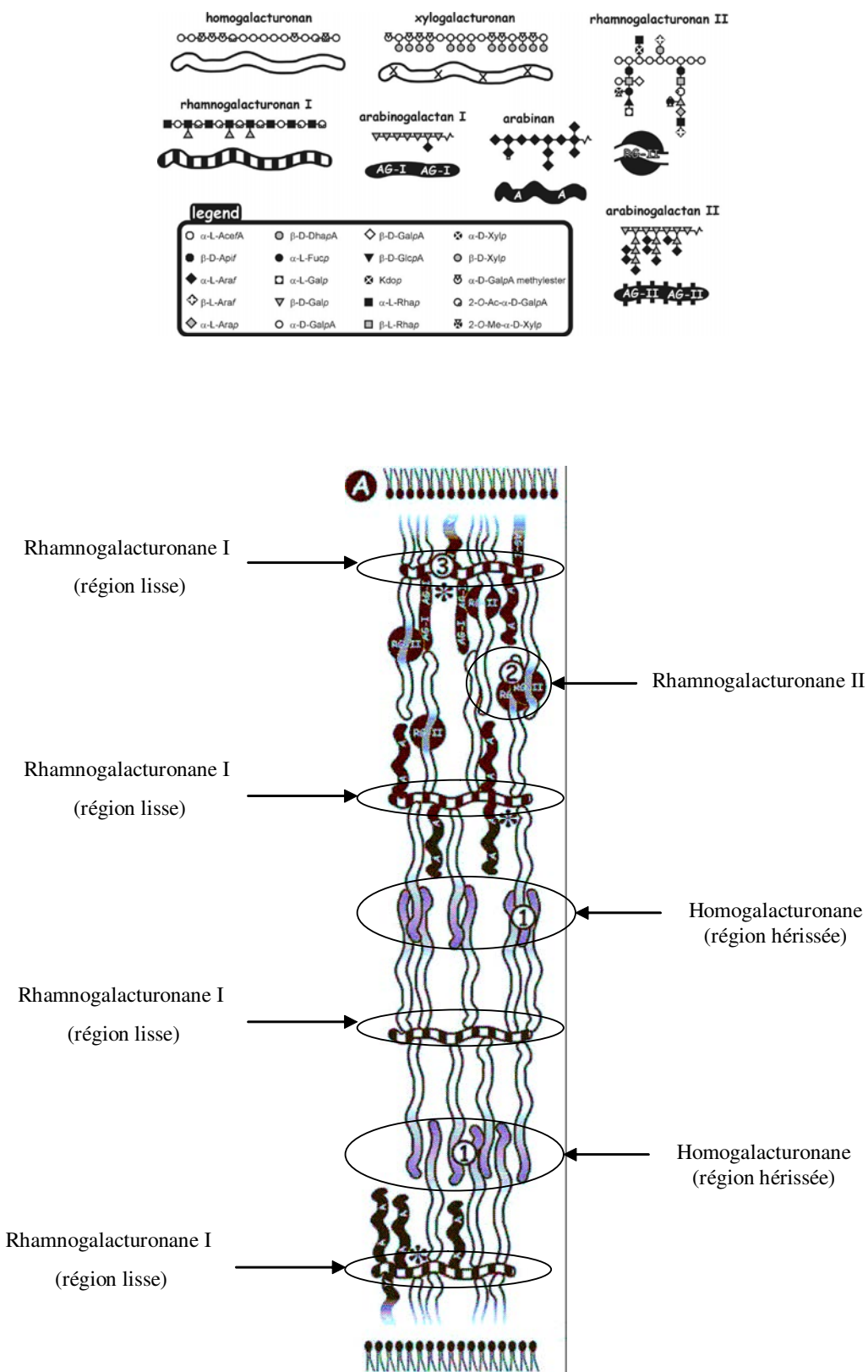


Figure 5 : schématisation du modèle d'association des polymères pectiques proposé par Vicken (Vicken *et al*, 2003).

Dans ce modèle, le rhamnogalacturonane I constitue la structure pariétale centrale pendant que le rhamnogalacturonane II et l'homogalacturonane forment les ramifications secondaires. Le réseau pectique est rendu plus stable grâce aux interactions ioniques entre les polymères de HG et RGI.

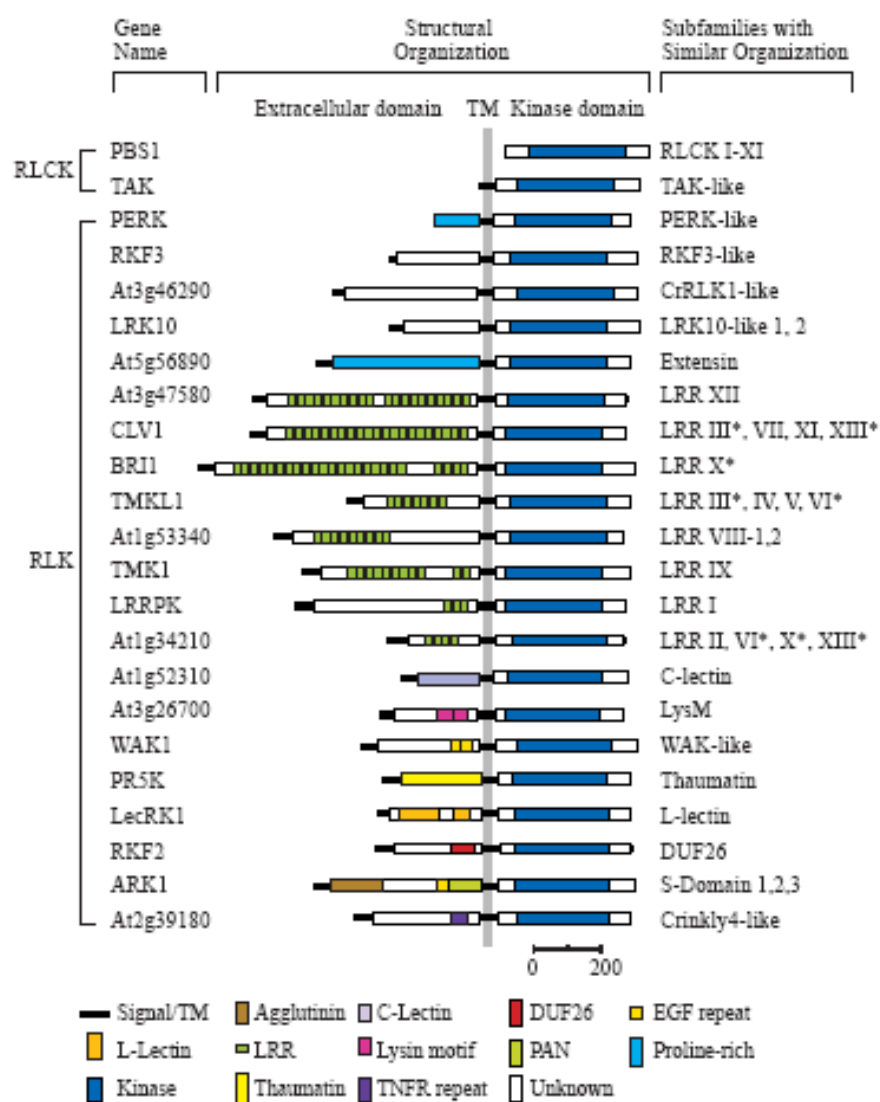


Figure 6 : classification des RLK en fonction de la nature du domaine extracellulaire (Shiu *et al*, 2001).

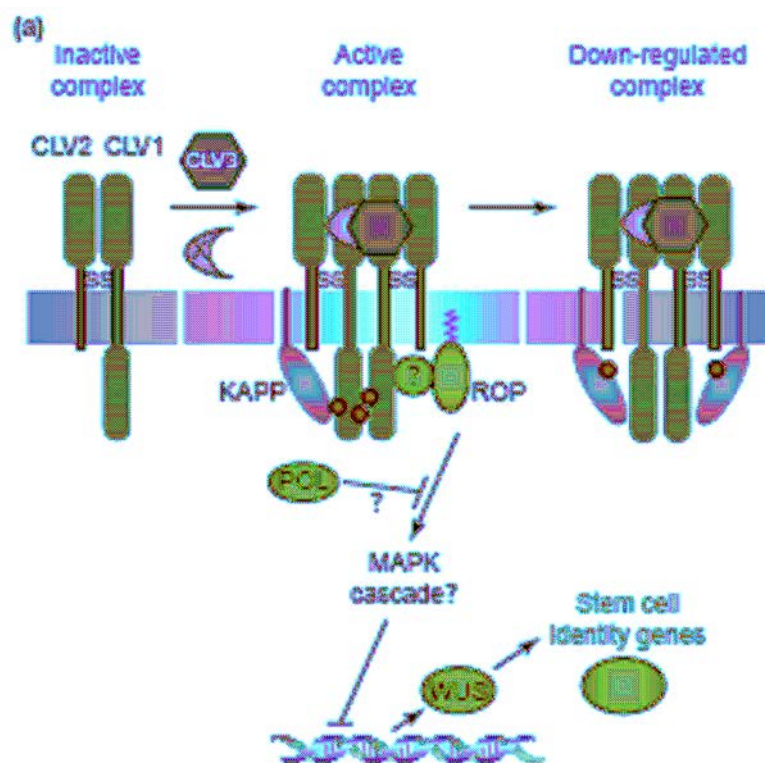


Figure 8 : schématisation du mécanisme d'action du récepteur CLAVATA
(Tichtinsky *et al*, 2003).

Le ligand CLV3, associé à un facteur X inconnu, permet l'oligomérisation et la transphosphorylation de l'hétérodimère CLV1/CLV2 menant à l'activation de la GTPase, Rop. Cette protéine initie une voie de transduction du signal menant à l'inhibition du gène *WUS* impliqué dans la différenciation des cellules souches présentes au niveau du méristème de la plante. Des phosphatases KAPP permettent de déphosphoryler le récepteur après activation.

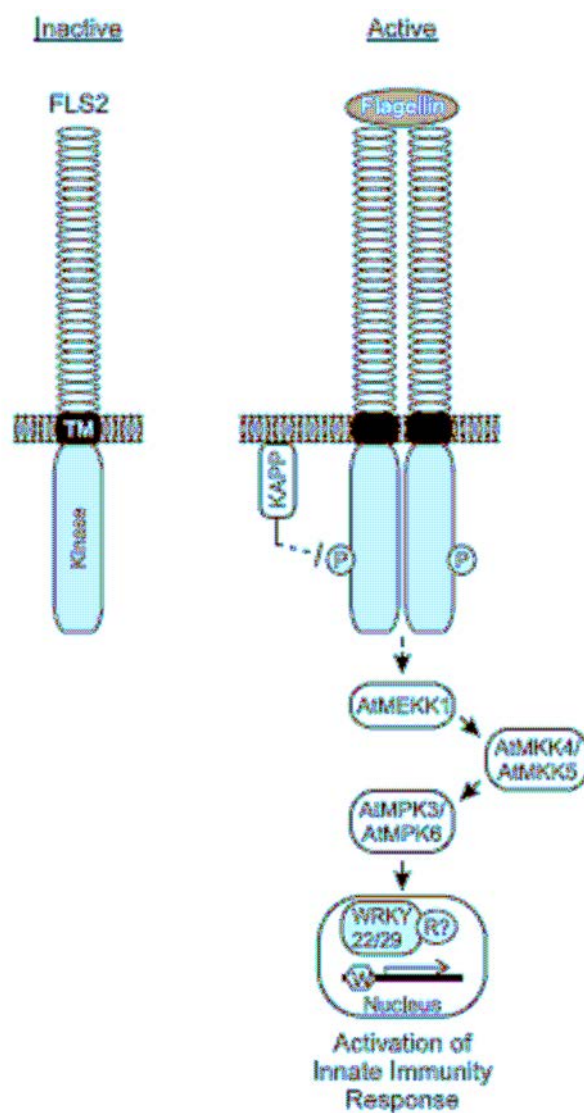


Figure 9 : schématisation du mécanisme d'action du récepteur FLS2

(Haffani *et al*, 2004).

Le récepteur FLS2 reconnaît un domaine conservé de 15 acides aminés présent sur la flagelline de bactéries gram négatives et initie une voie de transduction du signal menant à la libération des facteurs de transcription WRKY 22 et 29. Ces facteurs de transcription permettent d'activer des gènes de réponse impliqués dans l'innée immunitaire du végétal.

WAK: Wall-Associated Kinase

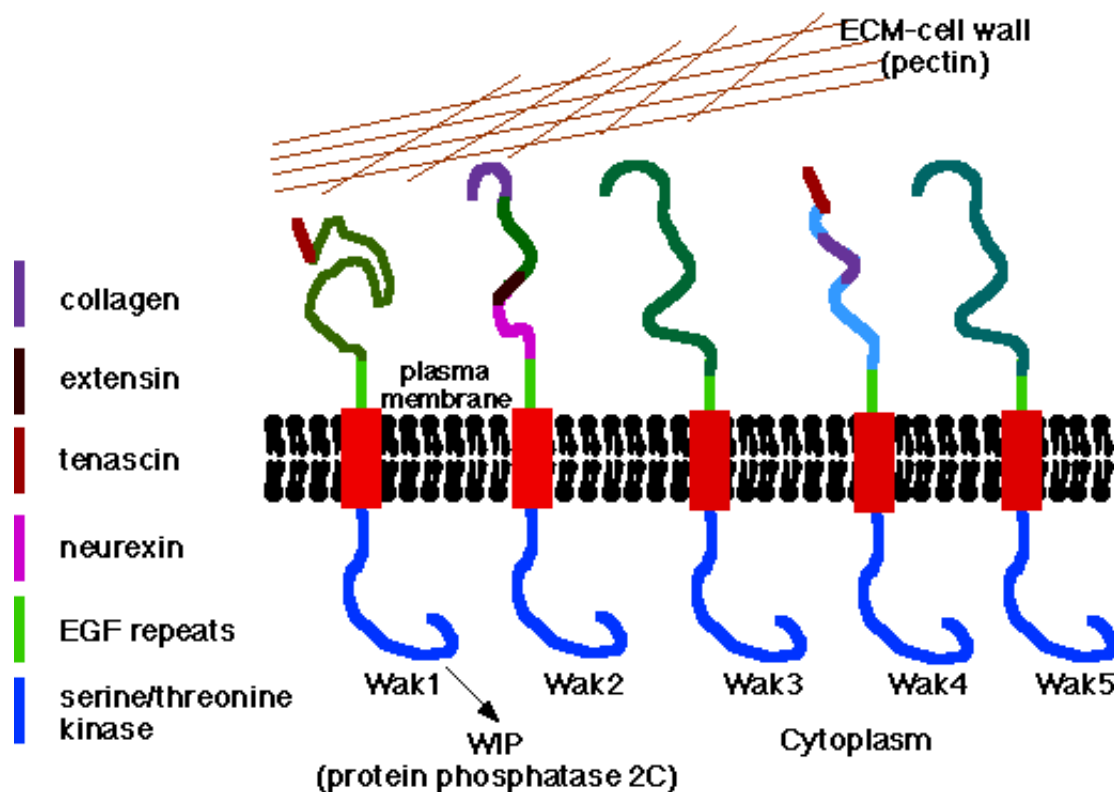


Figure 11 : représentation schématique des 5 isoformes de WAK
(He *et al*, 1999).

Le domaine intracellulaire sérine/thréonine kinase conservé entre les 5 isoformes est représenté en bleu. Le domaine transmembranaire inséré en membrane plasmique est représenté en rouge. Le domaine extracellulaire présente d'importantes variabilités entre les différents WAKs. Il est possible d'y retrouver des domaines présentant une homologie de séquence avec le collagène (mauve), l'extensine (brun), la tenascin (bordeaux), ou la neurexine (rose) présent dans la matrice extracellulaire des mammifères.

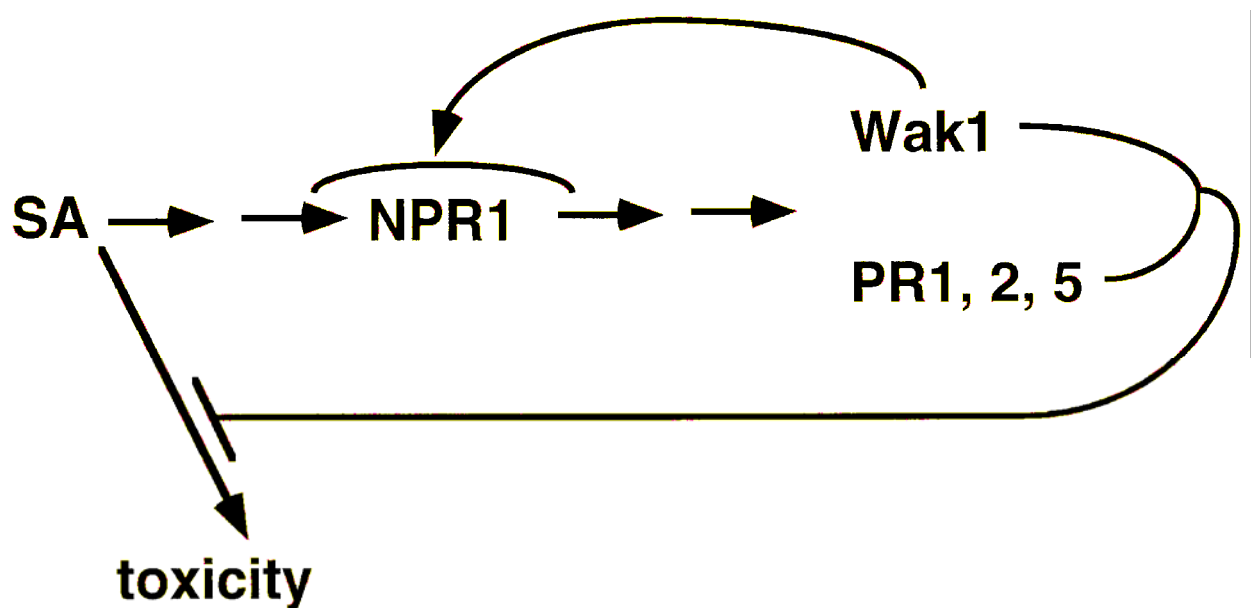


Figure 12 : schématisation de l'implication de WAK1 dans la réponse aux pathogènes
(He et al, 1999)

Lors d'une attaque par un pathogène, il y a une production de SA qui, via le régulateur positif NPR1, va activer la transcription des gènes *WAK1*, *PR1*, 2 et 5. Les protéines PR et WAK1 participeraient à l'activation d'un mécanisme de détoxification de SA. WAK1 serait également capable d'entretenir un effet protecteur de longue durée en formant une boucle de rétroaction positive sur NPR1.

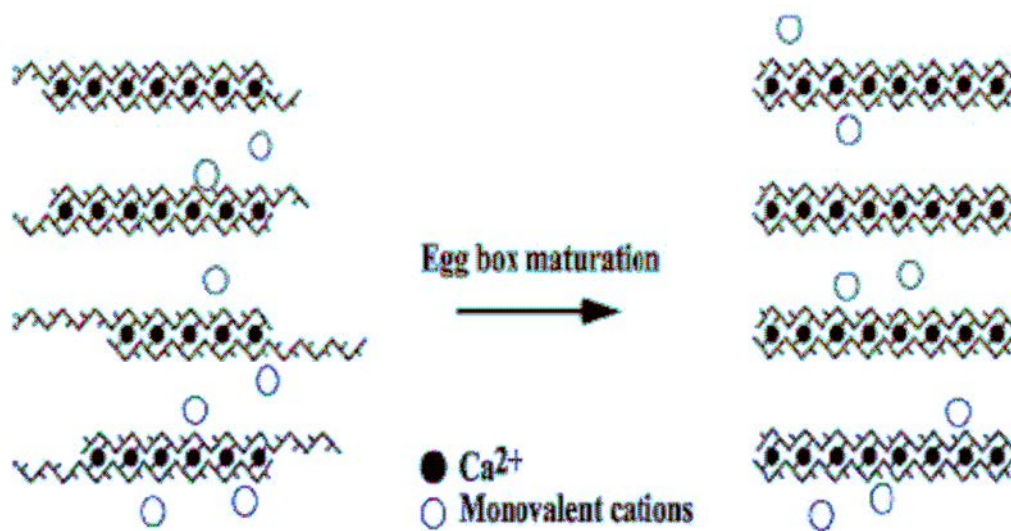


Figure 13 : schématisation du modèle de maturation des chaînes d'OGAs en « egg-box »

(Cabrera *et al*, 2008).

Au départ, 5 ions calcium permettent une dimérisation aléatoire des chaînes anti-parallèles d'OGAs. Grâce à l'arrivée d'autres ions calcium, la longueur des zones de jonction va augmenter pour finalement donner un alignement parfait entre les chaînes d'OGAs.

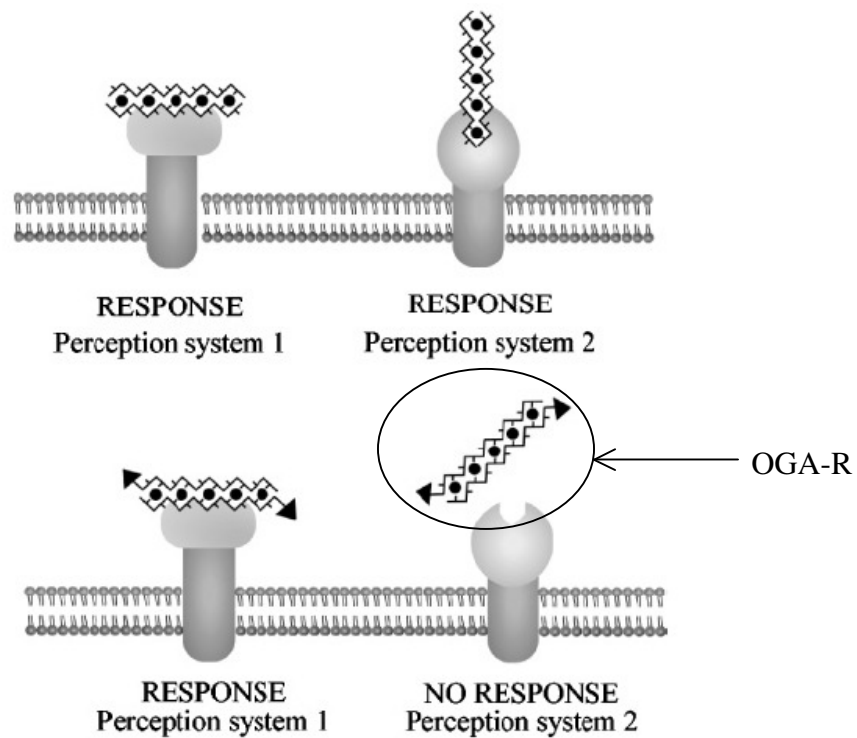


Figure 14 : modélisation de 2 récepteurs membranaires inconnu reconnaissant les dimères d'OGAs en conformation « egg-box » (Cabrera *et al*, 2008).

Le récepteur n°1 reconnaît les zones de jonction des chaînes d'OGAs tandis que le récepteur n°2 reconnaît uniquement l'extrémité réductrice des chaînes d'OGAs. L'ajout d'un groupement alcool en C-1 de l'extrémité réductrice des OGAs (OGA-R) inhibe la liaison avec le récepteur n°2 et les réponses de défense précoces contre les pathogènes.

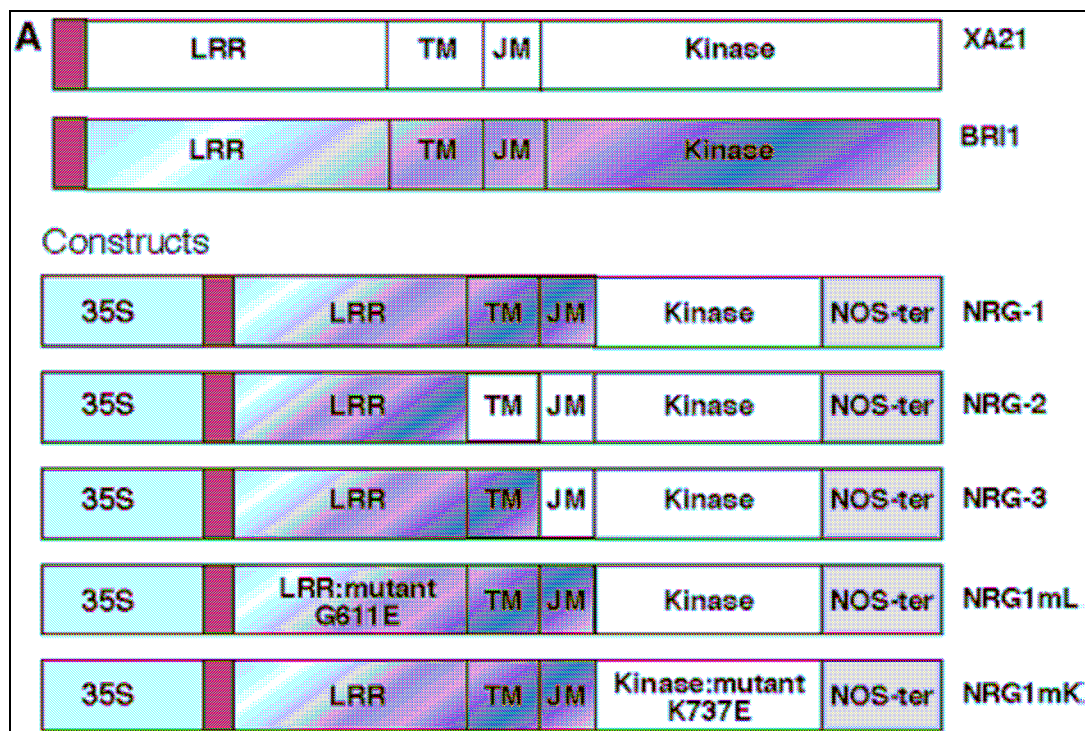


Figure 15 : représentation des différentes constructions hybrides du récepteur BRI1-Xa21 (He *et al*, 2000).

Toutes les constructions hybrides sont sous contrôle du promoteur fort 35S inducible en plante. NRG-1 est composé du domaine extracellulaire (EC), transmembranaire (TM) et juxtamembranaire (JM) de BRI1 fusionné au domaine intracellulaire kinase (IC) de Xa21. NRG-2 est composé du domaine EC de BRI1 fusionné avec les domaines TM, JM et IC de Xa21. NRG-3 est composé des domaines EC et TM de BRI1 fusionné avec les domaines JM et IC de Xa21. Seul la construction hybride NRG-1 est capable de lier les ligands brassinostéroïdes et d'initier la voie de transduction du signal menant à la résistance contre *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*. Les constructions mutantes de NRG-1, NRG1ml et NRGmK, sont utilisées comme contrôles négatifs pour confirmer les résultats enregistrés pour NRG-1.

B. Matériel et méthodes :

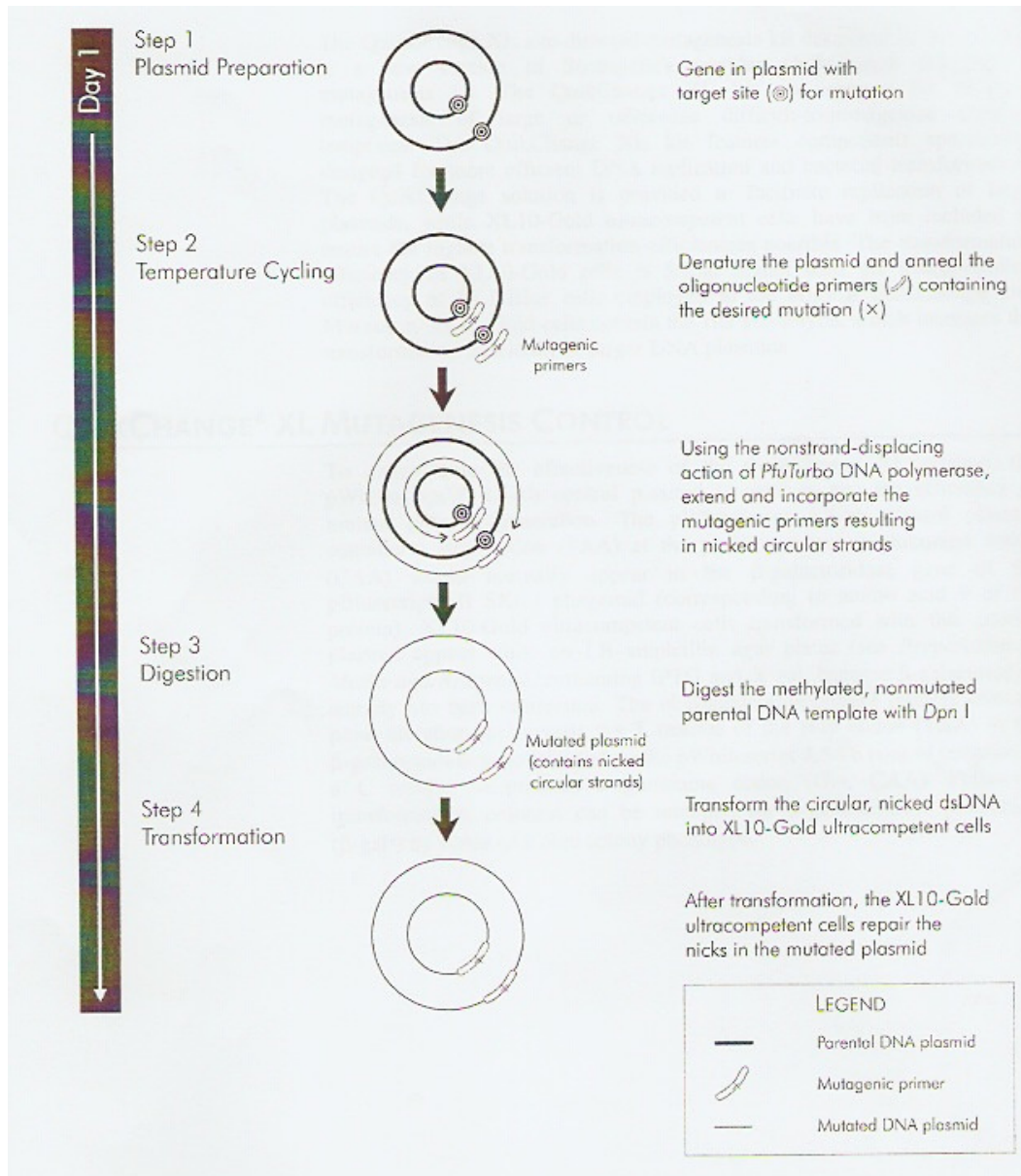


Figure 3 : schéma expérimental de la mutagenèse dirigée en 4 étapes (Stratagene).

1. Préparation du plasmide et conception des amorces pour la mutagenèse dirigée ; 2. PCR avec la *Pfu* polymérase ; 3. Digestion des brins parentaux méthylés avec *Dpn*I ; 4. Transformation en cellules ultracompetentes qui vont liguer les deux extrémités des brins néo-formés.

C. Résultats :

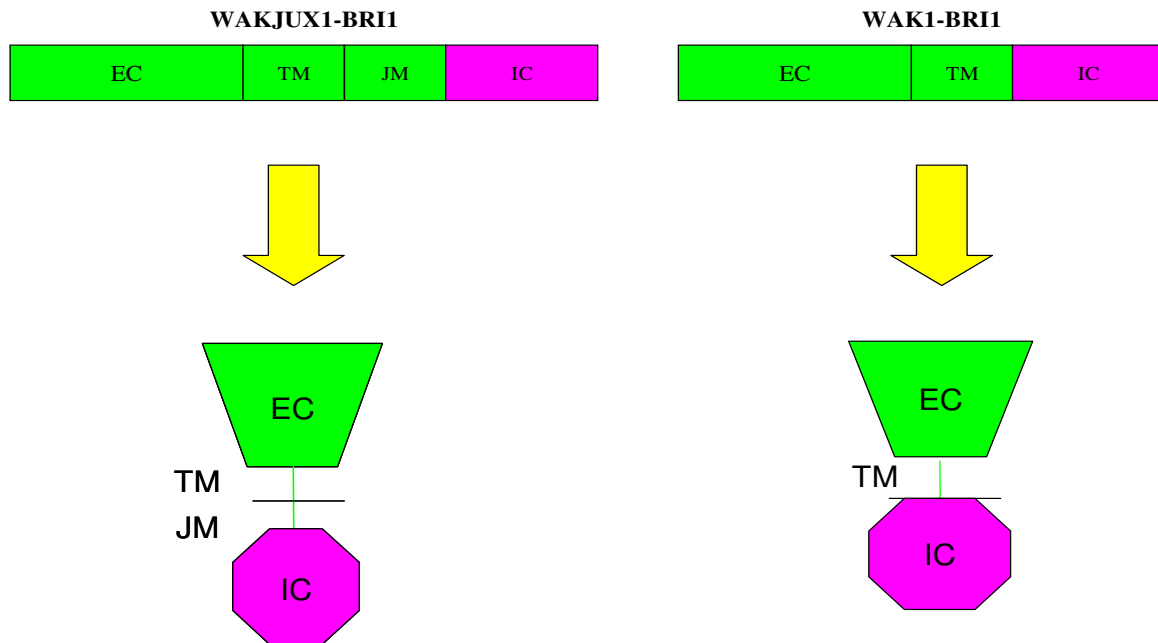


Figure 1: schématisation des 2 récepteurs hybrides utilisés lors de ce travail.

Le récepteur hybride WAKJUX1-BRI1 est composé des domaines extracellulaire, transmembranaire et juxtamembranaire de WAK1 fusionné avec le domaine intracellulaire kinase de BRI1 tandis que le récepteur hybride WAK1-BRI1 est composé des domaines extracellulaire et transmembranaire de WAK1 fusionné avec le domaine intracellulaire kinase de BRI1.

EC = domaine extracellulaire de WAK1 ; TM= domaine transmembranaire de WAK1 ; JM= domaine juxtamembranaire de WAK1 ; IC= domaine intracellulaire kinase de BRI1.

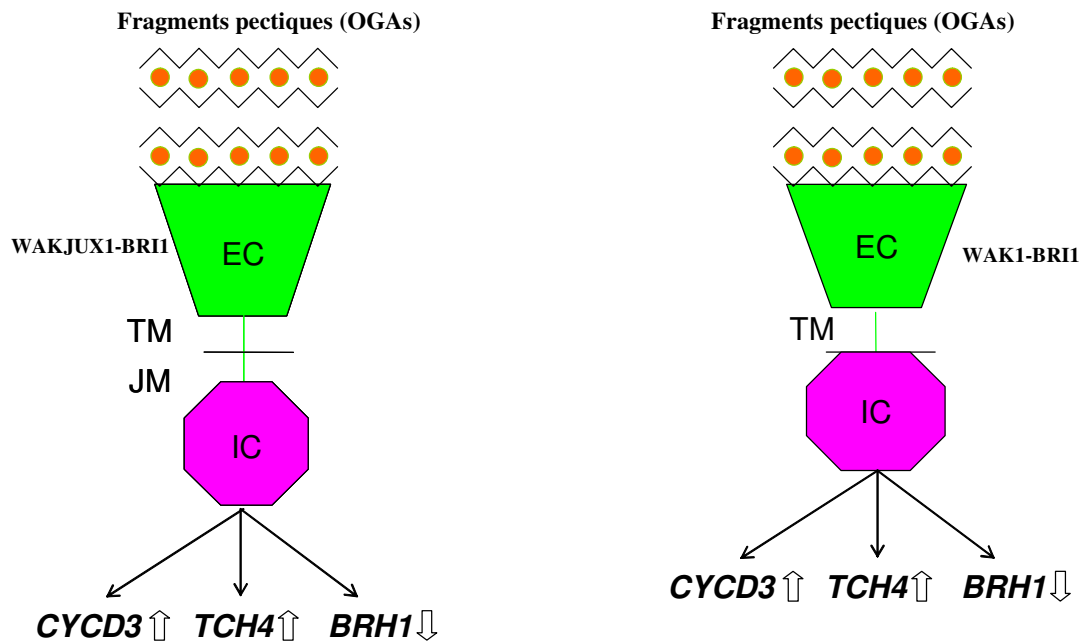


Figure 2: schématisation de l'activation des 2 récepteurs hybrides WAKJUX1-BRI1 et WAK1-BRI1 par des fragments pectiques.

Lors de l'interaction entre le domaine extracellulaire de WAK1 et des fragments pectiques (OGAs ou PGAs) en conformation « egg-box », il y a activation du domaine intracellulaire kinase de BRI1. Cette activation est mesurable en quantifiant le niveau d'expression des gènes cibles de BRI1.

EC = domaine extracellulaire de WAK1 ; TM= domaine transmembranaire de WAK1 ; JM= domaine juxtamembranaire de WAK1 ; IC= domaine intracellulaire kinase de BRI1.

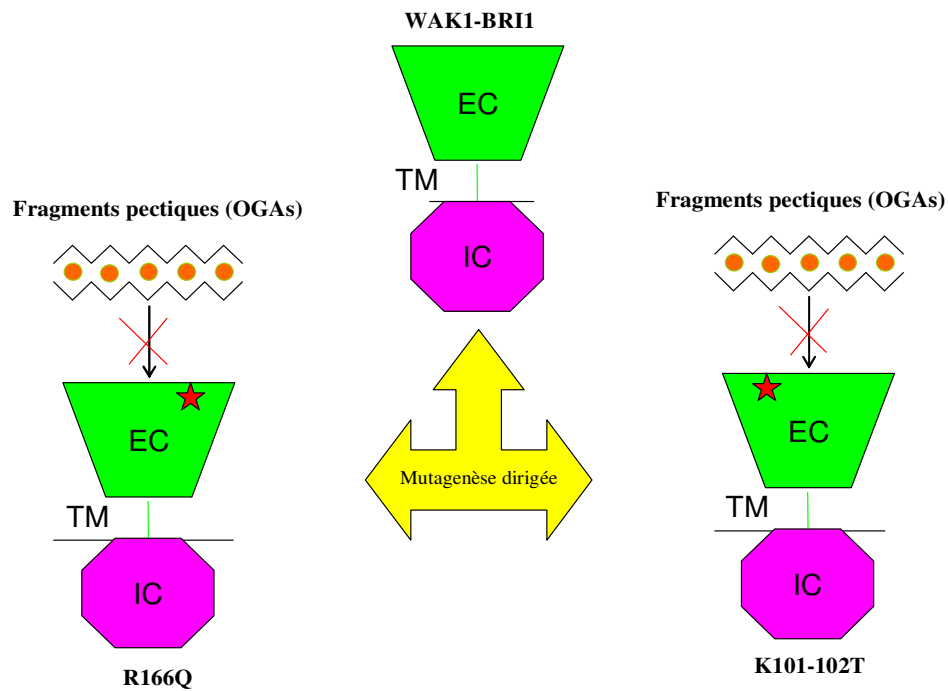


Figure 3: constructions mutées au niveau du domaine extracellulaire du récepteur hybride WAK1-BRI1. La mutation des résidus R166 ou K101-102 permet de bloquer l'interaction entre le domaine extracellulaire de WAK1 et les fragments pectiques en conformation « egg-box ». Aucune transduction du signal ne devrait être enregistrée dans ces 2 constructions mutantes.

EC = domaine extracellulaire de WAK1 ; TM= domaine transmembranaire de WAK1 ; IC= domaine intracellulaire kinase de BRI1.

WAK1	(332)	-FAWTTILLVTTIGFLVILLGVACI
WAK2	(338)	-YKRTRIFLVIIIGVLVILLAAICI
WAK3	(326)	YFRWTQIFLGGTIGFSVIMLGISCI
WAK4	(332)	YVEWTTIVLGGTIGFLVILLAISCI
WAK5	(330)	YLGWTTIVLLGGTIGFLIILLTISYI
Consensus	(351)	YF WTTILLGGTIGFLVILLAISCI
WAK1	(356)	QORMKHLKDTKLREQFFEQNGGGML
WAK2	(362)	QHATKQRRYTKLRRQFFEQNGGGML
WAK3	(351)	QOKTKHRKNTLRLQKFFEQNGGGML
WAK4	(357)	EHKMKNTKDTLRLQQFFEQNGGGML
WAK5	(355)	QOKMRHRKNTLRLQQFFEQNGGGML
Consensus	(376)	QQKMKHRK TELRQQFFEQNGGGML
WAK1	(381)	TQRLSGAGPSNVDVKIFTEDGMKKA
WAK2	(387)	TQRLSGAGLSNIDFKIFTEEGMKEA
WAK3	(376)	TQRLSGAGPSNVDVKIFTEKGMKEA
WAK4	(382)	MQRLSGAGPSNVDVKIFTEEGMKEA
WAK5	(380)	TQRLSGAGPSNVDVKIFTEEGMKEA
Consensus	(401)	TQRLSGAGPSNVDVKIFTEEGMKEA
WAK1	(406)	TNG
WAK2	(412)	TNG
WAK3	(401)	TNG
WAK4	(407)	TDG
WAK5	(405)	TDG
Consensus	(426)	TNG

Figure 4 : alignement des séquences aminées codant pour les domaines transmembranaire et juxtamembranaire des 5 isoformes de WAKs (selon NCBI). Le domaine transmembranaire de WAK1 s'étend du résidu 332 jusqu'au 356 pendant que le domaine juxtamembranaire s'étend du résidu 357 jusqu'au 408. Les résidus 100% conservés sont représentés en jaune ; les résidus bien conservés sont représentés en bleu et les résidus peu conservés sont représentés en vert. Enfin, les résidus représentés en noir sont ceux sélectionnés pour les étapes de mutagenèse dirigée.

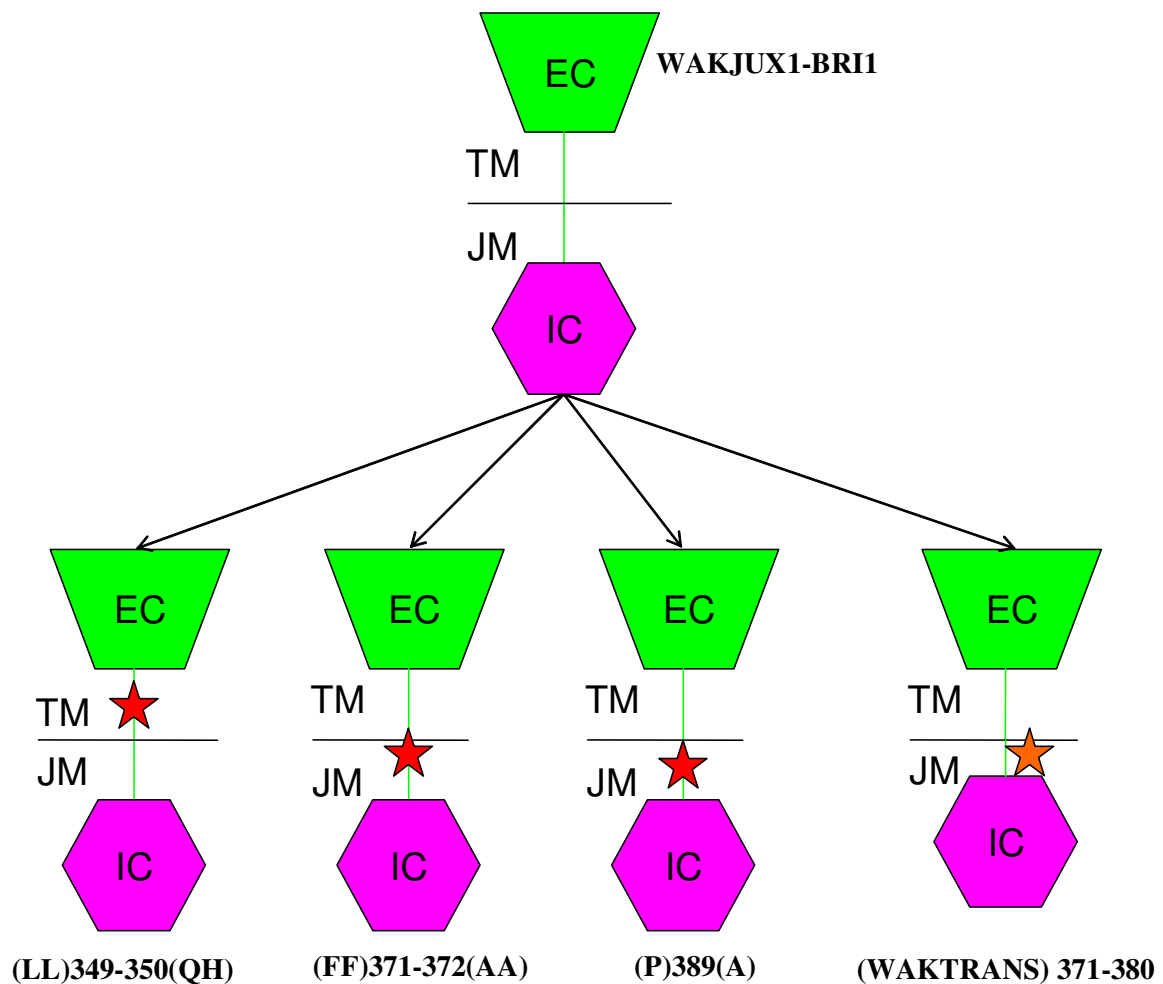


Figure 5: schématisation des 4 constructions mutantes réalisées dans le récepteur hybride WAKJUX1-BRI1. Les mutations sont représentées par une étoile rouge et les délétions par une étoile orange. EC = domaine extracellulaire de WAK1 ; TM= domaine transmembranaire de WAK1 ; JM= domaine juxtamembranaire de WAK1 ; IC= domaine intracellulaire kinase de BRI1.

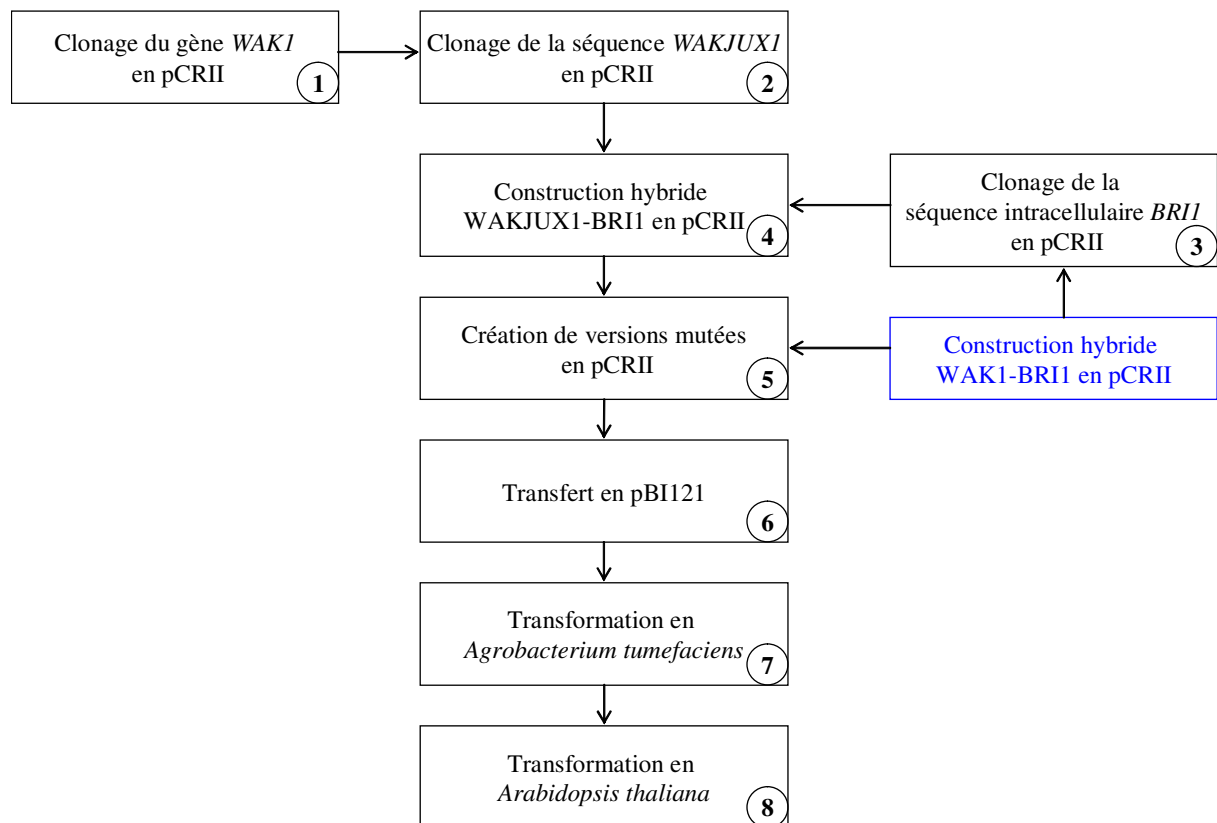


Figure 6 : schéma expérimental.

Les numéros indiquent l'ordre dans lequel les étapes ont été réalisées.
Les étapes non réalisées dans le cadre de ce travail sont représentées en bleu.

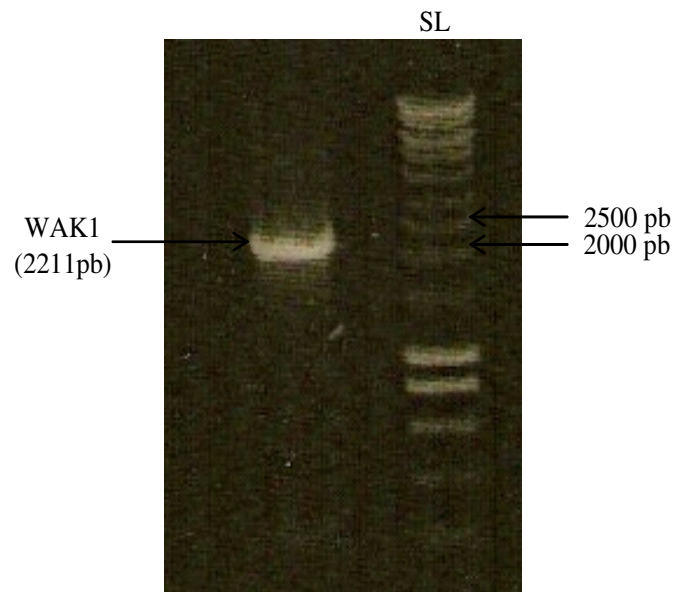


Figure 7: amplification du gène *WAK1* (2211pb) via l'utilisation des amorces Van Wak1g et Van Wak1d.
SL = Smart Ladder.

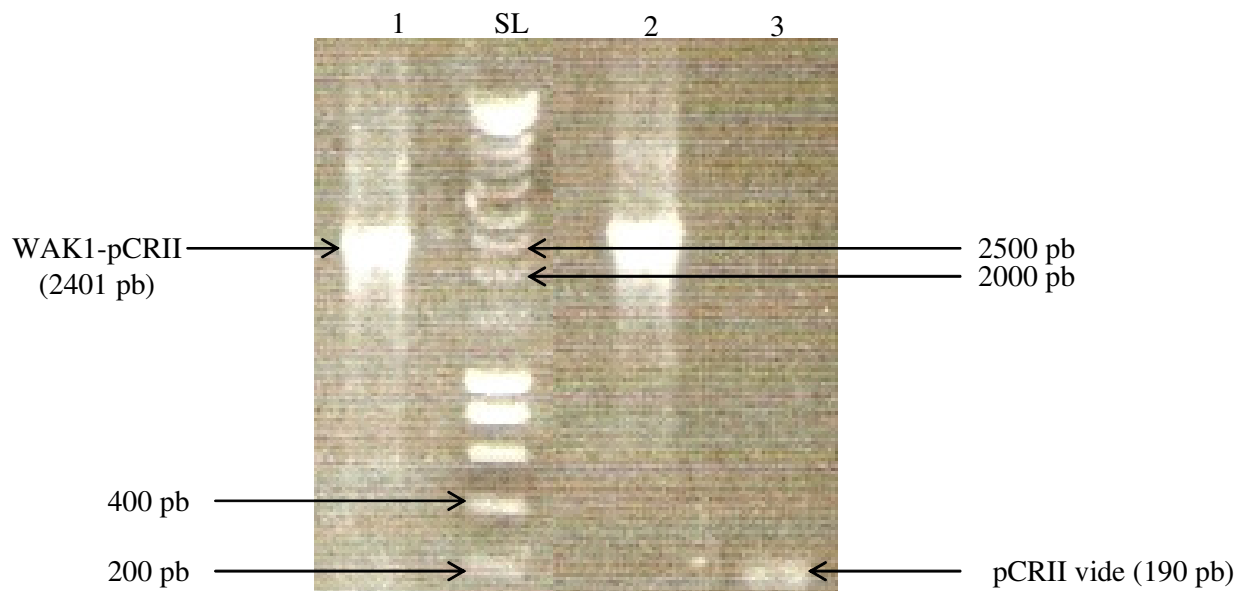


Figure 8: criblage des colonies possédant la construction *WAK1*-pCRII (2401 pb) avec les amorces Reverse et Forward .Les colonies 1 et 2 sont positives.
SL = Smart Ladder.

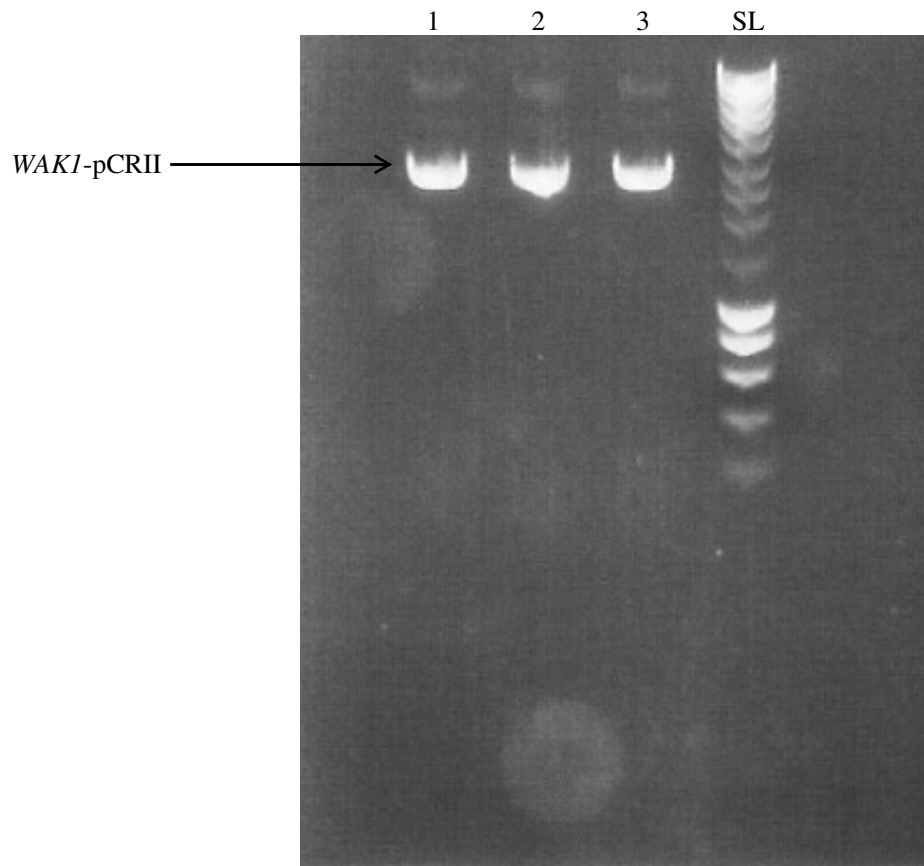


Figure 9: migration sur gel agarose 1% des produits miniprep *WAK1*-pCRII.
SL = Smart Ladder.

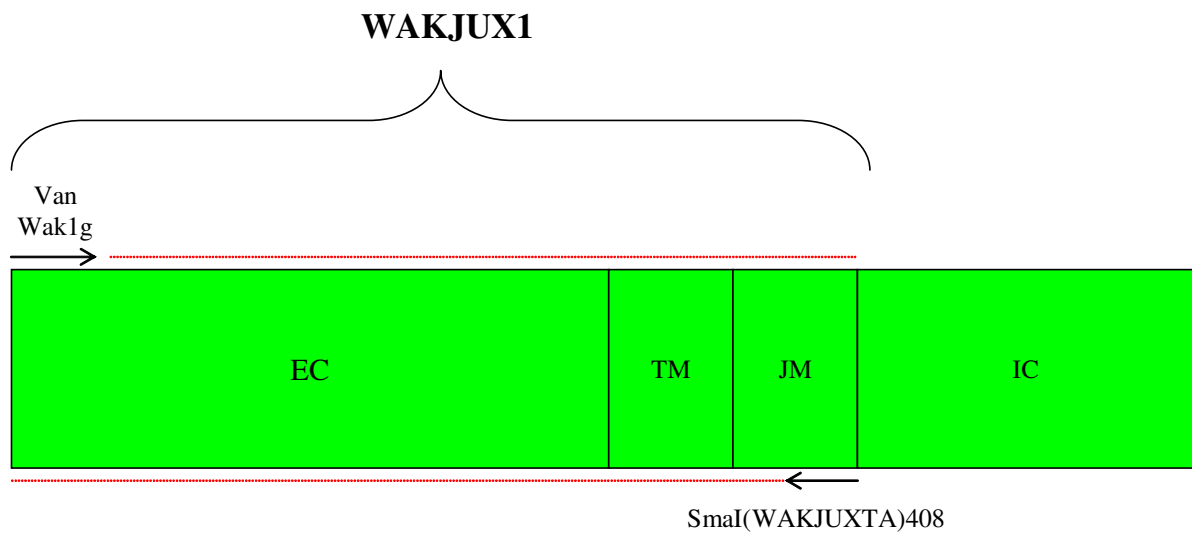


Figure 10: clonage de la séquence *WAKJUX1* à partir de la séquence de *WAK1* grâce aux amorces Van Wak1g et SmaI(WAKJUXTA)408.

EC = domaine extracellulaire de *WAK1* ; TM= domaine transmembranaire de *WAK1* ; JM= domaine juxtamembranaire de *WAK1* ; IC= domaine intracellulaire kinase de *WAK1*.

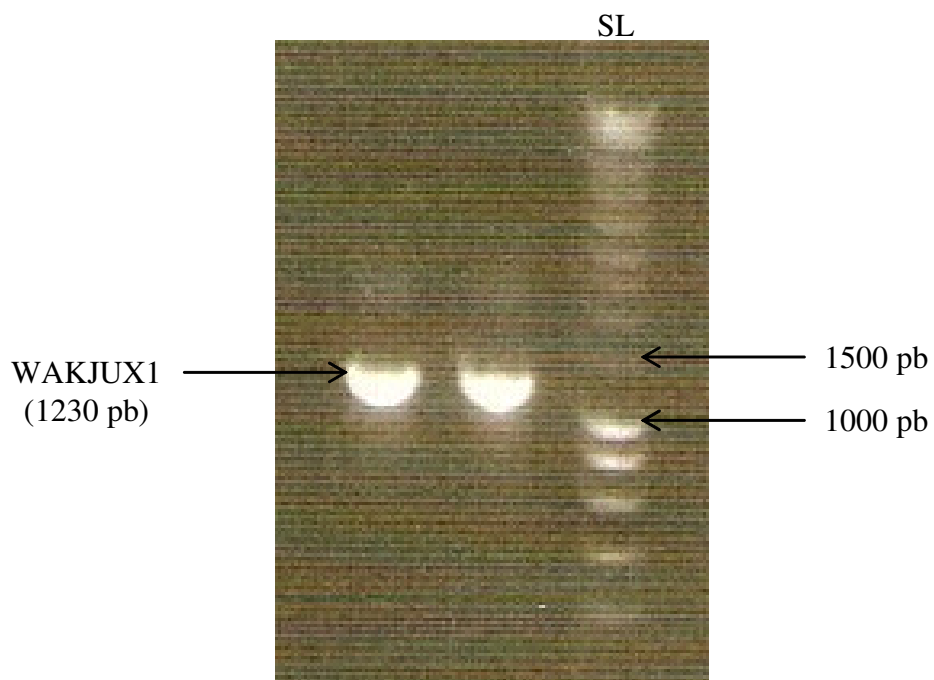


Figure 11: amplification de la séquence *WAKJUX1* (1230 pb) à l'aide des amorces Van Wak1g et SmaI(WAKJUXTA)408.

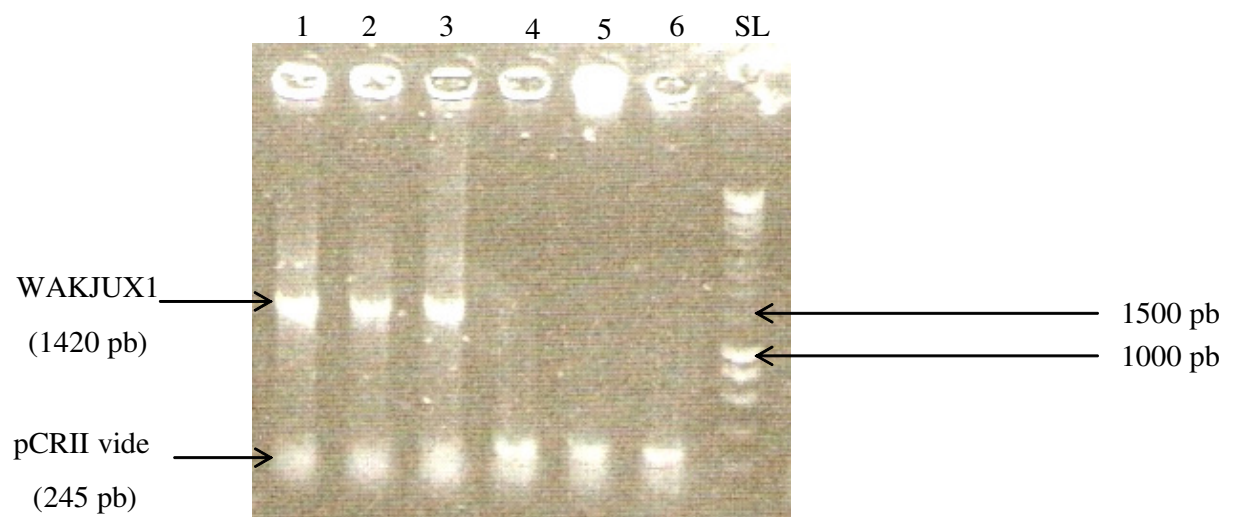


Figure 12: criblage des colonies possédant la construction *WAKJUX1*-pCRII (1420pb) avec les amorces Reverse et Forward. Les colonies 1, 2 et 3 sont positives.

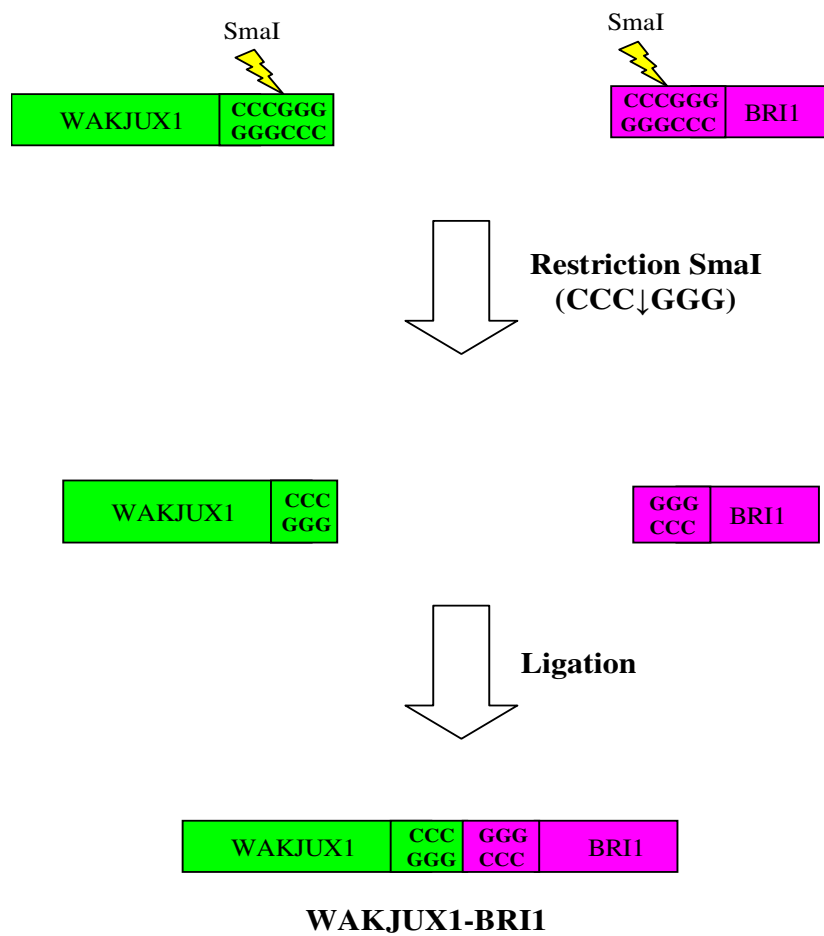


Figure 13: fusion des séquences *WAKJUX1* et *BRI1* grâce au site de restriction *SmaI* présent aux 2 extrémités à liguer.

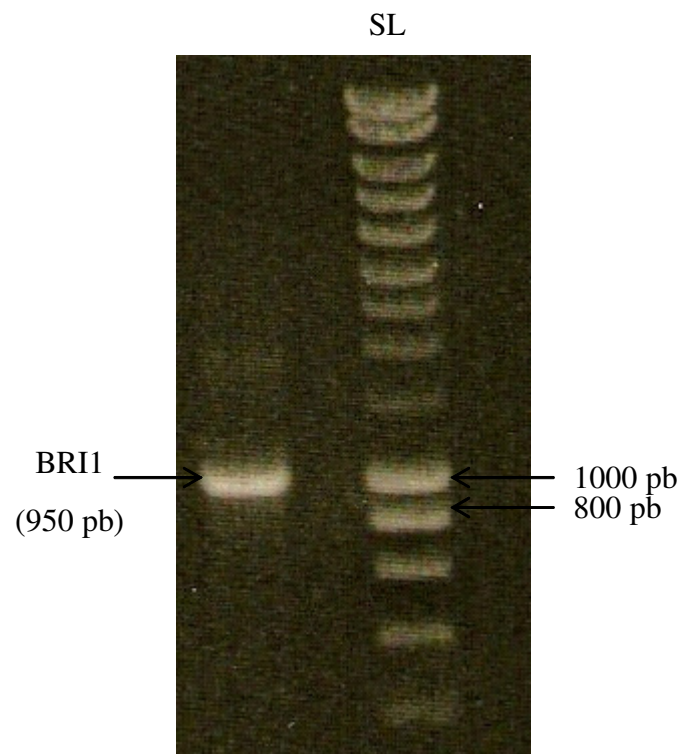


Figure 14: amplification de la séquence intracellulaire kinase de *BRI1* (950 pb) en utilisant les amorce Van Bri1g et Van Bri1d.

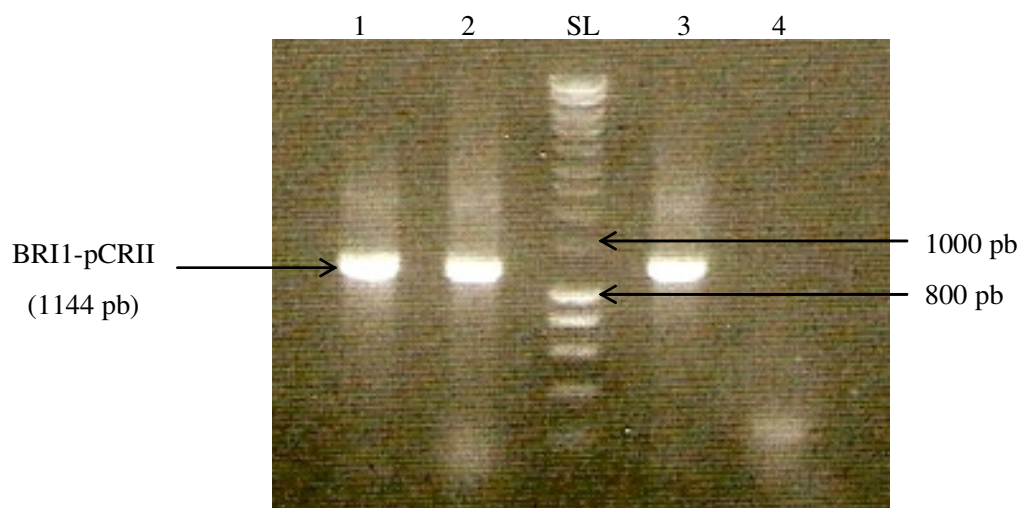


Figure 15: criblage des colonies possédant la construction *BRI1*-pCRII (1144 pb) avec les amorces Reverse et Forward. Les colonies 1, 2 et 3 sont positives.

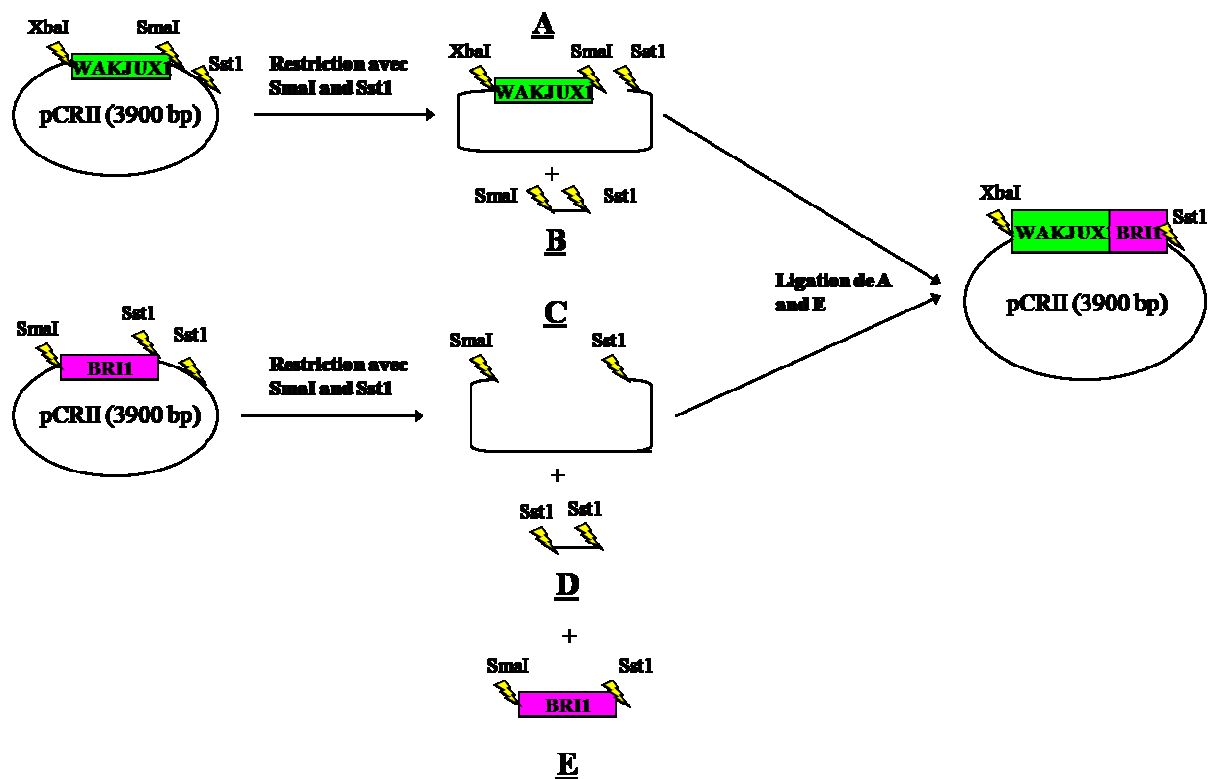


Figure 16: schématisation de la fusion des séquences *WAKJUX1* et *BRI1* permettant la formation de la séquence hybride *WAKJUX1-BRI1*.

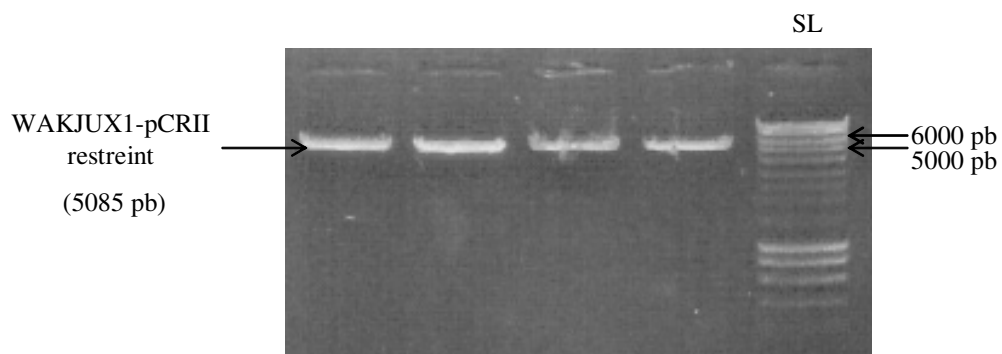


Figure 17: restriction enzymatique avec SmaI et SstI du plasmide *WAKJUX1*-pCRII. La restriction libère 2 fragments : le fragment *WAKJUX1*-pCRII restreint (5085 pb) et un petit fragment non visible du plasmide pCRII (42 pb).

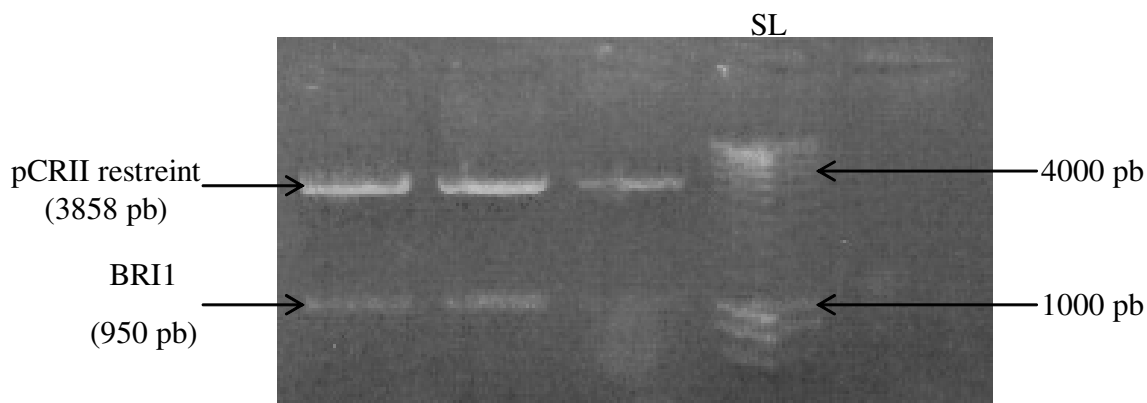


Figure 18: restriction enzymatique avec *Sma*I et *Sst*I du plasmide *BRII*-pCRII.
La restriction libère 3 fragments : le plasmide pCRII restreint (3858 pb), le fragment *BRII* (950 pb) et un petit fragment non visible du plasmide pCRII (42 pb).
SL = Smart Ladder.

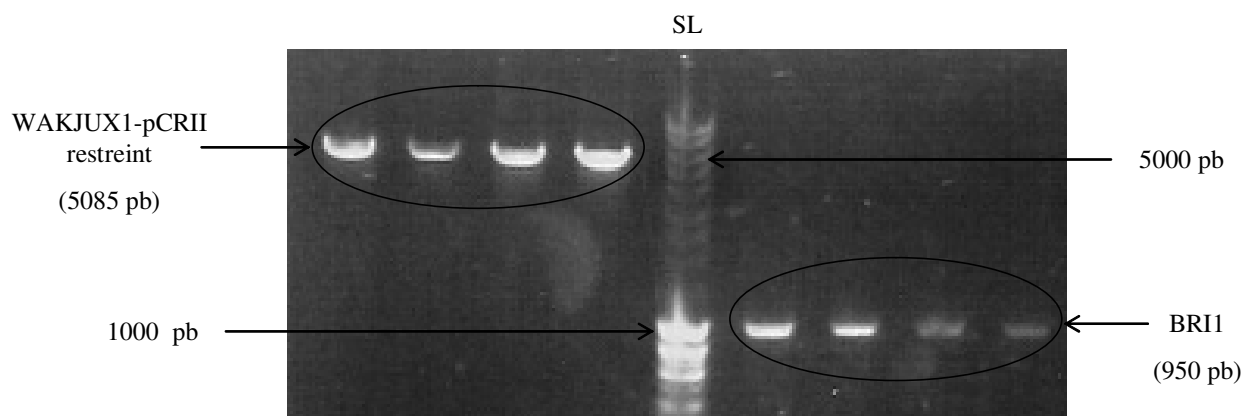


Figure 19: migration sur gel agarose 1% des fragments *WAKJUX1*-pCRII (5085 pb) restreint et *BRII* (950 pb) après purification.
SL = Smart Ladder.

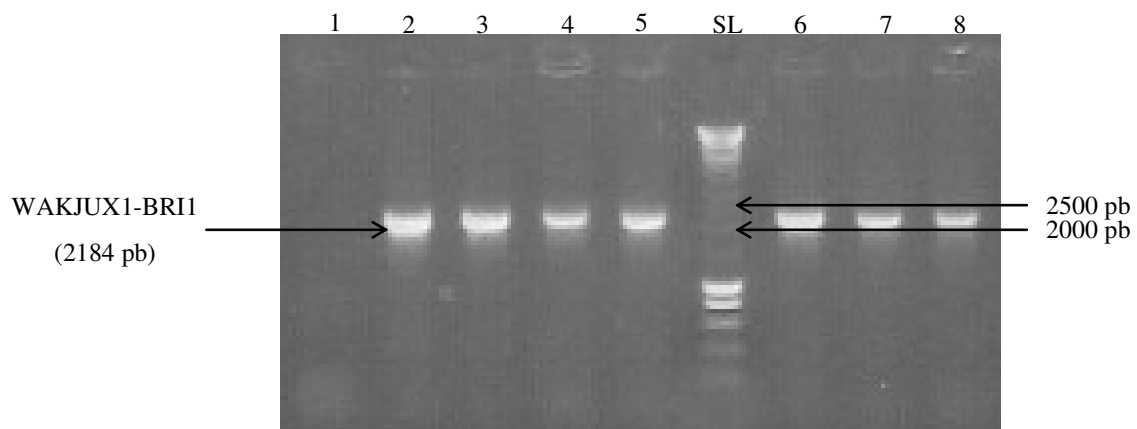


Figure 20 : vérification de la présence de la construction *WAKJUX1BRII*-pCRII (2184 pb) par criblage des colonies avec les amorces Van Wak1g et Van Bri1d. Les clones 2, 3, 4, 5, 6, 7 et 8 sont positifs. SM = Smart Ladder.

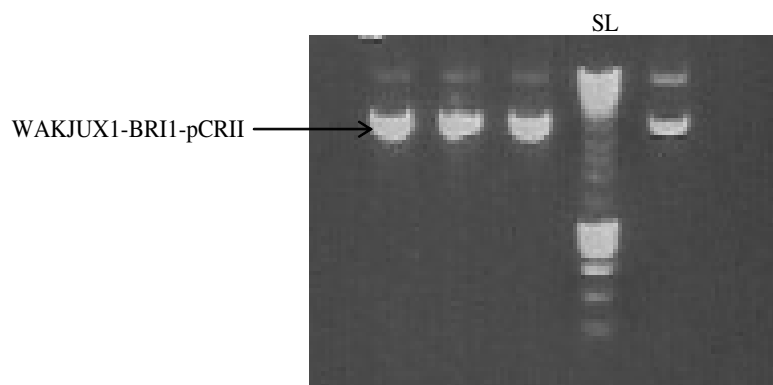


Figure 21 : migration sur gel agarose 1% des produits miniprep *WAKJUX1BRII*-pCRII. SL = Smart Ladder.

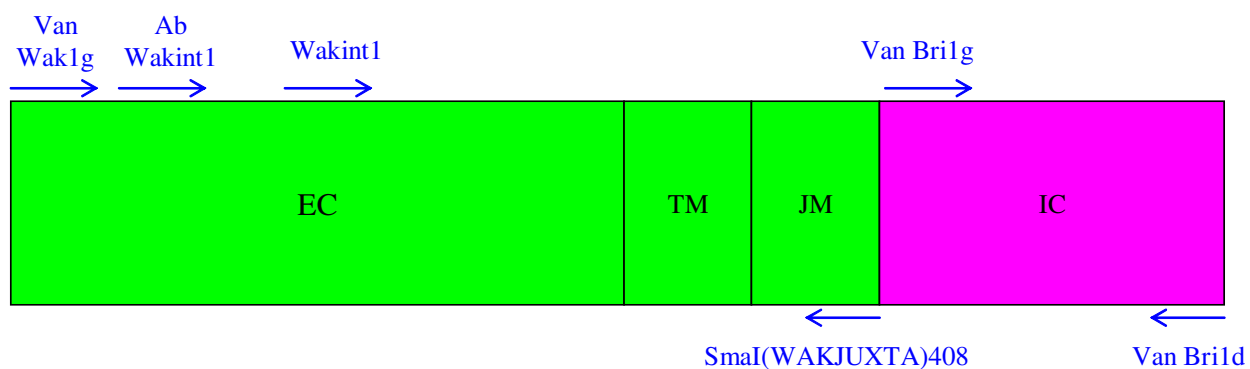


Figure 22 : position des amorces sur la séquence *WAKJUX1-BRI1*.

Les amorces utilisées lors de l'étape de séquençage apparaissent en bleu.

EC = domaine extracellulaire de WAK1 ; TM= domaine transmembranaire de WAK1 ; JM= domaine juxtamembranaire de WAK1 ; IC= domaine intracellulaire kinase de BRI1.

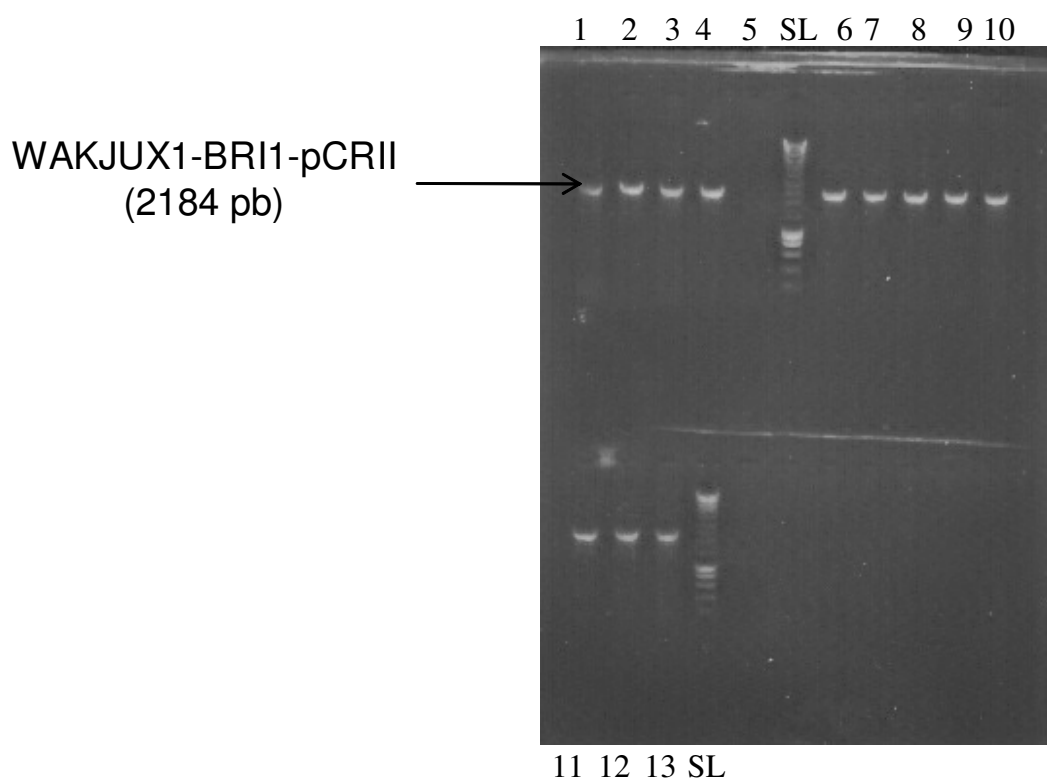


Figure 23 : criblage des colonies possédant la construction *WAKJUX1BRI1*-pCRII (2184 pb) corrigée au niveau de la mutation ponctuelle du domaine extracellulaire avec les amorces Van Wak1g et Van bri1d. Les colonies 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 et 13 sont positives.
SL = Smart Ladder.

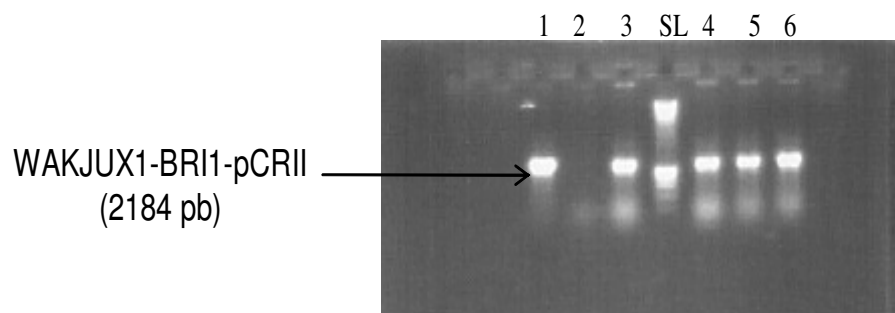


Figure 24 : criblage des colonies possédant la construction *WAKJUX1BRI1*-pCRII (2184 pb) corrigée au niveau de la mutation ponctuelle du domaine juxtamembranaire avec les amorces Van Wak1g et Van bri1d. Les colonies 1, 3, 4, 5 et 6 sont positives.
SL = Smart Ladder.

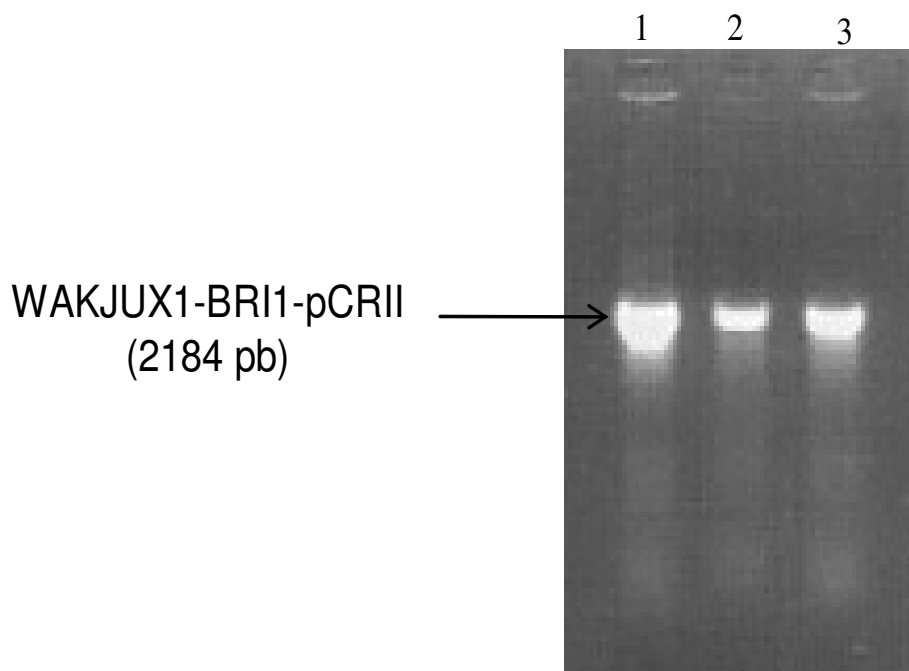


Figure 25 : criblage des colonies possédant la construction *WAKJUX1BRI1*-pCRII (2184 pb) entièrement corrigée avec les amorces Van Wak1g et Van bri1d. Les 3 colonies sont positives.

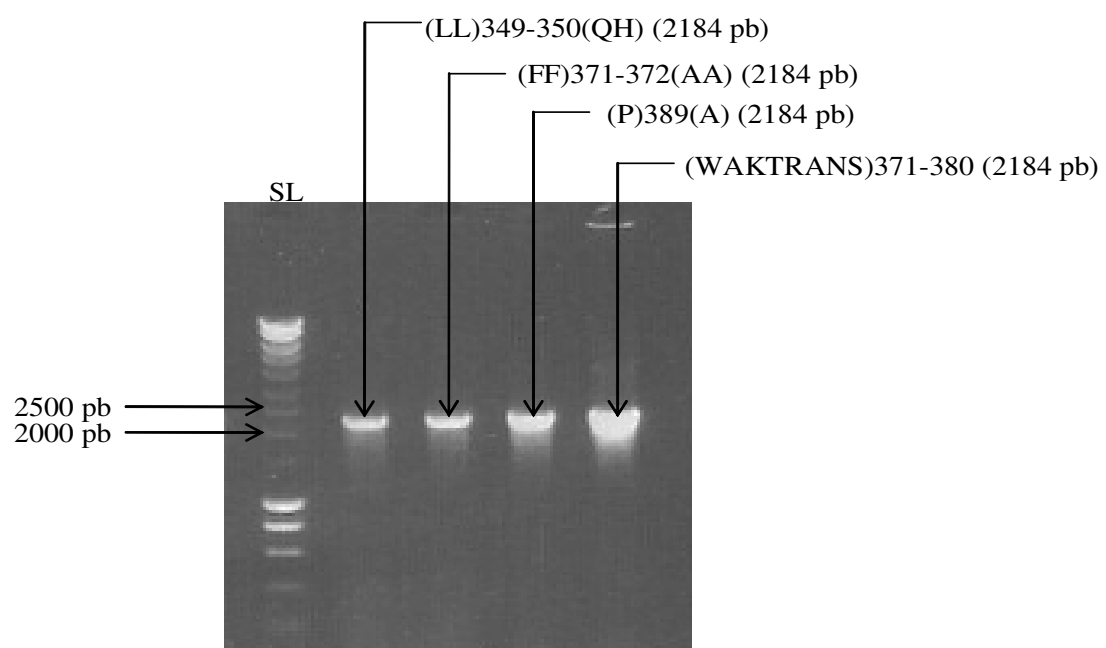


Figure 26 : vérification de l'amplification et de la mutagenèse dirigée des 4 constructions mutantes (2184 pb) en utilisant les amorces Van Wak1g et Van bri1d.
SL = Smart Ladder.

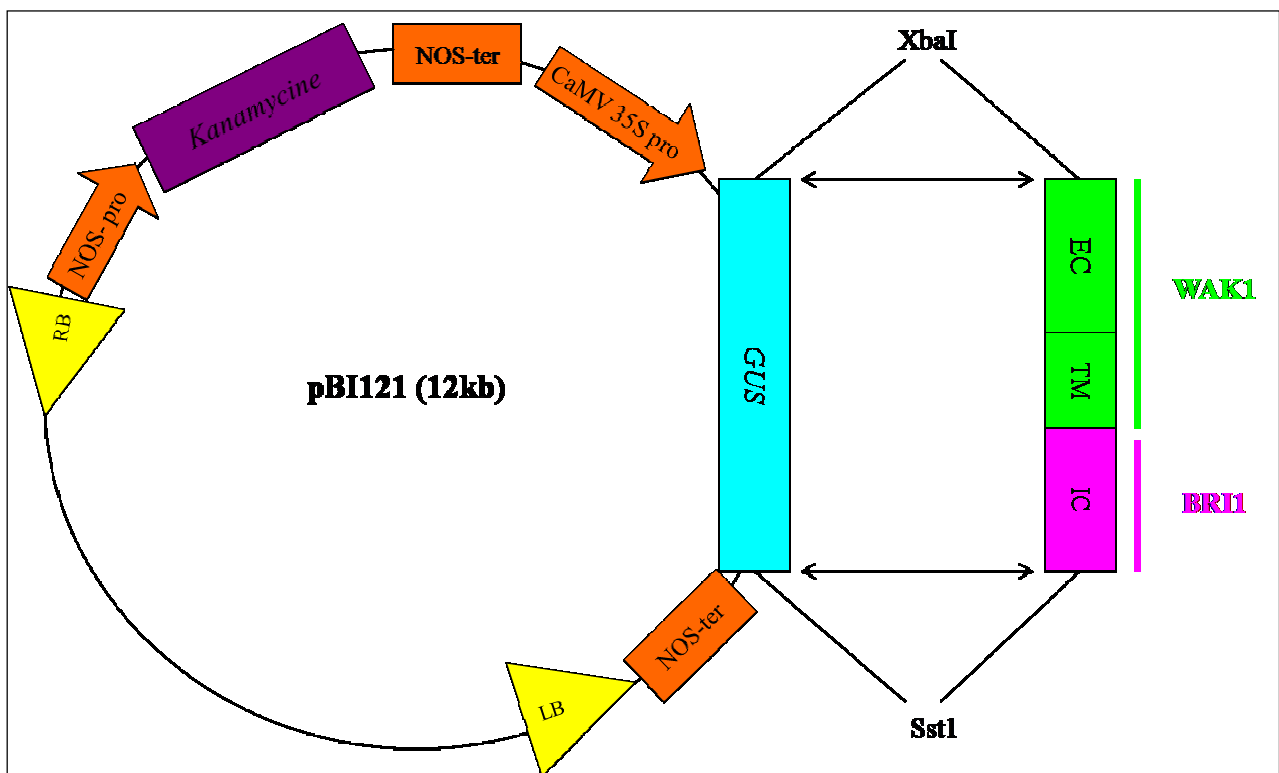


Figure 27 : schématisation de l'insertion de la séquence *WAK1-BRI1* dans le plasmide pBI121. Grâce à la présence des sites de restriction XbaI et SstI situés en amont et en aval de *WAK1-BRI1* et *GUS*, il est possible d'exciser *GUS* et d'y insérer *WAK1-BRI1*.

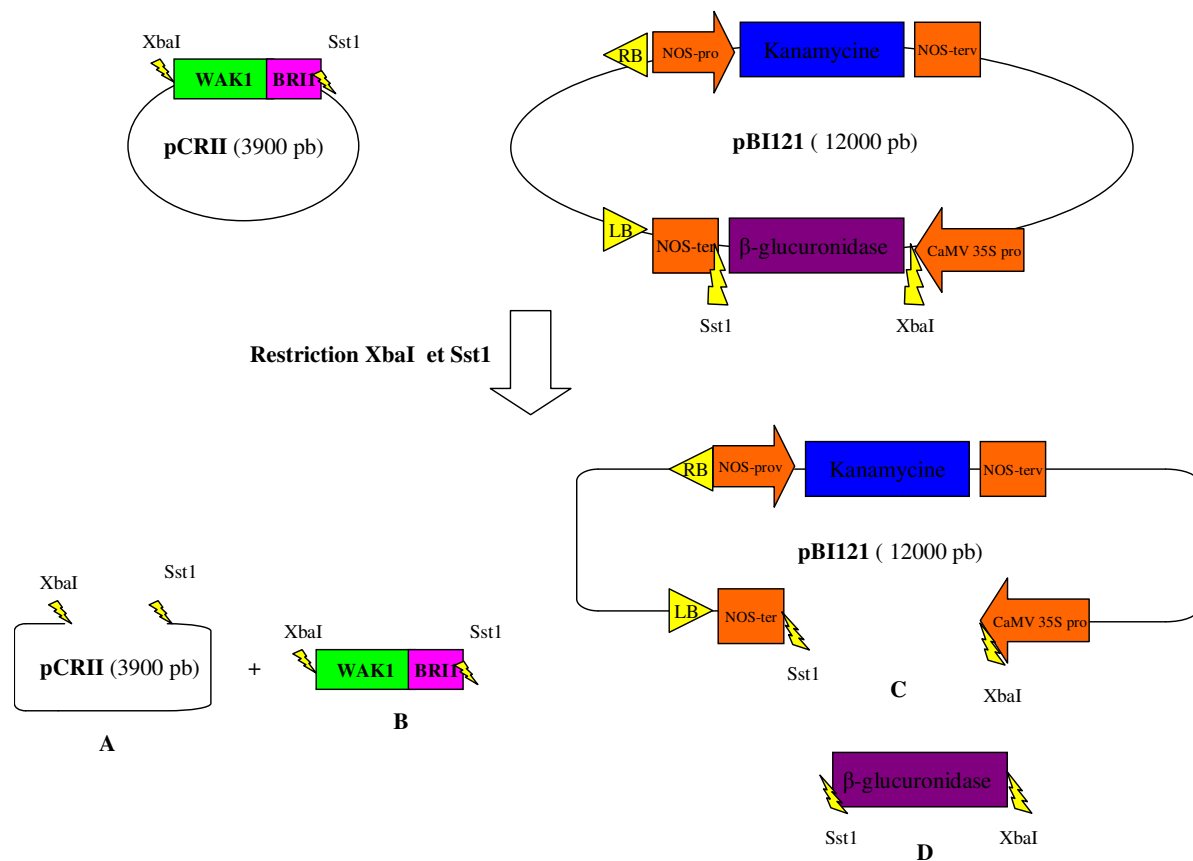


Figure 28 : excision par restriction enzymatique de la séquence *WAK1-BRI1* et du gène *β-glucuronidase* (GUS). Grâce aux sites de restriction *XbaI* et *SstI* ajoutés aux extrémités de la séquence de *WAK1-BRI1*, il est possible de cliver le plasmide pCRII (A) et de récupérer la séquence *WAK1-BRI1* (B). La présence de sites de restriction *XbaI* et *SstI* en amont et en aval du gène *GUS* permet également sa libération (D). Une ligation enzymatique permet ensuite de lier la séquence *WAK1-BRI1* dans le plasmide pBI121.

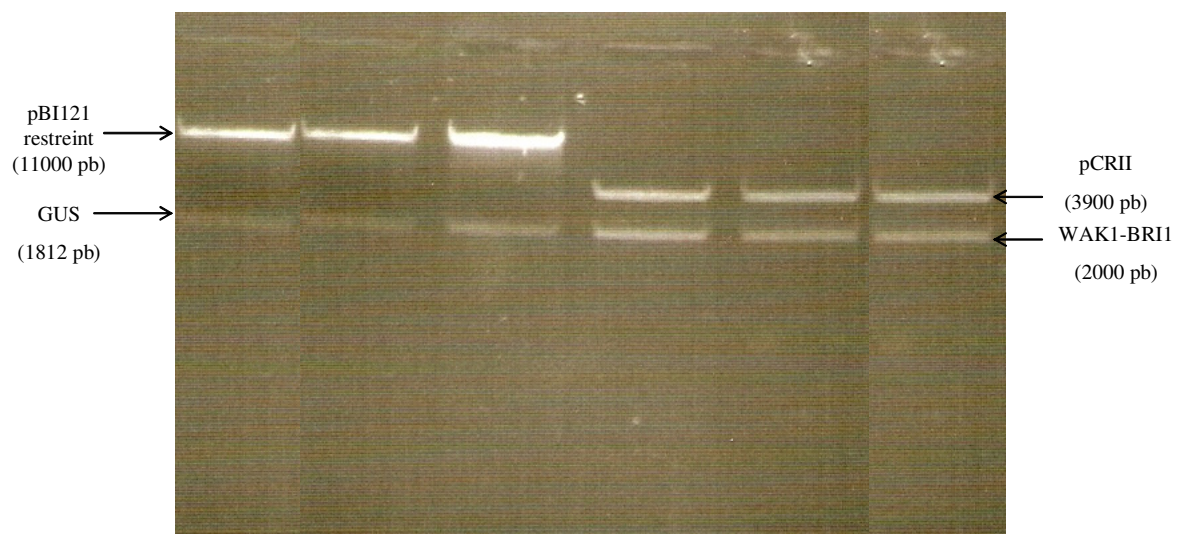


Figure 29 : vérification de l'excision du gène *GUS* et des séquences *WAK1-BRI1* wt et mutées (R166Q et K101-102T) sur gel agarose 1%.

L'excision a été réalisée à l'aide des enzymes de restriction *XbaI* et *SstI*. Quatre fragments d'ADN sont détectables, le plasmide pBI121 restreint (11000 pb), le plasmide pCRII (3900 pb), les constructions *WAK1-BRI1* wt et mutées (2000 pb) et le gène *GUS* (1812 pb).

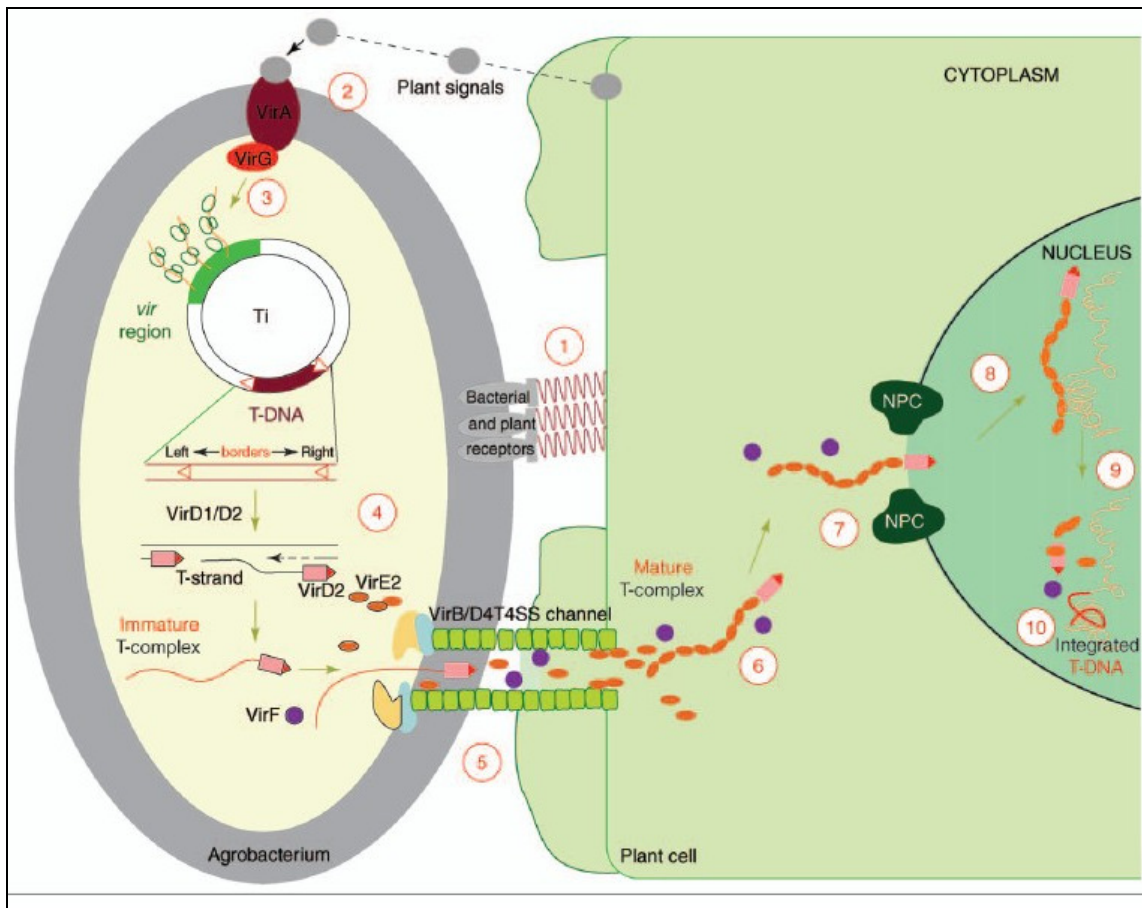


Figure 30 : *Agrobacterium tumefaciens* est une bactérie gram négatif responsable de la galle du collet. Elle possède un plasmide TI (Tumor induce) contenant un T-DNA composé de gènes inducteurs de tumeur et des gènes *vir* (virulence) nécessaire pour l'intégration du T-DNA dans le génome de la plante. Cette région est délimitée par deux répétitions directes de 25 paires de bases appelées bord gauche et bord droit. La bactérie *Agrobacterium tumefaciens* est capable de percevoir des composés phénoliques tels que l'acétosyringone secrétés par les plantes blessées ce qui va permettre l'adhésion de la bactérie au niveau du site blessé (1). Les signaux phénoliques servent de ligands pour le récepteur virA (2), ce qui va déclencher la phosphorylation de la protéine virA. virA va activer la synthèse des autres gènes *vir* présents sur le plasmide TI (3). virD1 et virD2 permettent l'excision du T-DNA en clivant au niveau des bords gauche et droit de la séquence (4). Un manchon de protection est alors formé par les protéines virE2 autour du T-DNA simple brin pour éviter sa dégradation (4). D'autres protéines vir forment un canal entre la bactérie et la cellule végétale, permettant le passage de l'un à l'autre (5). Une fois dans le cytosol de la cellule végétale, le T-DNA est dirigé vers le noyau grâce aux séquences NLS présentes sur les protéines virD2 et virE2 (6 ; 7). Finalement, le T-DNA s'intègre dans le génome de la plante où il pourra y être exprimé (8 ; 9 ; 10).

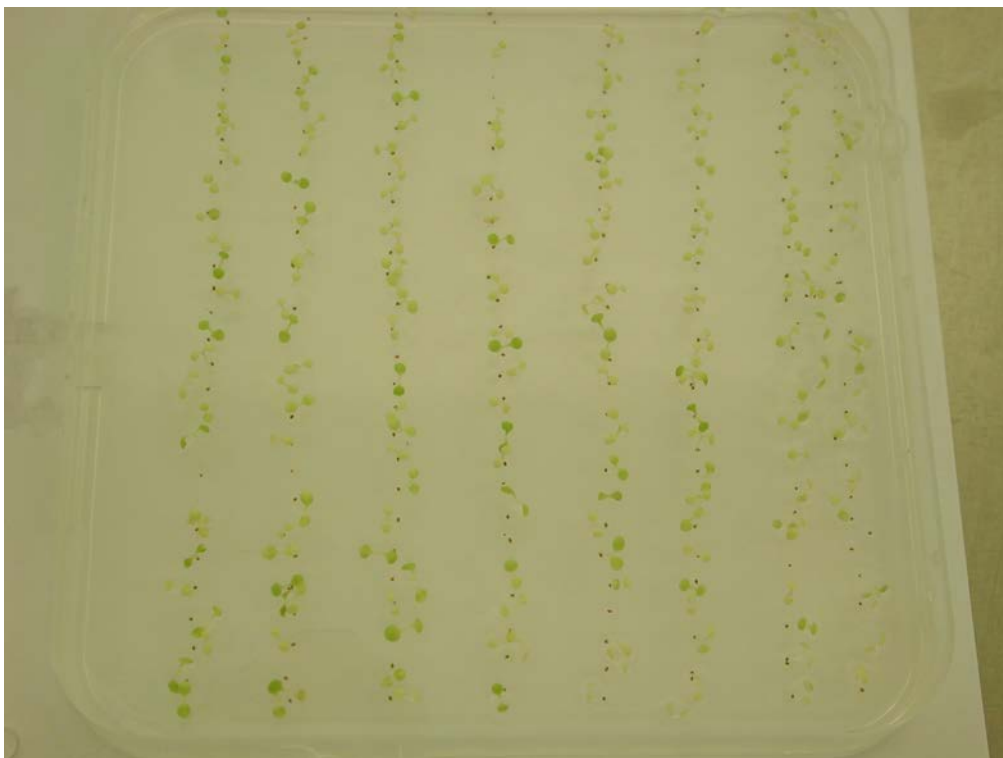


Figure 31 : sélection de graines de plantules d'*Arabidopsis thaliana* transformées sur un milieu contenant 50 ug/ml de Kanamycine.

La germination est induite chez toutes les graines et c'est au bout d'une dizaine de jours que les plantules non-transformées commencent à mourir. Les quelques plantules restées vertes seront criblées pour voir si il s'agit de transformants.

D. Conclusion et perspectives :

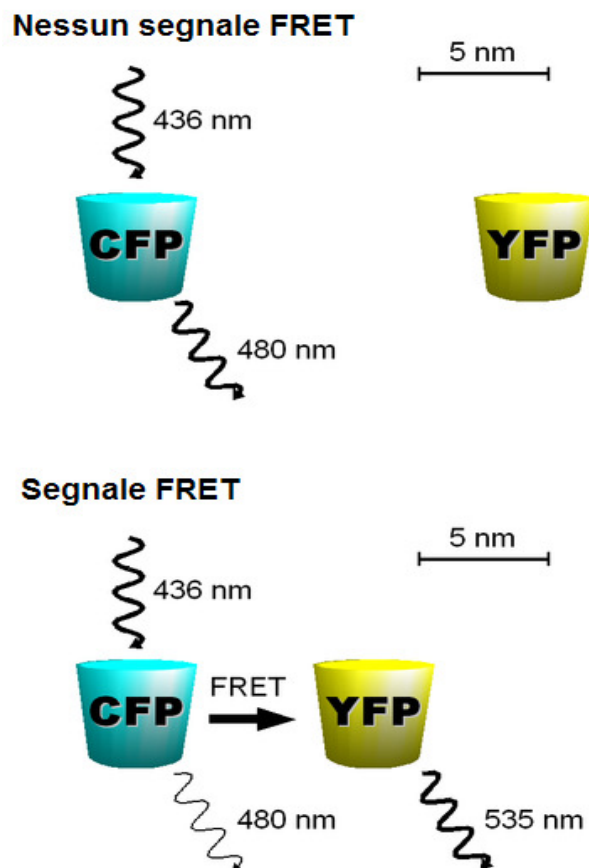


Figure 1 : méthode de fonctionnement du FRET.

Deux protéines différentes sont couplées à deux fluorochromes différents.

Dans le cas où il y a pas d'interaction entre les 2 protéines, une excitation à une λ de 436 nm de la protéine CFP permet une réémission fluorescente dans le cyan (480 nm). Si il y a interaction entre les 2 protéines, une excitation à une λ de 436 nm de la protéine CFP va donner lieu à une réémission fluorescente dans le jaune (535 nm) et ce à cause du transfert d'énergie entre le fluorochrome accepteur (CFP) et le fluorochrome récepteur (YFP).

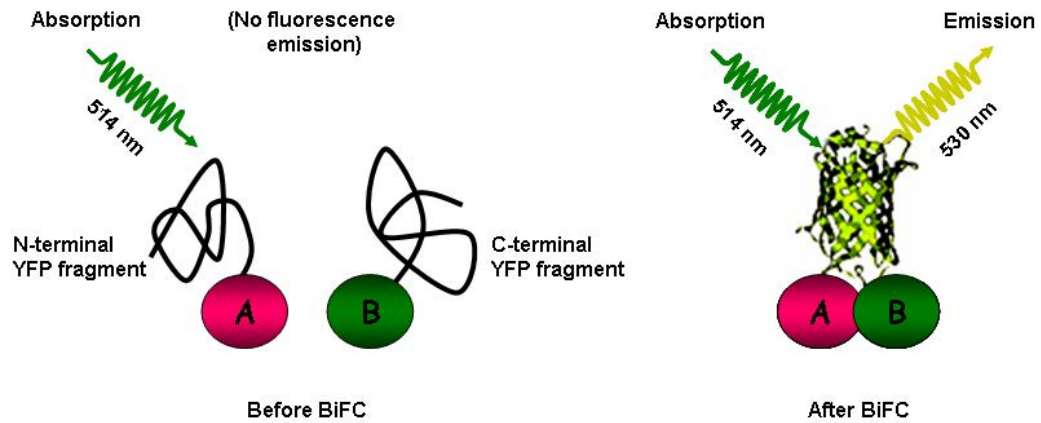


Figure 2 : méthode de fonctionnement du BiFC.

La protéine YFP est divisée en 2 fragments qui sont soit associés à la protéine A soit à la protéine B. Si il y a interaction entre les 2 protéines, la protéine YFP est reconstituée et est capable, en présence d'une λ d'excitation adéquate, de produire une émission de fluorescence de couleur jaune.

ATGAAGGTGCAGGAGGGTTTGGTCTTGGTGGCTATTTTCTTCTCCCTTGCGTGTACGCAGCT
 GGTGAAGGGGCAACATCAACCTGGTGAGAATTGCCAAAATAAATGTGGCAACATCACAATAG
 AGTACCCTTTTGGCATTCTTTCAGGTTGTTACTATCCCGGAAATGAAAGTTTCAGTATCACC
 TGTAAGGAAGATAGGCCACATGTCCTAAGCGACATTGAAGTGGCAAACCTTTAATCACAGCGG
 CCAGCTACAAGTTCTGCTTAATCGATCCTCTACTTGCTACGACGAGCAAGGAAAAAACTG
 AGGAGGACAGTTCTTTTACACTGGAAAATTTATCTCTTTCCGCCAACAACAAGTTAACTGCA
 GTAGGCTGTAACGCTTTTACTACTTCTGGACACTTTTGGAAATGCAAACTACTCAACTGCATG
 CTTGTCAATTATGCGATTCTCCCCCAGAGGCTGATGGAGAATGTAATGGTAGAGGTTGCTGCA
 GAGTCGACGTTTCTGCCCGTTGGATAGCTATACATTGCAAACTACATCAGGTCGCATCAAG
 CACATGACTTCTTTTACGACTTTAGTCCTTGACCTACGCTTTTCTCGTTGAAGATGATAA
 GTTCAACTTCAGTTCTACAGAAGATCTTCTGAATCTGCGAAATGTCATGAGGTTCCCTGTGT
 TACTAGATTGGTCTGTTGGAAATCAGACATGCGAGCAAGTTGGAAGCACAAGCATATGCGGT
 GGGAACAGCACTTGTCTCGATTCTACTCCTAGAAACGGGTATATCTGCAGATGCAATGAAG
 CTTTGATGGGAATCCATACCTTTCAGCTGGTTGCCAAGACGTCAATGAGTGTACTACTAGTA
 GTACTATCCATAGACATAACTGTTTCGGATCCCAAACCTGTAGAAACAAGGTTGGAGGCTTC
 TATTGTAAGTGTCAATCTGGTTACCGCTTAGATACCACCCTATGAGCTGCAAGCGTAAAGA
 GTTTGCATGGACTACAATTCTTCTTGTAAACCACCATCGGCTTCTTGGTCAATTCTGCTTGGCG
 TTGCCTGTATACAACAGAGAATGAAGCACCTGAAGGACACCAAGCTCCGAGAACAA^{CCCGGG}
 CATAATGATAGTCTGATTGGTTCTGGTGGGTTTGGAGATGTTTACAAAGCGATTTTGAAAGA
 TGGAAGCGCGGTGGCTATCAAGAACTGATTCATGTTAGCGGTCAAGGTGATAGAGAGTTCA
 TGGCGGAGATGGAAACCATTGGGAAGATCAAACATCGAAATCTTGTGCCTCTTCTTGGTTAT
 TGCAAAGTTGGAGACGAGCGGCTTCTTGTGTATGAGTTTATGAAGTATGGAAGTTTAGAAGA
 TGTTTTGCACGACCCCAAGAAAGCTGGGGTGAACTAACTGGTCCACACGGCGGAAGATTG
 CGATAGGATCAGCTAGAGGGCTTGCTTTCCTTCACCACAACCTGCAGTCCGCATATCATCCAC
 AGAGACATGAAATCCAGTAATGTGTTGCTTGATGAGAATTTGGAAGCTCGGGTTTCAGATTT
 TGGCATGGCGAGGCTGATGAGTGGATACGCATTTAAGCGTCAGTACATTAGCTGGTA
 CACCGGGTTACGTTTCTCCAGAGTATTACCAAAGTTTCAGGTGTTCAACAAAAGGAGACGTT
 TATAGTTACGGTGTGGTCTTACTCGAGCTACTCACGGGTAAACGGCCAACGGATTCACCGGA
 TTTTGGAGATAACAACCTTGTGGATGGGTGAAACAGCACGCAAACTGCGGATTAGCGATG
 TGTTTGACCCCGAGCTTATGAAGGAAGATCCAGCATTAGAGATCGAACTTTTACAACATTTA
 AAAGTTGCGGTTGCGTGTTTGGATGATCGGGCTTGGAGACGACCGACAATGGTACAAGTCAT
 GGCCATGTTTAAGGAGATACAAGCCGGGTCAGGGATAGATTCACAGTCAACGATCAGATCAA
 TAGAGGATGGAGGGTTCAGTACAATAGAGATGGTTGATATGAGTATAAAAGAAGTTCCTGAA
 GGAAAATTATGA

Figure B: séquence nucléotidique du récepteur WAK1-BRI1.

Les domaines extracellulaire et transmembranaire de WAK1 sont représentés en vert et en jaune tandis que le domaine intracellulaire kinase de BRI1 est représenté en rose.

La fusion des domaines de WAK1 et BRI1a été réalisé grâce à l'ajout aux extrémités des 2 séquences du site de restriction SmaI (CCC↓GGG) représenté en rouge.

ATAATGATAGTCTGATTGGTTCTGGTGGGTTTGGAGATGTTTACAAAGCGATTTTGAAAGAT
GGAAGCGCGGTGGCTATCAAGAACTGATTCATGTTAGCGGTCAAGGTGATAGAGAGTTCAT
GGCGGAGATGGAAACCATTTGGGAAGATCAAACATCGAAATCTTGTGCCTCTTCTTGGTTATT
GCAAAGTTGGAGACGAGCGGCTTCTTGTGTATGAGTTTATGAAGTATGGAAGTTTAGAAGAT
GTTTTGCACGACCCCAAGAAAGCTGGGGTGAACTAACTGGTCCACACGGCGGAAGATTGC
GATAGGATCAGCTAGAGGGCTTGCTTTCCTTCACCACAACCTGCAGTCCGCATATCATCCACA
GAGACATGAAATCCAGTAATGTGTTGCTTGATGAGAATTTGGAAGCTCGGGTTTCAGATTTT
GGCATGGCGAGGCTGATGAGTGCGATGGATACGCATTTAAGCGTCAGTACATTAGCTGGTAC
ACCGGGTTACGTTTCTCCAGAGTATTACCAAAGTTTCAGGTGTTCAACAAAAGGAGACGTTT
ATAGTTACGGTGTGGTCTTACTCGAGCTACTCACGGGTAAACGGCCAACGGATTACCGGAT
TTTGGAGATAACAACCTTGTGGATGGGTGAAACAGCACGCAAACTGCGGATTAGCGATGT
GTTTGACCCCGAGCTTATGAAGGAAGATCCAGCATTAGAGATCGAACTTTTACAACATTTAA
AAGTTGCGGTTGCGTGTTTGGATGATCGGGCTTGGAGACGACCGACAATGGTACAAGTCATG
GCCATGTTTAAGGAGATACAAGCCGGGTCAGGGATAGATTACAGTCAACGATCAGATCAAT
AGAGGATGGAGGGTTCAGTACAATAGAGATGGTTGATATGAGTATAAAAGAAGTTCCTGAAG
GAAAATTATGA

Figure C : séquence nucléotidique du domaine intracellulaire kinase de BRI1.

TCTAGAATGAAGGTGCAGGAGGGTTTGTTCCTGGTGGCTATTTTCTTCTCCCTTGCGTGTAC
GCAGCTGGTGAAGGGGCAACATCAACCTGGTGAGAATTGCCAAAATAAATGTGGCAACATCA
CAATAGAGTACCCTTTTGGCATTCTTCAGGTGTTACTATCCCGGAAATGAAAGTTTCAGT
ATCACCTGTAAGGAAGATAGGCCACATGTCTTAAGCGACATTGAAGTGGCAAACCTTTAATCA
CAGCGGCCAGCTACAAGTTCTGCTTAATCGATCCTCTACTTGCTACGACGAGCAAGGAAAAA
AAACTGAGGAGGACAGTTCTTTTACACTGGAAAATTTATCTCTTTCCGCCAACACAAGTTA
ACTGCAGTAGGCTGTAACGCTTTATCACTTCTGGACACTTTTGGAATGCAAACTACTCAAC
TGCATGCTTGTTCATTATGCGATTCTCCCCCAGAGGCTGATGGAGAATGTAATGGTAGAGGTT
GCTGCAGAGTCGACGTTTCTGCCCCGTTGGATAGCTATACATTCGAAACTACATCAGGTGCG
ATCAAGCACATGACTTCTTTTACGACTTTAGTCCTTGACCTACGCTTTTCTCGTTGAAGA
TGATAAGTTCAACTTCAGTTCTACAGAAGATCTTCTGAATC**TGC**GAAATGTCATGAGGTTCC
CTGTGTTACTAGATTGGTCTGTTGGAAATCAGACATGCGAGCAAGTTGGAAGCACAAAGCATA
TGCGGTGGGAACAGCACTTGTCTCGATTCTACTCCTAGAAACGGGTATATCTGCAGATGCAA
TGAAGGCTTTGATGGGAATCCATACCTTTAGCTGGTTGCCAAGACGTCAATGAGTGTACTA
CTAGTAGTACTATCCATAGACATAACTGTTCCGATCCCAAAACCTGTAGAAACAAGTTGGA
GGCTTCTATTGTAAGTGTCAATCTGGTTACCGCTTAGATAACCACCACTATGAGCTGCAAGCG
TAAAGAGTTTGCATGGACTACAATTCTTCTTGTAACCACCATCGGCTTCTTGGTCATTCTGC
TTGGCGTTGCCTGTATACAACAGAGAATGAAGCACCTGAAGGACACCAAGCTCCGAGAACAA
TTCTTCGAGCAAAATGGTGGCGGCATGTTGACACAACGACTCTCAGGAGCAGGGCCGTCAAA
TGTTGATGTCAAAATCTTTACTGAGGATGGC**ATG**AAGAAAGCAACAAATGGTCCCGGGCATA
ATGATAGTCTGATTGGTTCTGGTGGGTTTGGAGATGTTTACAAAGCGATTTTGAAAGATGGA
AGCGCGGTGGCTATCAAGAACTGATTCATGTTAGCGGTCAAGGTGATAGAGAGTTCATGGC
GGAGATGGAAACCATTGGGAAGATCAAACATCGAAATCTTGTGCCTCTTCTTGGTTATTGCA
AAGTTGGAGACGAGCGGCTTCTTGTGTATGAGTTTATGAAGTATGGAAGTTTAGAAGATGTT
TTGCACGACCCCAAGAAAGCTGGGGTGAACTAACTGGTCCACACGGCGGAAGATTGCGAT
AGGATCAGCTAGAGGGCTTGCTTTCCTTCACCACAACCTGCAGTCCGCATATCATCCACAGAG
ACATGAAATCCAGTAATGTGTTGCTTGATGAGAATTTGGAAGCTCGGGTTTCAGATTTTGGC
ATGGCGAGGCTGATGAGTGCGATGGATACGCATTTAAGCGTCAGTACATTAGCTGGTACACC
GGGTTACGTTCCCTCCAGAGTATTACCAAAGTTTCAGGTGTTCAACAAAAGGAGACGTTTATA
GTTACGGTGTGGTCTTACTCGAGCTACTCACGGGTAAACGGCCAACGGATTACCGGATTTT
GGAGATAACAACCTTGTGGATGGGTGAAACAGCACGCAAACTGCGGATTAGCGATGTGTT
TGACCCCGAGCTTATGAAGGAAGATCCAGCATTAGAGATCGAACTTTTACAACATTTAAAAG
TTGCGGTTGCGTGT**GAT**GATCGGGCTTGGAGACGACCGACAATGGTACAAGTCATGGCC
ATGTTTAAAGGAGATACAAGCCGGGTCAGGGATAGATTACAGTCAACGATCAGATCAATAGA
GGATGGAGGGTTCAGTACAATAGAGATGGTTGATATGAGTATAAAAGAAGTTCCTGAAGGAA
AATTATGAGAGCTC

Figure D : séquence nucléotidique du récepteur hybride WAKJUX1-BRI1.
Les nucléotides de couleur rouge représentent les 3 mutations ponctuelles.

