



**HAL**  
open science

# Caractérisation de l'interaction entre PHYL1OY, une protéine effectrice de bactérie phytoplasme et des facteurs de transcription MADS floraux.

Antonin Galien

► **To cite this version:**

Antonin Galien. Caractérisation de l'interaction entre PHYL1OY, une protéine effectrice de bactérie phytoplasme et des facteurs de transcription MADS floraux.. Biologie végétale. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2022. Français. NNT : 2022GRALV015 . tel-04014954

**HAL Id: tel-04014954**

**<https://theses.hal.science/tel-04014954v1>**

Submitted on 5 Mar 2023

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

## THÈSE

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES**

Spécialité : **Biologie végétale**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

**Antonin GALIEN**

Thèse dirigée par **Véronique HUGOUVIEUX** et **Chloé ZUBIETA**

Préparée au sein du **Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Végétale**

Dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

# Caractérisation de l'interaction entre PHYL1<sub>OR</sub>, une protéine effectrice de bactérie phytoplasme et des facteurs de transcription MADS floraux.

Thèse soutenue publiquement le 04 mars 2022,  
devant le jury composé de :

**Madame Judit SZÉCSI**

Ingénieure de recherches INRAE, ENS Lyon, Rapportrice

**Monsieur Benoit VAN DER REST**

Maître de conférences des Universités, INP Toulouse-ENSAT, Rapporteur

**Madame Christel CARLES**

Professeure des Universités UGA, CEA Grenoble, Présidente

**Monsieur Charlie SCUTT**

Directeur de recherches CNRS, ENS Lyon, Examineur

**Madame Véronique HUGOUVIEUX**

Directrice de recherches CEA, CEA Grenoble, Directrice de thèse

**Madame Chloé ZUBIETA**

Directrice de recherches CNRS, CEA Grenoble, Directrice de thèse







# Remerciements

Cette thèse représente beaucoup de travail et d'investissement de ma part mais également de très nombreuses personnes qui m'ont apporté leur aide, leur soutien, leurs conseils et leur bienveillance durant ces trois ans et demi. Vous tous qui m'avez aidé de près ou de loin, je ne saurais vous remercier autant que vous le mériteriez mais je vais tâcher de faire de mon mieux.

Tout d'abord, je souhaite remercier Éric Maréchal et François Parcy de m'avoir accueilli au sein du LPCV durant cette thèse ainsi que tous les membres du LPCV pour leur accueil et leur bienveillance avec une mention spéciale pour la team admin que je suis venu déranger bien trop de fois. Je remercie également le CEA d'avoir financé cette thèse.

Je remercie Judit Szécsi et Benoit van der REST d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce manuscrit mais aussi Christel Carles, Charlie Scutt et Marie Monniaux d'avoir accepté d'évaluer mon travail.

Un immense merci à mes deux super encadrantes Chloé et Véro. Vous avez su avoir une patience infinie et une motivation sans faille pour corriger ce manuscrit et me faire grandir de petit étudiant agro qui ne savait pas faire une transfo à ce que je suis devenu aujourd'hui. Chloé, merci pour la liberté que tu m'as accordée et ton optimisme permanent. Ton calme et ta sérénité face à toutes les situations possibles m'ont appris à relativiser et à garder l'esprit clair pour prendre rapidement les meilleures décisions. Je n'oublie pas toutes tes courses entre le C2, le 40.20 et l'ESRF à la recherche du St Graal de la structure avec ces phrases qui résonneront toujours dans ma tête : « We need more protein, we need more crystals ! We are close ! ». Merci à toi d'avoir gardé espoir quand je commençais à désespérer, de m'avoir prodigué tous ces bons conseils et d'avoir su me faire rebondir sur une nouvelle thématique formidable en fin de première année.

Véro, merci mille fois pour ces trois années. Il n'y pas à dire, on ne peut pas s'ennuyer avec toi ! Je retiendrai, avant tout, cette rigueur que tu m'as inculquée, cette recherche permanente de l'EMSA parfait et du détail qui fait toute la différence et ta franchise, parfois abrupte, qui ont toujours eu pour but de me rendre meilleur. Tu m'as appris à être extrêmement critique envers mes résultats et à ne pas les voir comme une fin en soi mais comme un morceau d'information à replacer dans la globalité de l'organisme, au cours de nos

discussions enflammées qui m'ont transmis la passion, l'envie et la créativité qui t'animent. Je te remercie aussi pour ces nombreuses heures à phénotyper les plantes ou à les dépouiller de pucerons. Il est impossible de finir ces remerciements sans mentionner la personne bienveillante, droite et généreuse que tu es ainsi que tes frasques légendaires qui me feront toujours rire, ne change surtout pas ! Il y a eu de multiples embuches au cours de cette thèse et maintenant que la fin est proche, je mesure d'autant plus la chance inouïe que j'ai eue de vous avoir toutes les deux comme encadrantes. Vous avez fait la paire qu'il fallait pour me faire voir la recherche sous son plus beau jour, encore merci à vous deux.

Je remercie bien-sûr les membres passés et présents de l'équipe StructDev. Un grand merci à Xuelei d'avoir été une inspiration pour moi et une réelle base de données et d'informations en temps réel. Un grand merci à Agnès qui m'a accueilli et qui est partie bien vite vers de nouvelles aventures, je retiendrai surtout tes conseils d'ostéo ! Steffie, merci pour ton aide et ton travail sur le projet, espérons que les SAXS apportent de belles données. Sarah, merci pour tous ces moments passés au labo à s'échiner sur les purifs et le FRET. Amuse-toi bien avec la suite de ce projet, il y'a de quoi faire ! Je remercie aussi Catarina qui a beaucoup fait en amont et qui m'a laissé de belles perspectives pour mes travaux. Merci beaucoup à Aditya qui m'a accueilli et aidé au tout début de ma thèse, dommage que nous n'ayons pas été ensemble au laboratoire plus longtemps !

Je remercie également l'équipe Flo\_Re avec qui j'ai beaucoup partagé scientifiquement mais aussi humainement. Un grand merci à terter Manu de m'avoir tout montré au sein du PCV et pour tous ces bons moments au stade, au bar ou au labo. Hicham, dans la même lignée, merci pour tout ce que tu m'as appris avec passion et pour toutes nos petites discussions (scientifiques ou pas) autour de la centri. Et garde-moi une place, j'arrive ;) ! Un grand merci à Gaby, Renaud et Romain pour votre bonne humeur, votre calme, vos bons conseils et votre disponibilité. Votre manière d'aborder la recherche (et la vie) tout en calme et en sérénité est une inspiration pour moi. Cora, merci à toi pour tous les moments de rires et de discussions autour de la thèse, la société, Hadès et j'en passe. Loïc, merci d'avoir été un si bon compagnon de labo, comme tu le vois je viens de passer la Ligue, un nouveau monde rempli de défis m'attend ! A bientôt je l'espère autour d'une bière ou d'un mojito au Jules Verne. Merci à toi, Philippe, alias le king du labo avec qui j'ai bien souvent partagé « l'heure des braves ». Tes

bons conseils au labo et à l'escalade m'ont beaucoup aidé et tu resteras, à mes yeux, l'image du thésard simplement parfait, la brute épaisse ! Merci pour tous ces bons moments :)

Un grand merci à Etienne, Louise et Camille pour tous ces bons moments en pauses, au labo ou en dehors. Vous m'avez apporté énormément de soutien et de rires que je n'oublierai pas !

Manon et Elise, je tiens évidemment à vous remercier particulièrement. Nous avons vécu les mêmes étapes finales à quelques semaines près. Bien-sûr, je vous ai harcelées avec 10000 questions sur Word, l'administration etc mais vous n'avez pas faibli ! Manon, ta thèse n'était pas si mal finalement, tu m'as bien étonné ;) Et évidemment Elise, tu as tout détruit sur ton passage avec toute la badasserie qu'on te connaît. Plus sérieusement, merci d'avoir été les meilleures co-thésardes qu'on puisse imaginer. Vous avez su me redonner le sourire quand le temps était gris et me partager vos moments de doute et de peine.

Στον φίλο μου Γεώργιος κεπεσίδης. Σας ευχαριστούμε για όλες αυτές τις στιγμές που συζητήσαμε μαζί για το διδακτορικό, την επιστήμη, τη μελλοντική επαγγελματική ζωή, την πολιτική και τη Γαλλία εναντίον της Ελλάδας (ξέρουμε ποια είναι η καλύτερη, δεν θα σας φέρω σε δύσκολη θέση εδώ). Αυτά τα 2 τελευταία χρόνια δεν θα ήταν τα ίδια χωρίς εσένα, με μεγάλωσες όταν ήμουν πεσμένος και όλη σου η ενθάρρυνση με βοήθησε τόσο πολύ να περάσω από όλα τα βήματα. Τώρα που τελείωσα, απλώς περιμένω να έρθει η ώρα σας Σε ευχαριστώ για όλα, φίλε !

Un énorme merci à toi, mon ami Jérémy, qui as toujours su être là pour moi sans t'imposer. Ces moments forts sur RL, Ark, AoE2DE, PZ, Temtem, The Isle et au bloc n'ont fait que renforcer l'amitié que nous avons et qui se poursuit. Ces trois années auraient été bien différentes (pas en bien) si je n'avais pas eu ton calme, ta sérénité, ta disponibilité et tes bons conseils, merci encore mon vieux ! Et ne t'inquiète pas, si quelqu'un a un problème d'ordi, je l'enverrai vers toi ;)

Un grand merci à mes amis d'Ozoghetto : Bibi, Baboun, el bueno Flo, Sixela, Maquébono et Fredou. Vous avez su me montrer que même si on ne se voyait plus beaucoup, rien ne changeait entre nous et cela m'a permis de donner le meilleur de moi-même en vous ayant à mes côtés à distance.

Un grand merci également à mes amis de VAS : hey Cody, Jean-Thomas Denoir, Le Kad, Solido Nico et Flo « mon ami ! ». Les discussions avec vous (et vos mêmes incroyables) m'ont toujours

remis dans un état d'esprit positif (qui l'eût cru). Merci d'être restés les mêmes et d'oublier, comme moi, tous les anniversaires !

Je remercie la famille Perségo/Martin/Bailly d'avoir été un soutien pendant ces trois ans. A chacune de nos retrouvailles, je prenais un grand bol d'air frais et je revenais plus fort que jamais ! Merci à vous tous.

Je tiens ensuite à remercier les personnes qui me sont les plus proches : ma famille. Vous m'avez vu passer par toutes les couleurs et tous les états pendant ces trois ans ; parfois avec inquiétude, souvent avec confiance mais toujours avec bienveillance et soutien. Merci d'avoir accepté mes choix et d'être restés les mêmes. Mention spéciale pour Angélique qui a proposé un peu vite de relire mon introduction et qui a ensuite, je pense, regretté en apprenant le nombre de pages ;)

Je veux remercier mes parents et ma sœur du plus profond du cœur pour leur soutien et leur amour permanents. Vous m'avez relevé, épaulé, guidé, poussé, encouragé, fait rire et saoulé de paroles autant que vous le pouviez. Si je suis arrivé aujourd'hui au bout de cette expérience et de ma vie étudiante, c'est en TRÈS TRÈS très grande partie grâce à vous trois. Il va être difficile de vous rendre la pareille pour la suite mais je ferai de mon mieux. Je vous le dis bien trop rarement et vous le montre bien trop mal mais ... vous avez compris la suite ;)

Je voudrais finir ces remerciements par la personne qui a rendu cette thèse possible au quotidien, ma belle, ma tendre, ma forte et douuuuuuce Agathe. Tu as su m'aimer, me faire rire, me secouer (parfois très fort !), m'encourager, me faire prendre l'air et voyager (souvent presque Delta Charlie Delta) tout au long de ces trois années. Il n'a pas été facile d'être éloignés pendant ces trois ans mais tu as toujours fait tout ce que tu pouvais pour me mettre dans les meilleures dispositions, le plus souvent à tes dépens. Je ferai tout mon possible dans le futur pour te rendre tous ces encouragements, cette force mentale, cette détermination, cette ténacité, ce soutien et cet amour que tu m'as apportés pendant cette épreuve. Si cette thèse a représenté beaucoup de travail et de sacrifices pour moi, elle en a représenté encore plus pour toi et pour nous. Avant d'être ma fierté et ma réussite, cette thèse est avant tout la tienne.

# Liste des abréviations

a.a : acide aminé

AD : Activation Domain

ADN : acide désoxyribonucléique

AGL15 : AGAMOUS-LIKE 15

ANRr : acide ribonucléique des ribosomes

AG : AGAMOUS

AP1-3 : APETALA1-3

ARF : auxin response factor

ARN: acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

*A. thaliana* : *Arabidopsis thaliana*

AY-WB : “*Candidatus* Phytoplasma asteris” aster yellows witches' broom

BD : Binding Domain

BiFC : Bimolecular fluorescence complementation

BRC1 et 2 : BRANCHED1 et 2

C1 : complexe1

C2 : complexe2

CAL : CAULIFLOWER

CARG box : CC(A/T)<sub>6</sub>GG ou CC(Adenine-rich)GG

CIN-TCP : CINCINNATA-related TCP

co-IP : co-immunoprécipitation

Col-0 : *Columbia*

C terminal : Carboxy-terminal

CYC/TB1-TCP : CYCLOIDEA/TEOSINTE BRANCHED1 TCP

CV : volume de colonne

DAMPs : Damage-Associated Molecular Patterns

DEF : DEFICIENS

DLS : dynamic light scattering

DMSO : Diméthylsulfoxyde

dNTP : désoxyribonucléoside triphosphate

Domaine M : domaine MADS

Domaine I : domaine Intervening

Domaine K : domaine Keratin-like

Domaine C : domaine Carboxy terminal

EAR : Ethylene-responsive element binding factor-associated Amphiphilic Repression

*E. coli* : *Escherichia coli*

EDTA : Acide Ethylène Diamide Tétraaécétique

EMSA: Electrophoretic Mobility Shift Assay, gel retard

ETI : Effector-Triggered Immunity

ETS : Effector-Triggered Susceptibility

FA : anisotropie de fluorescence

FD : FLOWERING LOCUS D

FQM : Floral Quartet Model

FT : FLOWERING LOCUS T

FUL : FRUITFULL

GFP : Green Fluorescent Protein

GST : Glutathion S-Transférase

HA : Human influenza hemagglutinin

HPLC : Chromatographie en phase liquide à haute performance ou high performance liquid chromatography

IAA : acide indole acétique

IP-IB : Immunoprécipitation et immunoblotting

IPTG : isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside

JA : acide jasmonique

Kd : constante d'affinité

LB : Luria-Bertani

LC-MS/MS : Chromatographie en phase liquide-spectrométrie de masse

LFY : LEAFY

LOX2 : LIPOXYGENASE 2

MAC : Méristème apical caulinaire

MADS : MAINTENANCE OF MINICHROMOSOME1, AGAMOUS, DEFICIENS et Serum Response Factor

MAMPs : Microbe-Associated Molecular Patterns

MAR : Méristème apical racinaire

MBP : Maltose Binding Protein  
MCM : MAINTENANCE OF MINICHROMOSOME1  
MCS : site multiple de clonage  
MEF2 : Myocyte Enhancer Factor 2  
MF : Méristème floral  
MI : Méristème d'inflorescence  
MIKC<sup>C</sup> : MADS MIKC « classique »  
MLO : Mycoplasma-Like-Organisms  
MPD : (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol  
Myc: human c-Myc oncogene  
OY-M : OY-Mildly pathogenic line  
OY-NIM : OY- Non-Insect-Transmissible derivative of OY-M  
OY-W : "*Candidatus Phytoplasma asteris*" Onion Yellow-wild type strain  
Pb : paire de bases  
PBS : tampon phosphate salin  
PI : PISTILLATA  
PIN : pin-formed  
PAMPs : Pathogen-Associated Molecular Patterns  
PCR : Polymerase Chain Reaction, réaction en chaîne par polymérase  
Phyllogènes : phyllody-inducing gènes  
PMU : potential mobile units  
PnWB : "*Candidatus Phytoplasma asteris*" Peanut Witches' Broom  
PRRs : Pattern Recognition Receptors  
PSM : poste de sécurité microbiologique  
PTI : PAMP-Triggered Immunity  
PV : peptide velcro  
QSP : quantité suffisante pour  
RAD23 : RADIATION SENSITIVE23  
RAM : root apical meristem.  
rpm : round per minute, tour par minutes  
.... R : .... de résistance  
SAXS : small angle x-ray scattering  
SAM : shoot apical meristem

SAP11 : secreted AY-WB protein 11

SAP18 : SIN3-ASSOCIATED POLYPEPTIDE P 18

SAP54 : secreted AY-WB protein 54

SAUR : small auxin-induced RNA

SEC : Size exclusion chromatography : chromatographie d'exclusion stérique

SEC-MALS : Chromatographie d'exclusion stérique couplée avec la mesure de la diffusion de la lumière sous multiples angles

SEP1-4 : SEPALLATA1-4

SHP : SHATTERPROOF

SOC1 : SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1

SRF : Serum Response Factor

STK : SEEDSTICK

SWP1 : secreted Wheat Blue Dwarf phytoplasma protein 1

TBE : Tris, Borate, EDTA

TCEP : Tris(2-carboxyethyl)phosphine

TCP : TEOSINTE BRANCHED1, CYCLOIDEA, PROLIFERATING CELL FACTORS

TEV : Tobacco etch virus, virus de la gravure du tabac

TF : Facteur de transcription

TFL1 : TERMINAL FLOWER1

tNOS: terminateur nopaline synthase

TnT<sup>®</sup> : Transcription and Translation<sup>®</sup>

TRIS : Trishydroxyméthylaminométhane

UAS: Upstream Activation Sequence

Vh : volume hydrodynamique

VP: herpes virus protein

WB : witche's broom (maladie du balai de sorcière)

Y2H : Yeast Two-Hybrid

Y3H : Yeast Three-Hybrid

YNB : Yeast Nitrogen Base

YPD : Yeast Extract-Peptone-Dextrose

# Table des matières

<b>CHAPITRE I : INTRODUCTION .....</b>	<b>17</b>
<b>I. LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION MADS : ACTEURS MAJEURS DU CYCLE DE DEVELOPPEMENT ET DE LA MORPHOGENESE FLORALE DES ANGIOSPERMES .....</b>	<b>18</b>
A. LES MADS-TFS ACTIVATEURS DE LA TRANSITION FLORALE : AP1 ET SOC1 .....	20
B. LES MADS REGULATEURS DE LA MORPHOGENESE FLORALE ET LEUR FONCTIONNEMENT (AP1, AP3, AG, SEP1-4 ET PI) .....	21
1. Le modèle génétique ABC de 1991 .....	22
2. Evolution du modèle génétique ABC en modèle génétique ABC(D)E .....	24
3. Modèle fonctionnel : modèle protéique du Floral Quartet.....	26
C. LES DIFFERENTS TYPES DE MADS-TFS ET LA STRUCTURE DES MADS-TFS DU FQM .....	28
1. Les MADS-TFs de type I .....	29
2. Les MADS-TFs de type II .....	30
a. Les MADS-TFs MIKC.....	30
3. Structure des MADS-TFs MIKC <sup>C</sup> du FQM .....	30
a. Le domaine M de liaison à l'ADN .....	31
b. Le domaine I : spécificité de dimérisation et de liaison à l'ADN.....	32
c. Le domaine K : clé de l'oligomérisation des MADS-TFs.....	34
i. Le domaine K, interface de dimérisation et de tétramérisation primordiale pour la formation des organes floraux .....	35
ii. Le domaine K est une zone propice aux interactions en leucine-zipper .....	38
d. Le domaine C-terminal, un domaine de régulation des gènes très peu structuré .....	40
<b>II. LES PHYTOPLASMES, BACTERIES PARASITAIRES DE NOMBREUX VEGETAUX.....</b>	<b>42</b>
A. LA DECOUVERTE ET LA CLASSIFICATION DES PHYTOPLASMES .....	42
B. UNE BACTERIE ADAPTEE POUR LE PARASITISME EFFICACE .....	44
1. Un cycle de vie dans deux hôtes très différents .....	44
a. Le vecteur mobile des phytoplasmes : les hémiptères .....	44
b. Les phytoplasmes, petites bactéries sectorisées dans le phloème des plantes.....	46
2. Les plantes infectées par les phytoplasmes .....	46
3. Les défenses primaires des plantes et leur court-circuitage par les phytoplasmes .....	47
a. Les défenses primaires des plantes, protection globale et ciblage des effecteurs.....	47
i. La défense basale des plantes, une reconnaissance non spécifique .....	47

ii. La défense intracellulaire des plantes, spécificité effecteur-protéine de résistance .....	49
b. La pénétration non destructive des phytoplasmes dans la plante et le contournement des réactions de défense des plantes .....	49
4. Un petit génome adapté au parasitisme (exemple de la souche 'Candidatus Phytoplasma asteris' Onion Yellowings : OY) .....	49
a. Un petit génome codant pour peu de gènes différents .....	50
b. Un génome adapté au détournement de métabolites de l'hôte.....	51
c. Un génome favorisant la pathogénicité chez les plantes .....	52
C. CARACTERISATION DES MALADIES ET EFFECTEURS ASSOCIES .....	53
1. Le nanisme : la dérégulation des mécanismes de réponse à l'auxine .....	53
2. La maladie du « balai de sorcière » (witches' broom : WB) : la déstabilisation des CYC/TB1-TCP .....	56
3. Le gondolement des feuilles : la déstabilisation des CIN-TCP .....	59
4. La phyllodie et la virescence : la dégradation des MADS-TF floraux par les effecteurs phyllogènes.....	60
a. Caractérisation des phénotypes de phyllodie.....	60
b. Mécanismes moléculaires d'action des effecteurs responsables de la phyllodie .....	61
c. Structure des effecteurs phyllogènes et interaction avec le domaine K des MADS-TFs floraux .....	63
i. La structure hélicoïdale des phyllogènes confère de fortes propriétés d'interaction protéine-protéine .....	63
ii. L'interaction des phyllogènes et des MADS-TFs : une interaction en leucine-zipper .....	65
<b>CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES.....</b>	<b>69</b>
<b>I. MATERIELS BIOLOGIQUES .....</b>	<b>70</b>
A. MATERIEL VEGETAL.....	70
B. MATERIEL BACTERIEN .....	70
C. MATERIEL DE LEVURES.....	70
<b>II. METHODES.....</b>	<b>72</b>
A. TECHNIQUE GENERALE DE CLONAGE .....	72
1. Amplification des inserts et linéarisation de plasmides par PCR.....	72
2. Linéarisation des plasmides par digestion enzymatique.....	73
3. Purification des inserts et plasmides et ligation par Gibson Assembly® .....	73
4. Transformation thermique des bactéries.....	74
B. MUTAGENESE DIRIGEE.....	75

C. IDENTIFICATION DES INTERACTIONS PAR YEAST TWO-HYBRID .....	76
1. Système choisi.....	76
2. Sélections apportées par les vecteurs et les souches de ce système .....	76
3. Constructions réalisées .....	78
4. Technique de Yeast-Two-Hybrid.....	80
a. Jour 1 : Préparation de levures à transformer .....	80
b. Jour 2 : Transformation des levures.....	81
c. Jour 4 : Croisement des souches .....	81
d. Jour 5 : Sélection des croisements.....	82
e. Jour 8 : Dépôt des croisements sur milieu très sélectif et sur milieu sélectif témoin.....	82
D. PRODUCTION DE LIGNÉES TRANSGÉNIQUES .....	83
1. Semis et cultures des plantes .....	83
2. Vecteurs et Lignées transgéniques réalisées .....	83
a. Lignée exprimant PHYL1 <sub>OY</sub> sous le promoteur fort 35S.....	83
b. Lignées exprimant PHYL1 <sub>OY</sub> sous promoteurs de gènes MADS .....	84
3. Transformation électrique des agrobactéries .....	85
4. Transformation des plantes.....	85
5. Géotypage des plantes .....	85
6. Analyse des phénotypes floraux .....	87
E. PRODUCTION ET PURIFICATION DE PROTEINES RECOMBINANTES .....	87
1. Constructions réalisées .....	87
2. Production de protéines recombinantes.....	90
a. Culture de bactéries et induction des protéines recombinantes.....	90
b. Lyse des bactéries par sonication aux ultrasons.....	90
3. Purification de protéines par colonne d'affinité.....	91
a. Purification des protéines GST-PHYL1 <sub>OY</sub> et PHYL1 <sub>OY</sub> sur résine de glutathion Sépharose.....	91
b. Purification des protéines PHYL1 <sub>OY</sub> , PHYL1 <sub>OY</sub> -Cys et SEP3 <sup>[75-178]</sup> et AG <sup>[90-189]</sup> du complexe SEP3 <sup>[75-178]</sup> /AG <sup>[90-189]</sup> sur résine de nickel Sépharose .....	93
c. Purification du complexe SEP3 <sup>[75-178]</sup> /AG <sup>[90-189]</sup> sur résine de dextrine Sépharose .....	94
4. Purification de protéines et complexes par chromatographie d'exclusion stérique ou SEC....	95
F. DETERMINATION DE LA STœCHIOMETRIE DES COMPLEXES SEP3 <sup>[75-178]</sup> /AG <sup>[90-189]</sup> /PHYL1 <sub>OY</sub> ET SEP3 <sup>[75-178]</sup> /PHYL1 <sub>OY</sub> PAR SEC-MALS .....	96
1. Formation des complexes SEP3 <sup>[75-178]</sup> /AG <sup>[90-189]</sup> /PHYL1 <sub>OY</sub> et SEP3 <sup>[75-178]</sup> /PHYL1 <sub>OY</sub> .....	96
2. Détermination de la stœchiométrie par chromatographie d'exclusion stérique couplée avec la mesure de la diffusion de la lumière sous multiples angles : SEC-MALS.....	96

G. DETERMINATION DES CONSTANTES D’AFFINITE PAR ANISOTROPIE DE FLUORESCENCE : FA .....	97
H. ANALYSE DE LA LIAISON A L’ADN PAR GEL RETARD (EMSA) .....	98
1. Choix des vecteurs .....	98
2. Constructions réalisées et utilisées.....	98
3. Production des protéines MADS par transcription et traduction in vitro .....	99
4. Liaison des protéines à la sonde ADN .....	100
5. Migration et numérisation du gel retard.....	100
I. CRISTALLISATION DE SEP3 <sup>[75-178]</sup> /AG <sup>[90-189]</sup> ET SEP3 <sup>[75-178]</sup> /PHYL1 <sub>0Y</sub> PAR LA METHODE DE LA GOUTTE SUSPENDUE.....	101
1. Essais de cristallisation par une plateforme automatisée et choix des conditions prometteuses .....	101
2. Optimisation des conditions de cristallisation au laboratoire .....	102
<b>CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSIONS .....</b>	<b>105</b>
<b>I. IDENTIFICATION DES MADS-TFS DU FQM CIBLES PAR PHYL1<sub>0Y</sub> ET ANALYSE DE SON EXPRESSION DANS LA PLANTE .....</b>	<b>106</b>
A. IDENTIFICATION DES MADS-TFS DU FQM CIBLES PAR PHYL1 <sub>0Y</sub> PAR Y2H .....	106
B. ANALYSE DE L’EXPRESSION DE PHYL1 <sub>0Y</sub> SUR LE DEVELOPPEMENT DE LA FLEUR.....	107
1. Plantes transgéniques exprimant <i>PHYL1<sub>0Y</sub></i> sous le promoteur 35S .....	108
2. Plantes transgéniques exprimant <i>PHYL1<sub>0Y</sub></i> sous le contrôle des promoteurs d’ <i>AP1</i> et de <i>SEP3</i> .....	111
a. Plantes transgéniques exprimant <i>PHYL1<sub>0Y</sub></i> sous le promoteur d’ <i>AP1</i> .....	112
b. Plantes transgéniques exprimant <i>PHYL1<sub>0Y</sub></i> sous le promoteur de <i>SEP3</i> .....	114
<b>II. CARACTERISATION BIOCHIMIQUE DES COMPLEXES SEP3/AG/PHYL1<sub>0Y</sub> ET SEP3/PHYL1<sub>0Y</sub> .....</b>	<b>125</b>
A. IDENTIFICATION DU DOMAINE D’INTERACTION PAR YEAST-TWO-HYBRID .....	125
B. CARACTERISATION BIOCHIMIQUE DE L’INTERACTION DE PHYL1 <sub>0Y</sub> AVEC LE DOMAINE K DE SEP3/AG ET SEP3 .....	126
1. Purification de PHYL1 <sub>0Y</sub> et des domaines K de SEP3/AG, de SEP3 et d’AG .....	126
a. Purification de PHYL1 <sub>0Y</sub> .....	126
b. Purification du domaine K de SEP3/AG.....	132
c. Purification du domaine K de SEP3 .....	136
d. Purification du domaine K d’AG.....	138
2. Stœchiométrie des complexes formés entre MADS et PHYL1 <sub>0Y</sub> .....	140
a. Purification des complexes formés en SEC et détermination approximative de la stœchiométrie .....	140

b. Détermination précise de la stœchiométrie des complexes MADS/PHYL1 <sub>OY</sub> par purification en SEC-MALS.....	143
3. Détermination de l'affinité entre PHYL1 <sub>OY</sub> et les complexes MADS par anisotropie de fluorescence .....	145
C. IMPACT DE PHYL1 <sub>OY</sub> SUR LA LIAISON DE MADS-TFS FL A L'ADN.....	148
1. Confirmation de la stœchiométrie et de l'affinité de PHYL1 <sub>OY</sub> pour les complexes SEP3/AG et SEP3.....	148
2. L'interaction entre PHYL1 <sub>OY</sub> et SEP3/AG nécessite la zone de tétramérisation de SEP3 et semble renforcée par AG .....	152
<b>III. IDENTIFICATION DE L'INTERACTION MADS/PHYL1<sub>OY</sub> AU NIVEAU ATOMIQUE ET MOLECULAIRES .....</b>	<b>157</b>
A. CRISTALLOGENESE DES COMPLEXES MADS/PHYL1 <sub>OY</sub> FORMES ET DE L'HETEROCOMPLEXE SEP3 <sup>[75-178]</sup> /AG <sup>[90-189]</sup> .....	157
1. Cristallogénèse de SEP3 <sup>[75-178]</sup> /AG <sup>[90-189]</sup> /PHYL1 <sub>OY</sub> .....	157
2. Cristallogénèse de SEP3 <sup>[75-178]</sup> /AG <sup>[90-189]</sup> .....	157
3. Cristallogénèse de SEP3 <sup>[75-178]</sup> /PHYL1 <sub>OY</sub> .....	159
B. IDENTIFICATION DES ACIDES AMINES NECESSAIRES POUR L'INTERACTION DE SEP3 AVEC PHYL1 <sub>OY</sub> PAR MUTAGENESE .....	161
1. Etude des mutations d'acides aminés hydrophobes de la zone de tétramérisation de SEP3 en Y2H .....	161
2. Etude des mutations d'acides aminés hydrophobes de la zone de tétramérisation de SEP3 en EMSA .....	164
3. Etude des acides aminés hydrophobes chez les autres MADS-TFs du FQM .....	165
C. MODELES D'INTERACTION DE PHYL1 <sub>OY</sub> AVEC LES DIMERES DE MADS.....	168
<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>172</b>
<b>PHYL1<sub>OY</sub> CIBLE LES COMPLEXES MADS IMPLIQUES DANS LA MORPHOGENESE FLORALE ET EMPECHE LEUR FONCTIONNEMENT <i>IN VIVO</i>.....</b>	<b>173</b>
<b>PHYL1<sub>OY</sub> CIBLE DES DIMERES DE MADS PAR LEUR DOMAINE K .....</b>	<b>174</b>
<b>PHYL1<sub>OY</sub> IMITATEUR DE LA ZONE DE TETRAMERISATION DES MADS.....</b>	<b>174</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>176</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>191</b>

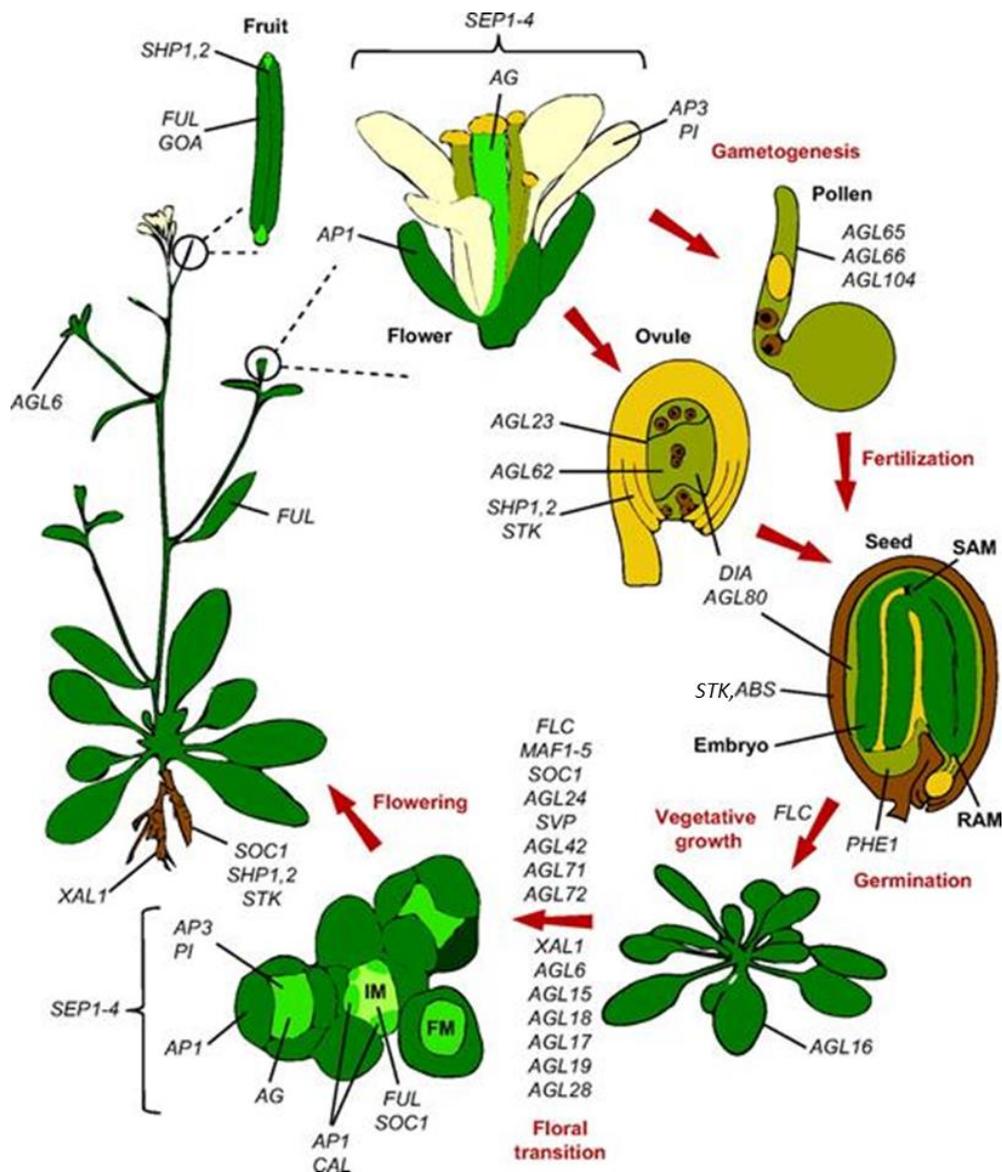
# Chapitre I : Introduction

## I. Les facteurs de transcription MADS : acteurs majeurs du cycle de développement et de la morphogénèse florale des angiospermes

Les facteurs de transcription (TFs) sont des protéines qui modulent l'expression des gènes en se liant à des séquences d'ADN spécifiques à proximité du gène à réguler et peuvent former des complexes avec de nombreuses autres protéines afin d'activer ou d'inhiber la transcription de ce gène. Les MADS appartiennent à une famille de TFs caractérisés par leur domaine de liaison à l'ADN appelé domaine MADS ou domaine M. Ce domaine a été identifié chez divers organismes et a permis de nommer les TFs le possédant d'après les premières protéines découvertes possédant ce domaine : MAINTEANCE OF MINICHROMOSOME1 (MCM, *Saccharomyces cerevisiae*), AGAMOUS (AG, *Arabidopsis thaliana*), DEFICIENS A (DEF A *Antirrhinum majus*) et Serum Response Factor (SRF, *Homo sapiens*) pour MADS (Dubois, Bercy, et Messenguy 1987; Norman et al. 1988; Sommer et al. 1990; Yanofsky et al. 1990; Schwarz-Sommer et al. 1990). Pour lier l'ADN, les MADS-TFs doivent former des dimères (homo ou hétérodimère) et sont appelés de ce fait, dimères obligatoires. Tous les MADS-TFs reconnaissent sur l'ADN un motif semblable de consensus CC(A/T)<sub>6</sub>GG ou CC(Adenine-rich)GG appelé boîtes CARG (CARG box) (Pellegrini, Tan, et Richmond 1995; Shore et Sharrocks 1995; Tilly, Allen, et Jack 1998; Egea-Cortines, Saedler, et Sommer 1999). Ce motif est très présent dans le génome d'*Arabidopsis thaliana* (plus de 300 000 fois) et certaines études suggèrent que les MADS-TFs pourraient réguler près de 30% de ce génome (Folter et Angenent 2006).

Les facteurs de transcription MADS sont impliqués dans de nombreuses étapes clés du développement des plantes à fleur, ou angiospermes. La Figure 1 récapitule les différentes protéines MADS identifiées dans ces différentes étapes chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana* (Figure 1). La graine, comprenant l'embryon et ses réserves, résulte de la double fécondation d'un gamète mâle et d'un gamète femelle. Lorsque cette graine tombe en terre, elle germe quand les conditions environnementales sont adéquates et une jeune plantule se développe grâce à deux pôles de croissance constitués de cellules souches indifférenciées appelés méristèmes. Ces deux méristèmes sont le méristème apical caulinaire (MAC ou SAM dans la Figure 1) et le méristème apical racinaire (MAR ou RAM dans la Figure 1) situés à l'apex de la tige et de la racine respectivement. La première phase de croissance et de développement de la plante s'appelle la phase végétative et se caractérise par la croissance et le développement des racines dans le sol grâce au MAR et par la croissance de la tige et le

développement de feuilles grâce au MAC. Comme le montre la Figure 1, de nombreux MADS interviennent dans ces premières étapes du développement de la plante. Ensuite, lorsque les organes aériens de la plante sont développés, la plante peut percevoir des signaux environnementaux qui vont déclencher la phase reproductive de la plante. Cette phase, primordiale pour la pérennité de l'espèce, est initiée par la transition florale puis se poursuit par la floraison dans lesquelles de très nombreux MADS-TFs ont été caractérisés (Figure 1).

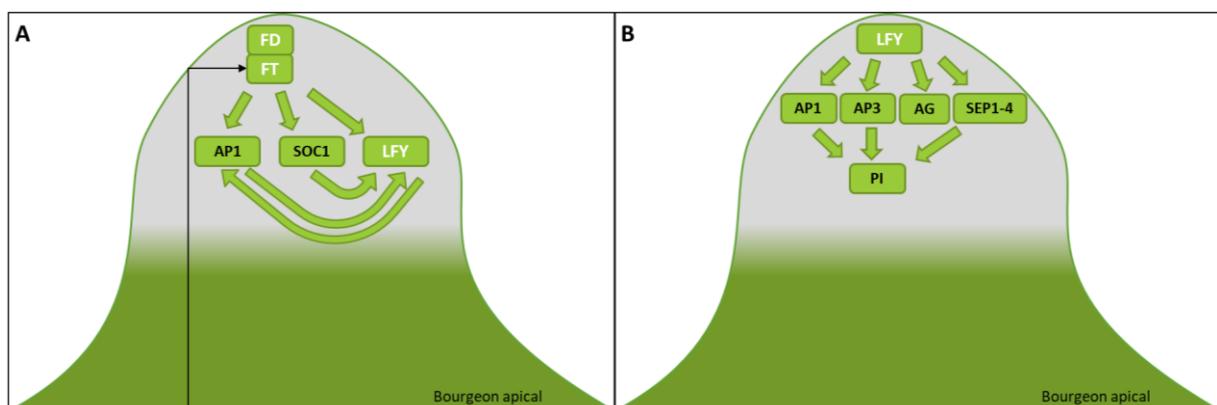


**Figure 1 : Implication des MADS-TFs tout au long du cycle de vie d'*A. thaliana*** d'après Smaczniak, Immink, Angenent, et al. 2012. Les différents stades de développement et les MADS-TFs impliqués sont annotés. SAM : méristème apical caulinaire. RAM : méristème apical racinaire.

Notre étude porte sur les MADS-TFs impliqués dans la morphogénèse florale mais nous allons brièvement expliquer la phase de transition florale (passage de l'état végétatif à reproductif) et citer certains MADS-TFs nécessaires dans cette étape.

## A. Les MADS-TFs activateurs de la transition florale : AP1 et SOC1

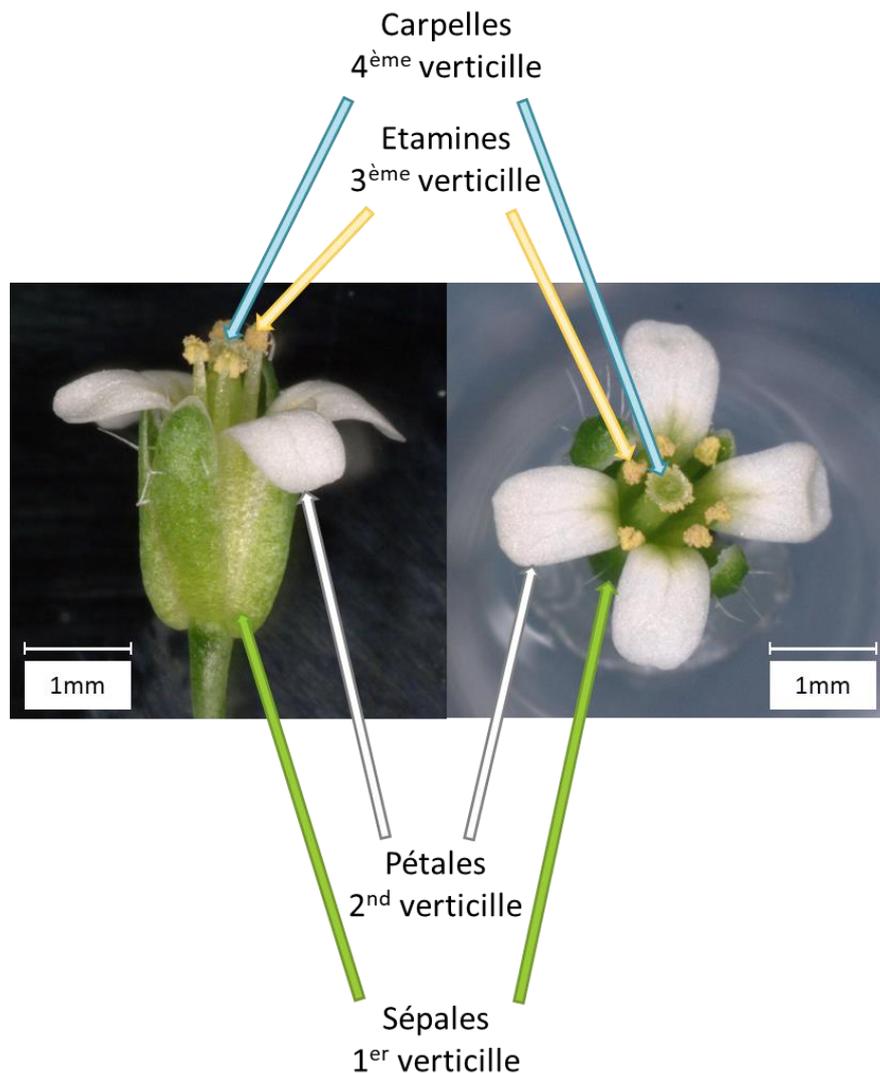
La transition de l'état végétatif à reproductif est déclenchée par différents facteurs endogènes et exogènes. On peut citer comme facteurs exogènes la vernalisation (exposition prolongée à de faibles températures représentée par l'hiver), la hausse progressive des températures durant et à la sortie de l'hiver ainsi que l'augmentation de la durée jour/nuit (photopériode) (Putterill et al. 1995; Michaels et Amasino 1999; J. H. Lee et al. 2007). Ces facteurs exogènes sont internalisés par la plante et régulent la transition florale. Certains facteurs endogènes comme le taux de sucre et les hormones gibbérellines régulent également la transition florale (Koornneef, Hanhart, et van der Veen 1991; Bernier et al. 1993). Ces différents facteurs permettent l'activation d'un gène clef, non MADS, appelé *FLOWERING LOCUS T* (*FT*). La protéine correspondante est produite dans les feuilles puis transportée via le phloème jusqu'au MAC où elle s'associe à un TF, non MADS, *FLOWERING LOCUS D* (*FD*). En interagissant ensemble, ils induisent l'expression d'autres acteurs déterminants pour la floraison : les gènes MADS *APETALA1* (*AP1*) et *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1* (*SOC1*) et le gène non MADS *LEAFY* (*LFY*) codant pour un facteur de transcription nécessaire au déclenchement de la formation de la fleur (Figure 2.A) (Wigge et al. 2005; Zhu et al. 2020). Les MADS-TFs *AP1* et *SOC1* vont également stimuler l'expression de *LEAFY* (*LFY*) et *AP1* et *LFY* s'activent mutuellement (Parcy et al. 1998; Wagner, Sablowski, et Meyerowitz 1999; J. Lee et al. 2008). Il en résulte donc une augmentation brutale de l'expression de *LFY* déclenchant ainsi la floraison (Figure 2) (Bowman et al. 1993; Liljegren et al. 1999).



**Figure 2 : Schéma simplifiés des acteurs moléculaires impliqués dans (A) le déclenchement de la floraison et (B) dans la formation des organes floraux.** La zone grise du bourgeon apical représente la zone méristématique. Le mouvement de la protéine FT de la feuille au bourgeon apical grâce au tissu conducteur du phloème est représenté par la flèche fine et noire. Les MADS-TFs sont écrits en gras et noir.

## B. Les MADS régulateurs de la morphogénèse florale et leur fonctionnement (AP1, AP3, AG, SEP1-4 et PI)

L'augmentation de l'expression de *LFY* active à son tour l'expression de très nombreux gènes, notamment les gènes MADS acteurs de la morphogénèse florale : *AP1*, *APETALA3 (AP3)*, *AGAMOUS (AG)*, les *SEPALLATA 1, 2, 3 et 4 (SEP1-4)* et *PISTILLATA (PI)*, ce-dernier étant activé majoritairement par l'expression d'*AP1*, d'*AP3* et de *SEP3* (Figure 2.B) (Huala et Sussex 1992; Riechmann, Krizek, et Meyerowitz 1996; Parcy et al. 1998; Honma et Goto 2000; Jenik et Irish 2000; Ng et Yanofsky 2001; Lamb et al. 2002; Winter et al. 2011; Wu et al. 2012). La compréhension des mécanismes impliqués dans la formation des organes floraux a été d'abord bâtie sur des études génétiques datant du début des années 1990 puis complétée dix ans plus tard par des études d'interactions de protéines (levures doubles et triples hybrides et interactions *in planta*) et de liaisons de complexes protéiques à l'ADN (EMSA) (Bowman, Smyth, et Meyerowitz 1989; Irish et Sussex 1990; Coen et Meyerowitz 1991; Honma et Goto 2001; de Folter et al. 2005; Immink et al. 2009; Smaczniak, Immink, Muiño, et al. 2012; Rümpler, Theißen, et Melzer 2018). Avant d'expliquer les mécanismes permettant la formation des organes floraux chez *A. thaliana*, rappelons tout d'abord que ses fleurs sont composées de l'extérieur vers l'intérieur de quatre verticilles ou couronnes : quatre sépales, quatre pétales, six étamines (pièces reproductrices mâles) et deux carpelles fusionnés en une structure appelée pistil (pièces reproductrices femelles) (Müller 1961). Les sépales verts servent à protéger les pièces reproductrices de la fleur tout comme les pétales blancs qui attirent aussi les insectes pollinisateurs. Les étamines et carpelles servent à la reproduction. Les étamines attirent également les insectes pollinisateurs par leur couleur jaune (Figure 3).

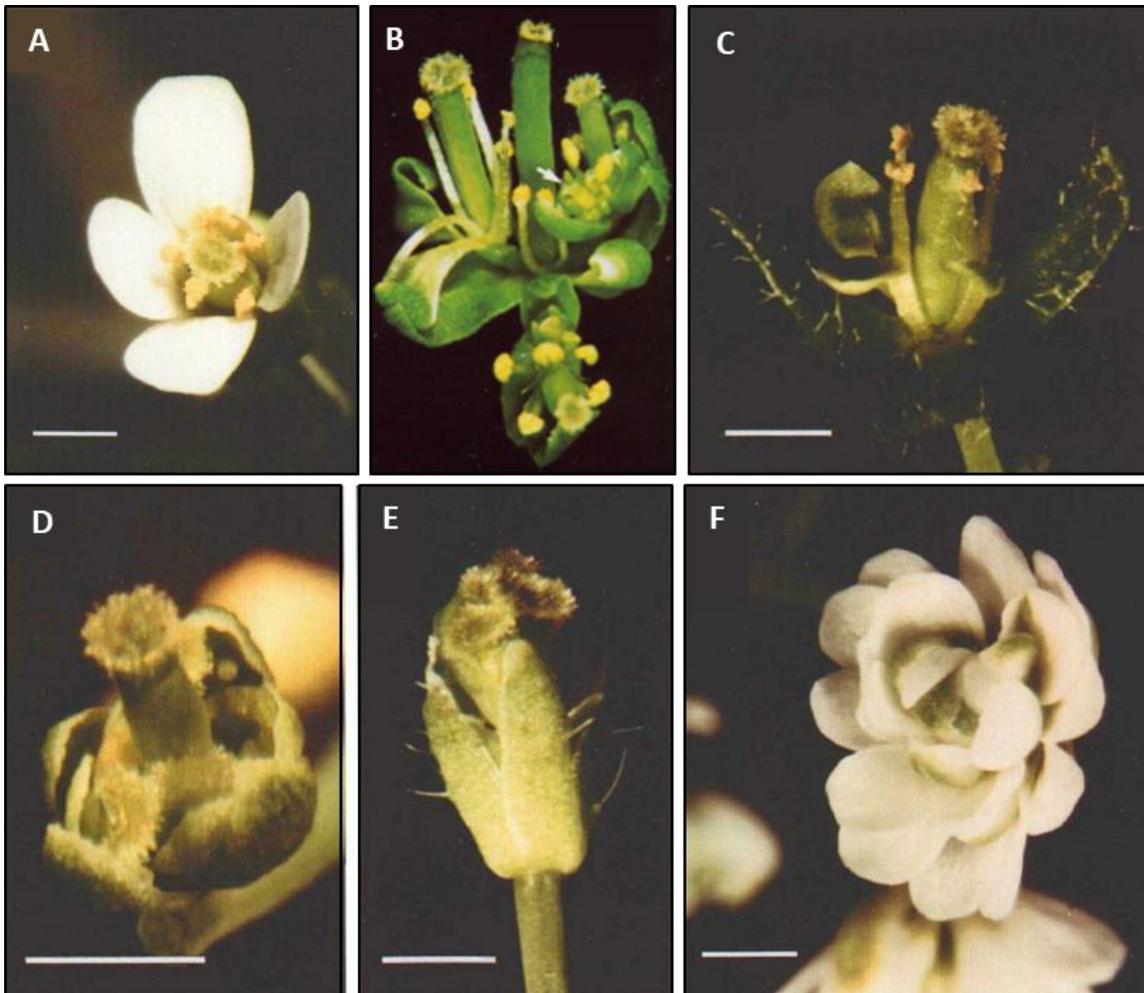


**Figure 3 : Photographies de fleurs d'*A. thaliana* et annotations des différents verticilles ou couronnes.** La fleur est composée de quatre verticilles de l'extérieur vers l'intérieur : quatre sépales, quatre pétales, six étamines (pièces reproductrices mâles) et deux carpelles fusionnés en un pistil (pièces reproductrices femelles). L'échelle est annotée en bas à droite des photographies.

### 1. Le modèle génétique ABC de 1991

Le premier modèle expliquant l'implication des gènes MADS dans le développement des organes floraux est appelé modèle ABC. Ce modèle, décrit par Coen et Meyerowitz en 1991 a été construit grâce à l'observation de phénotypes de plantes mutantes pour des gènes MADS (*AP1*, *AP3*, *PI* et *AG*) et pour le gène *APETALA2* (*AP2*) (Bowman, Smyth, et Meyerowitz 1989; Irish et Sussex 1990; Coen et Meyerowitz 1991). Les deux premiers verticilles des plantes mutantes *ap1* et *ap2* sont affectés (sépales et pétales changés en bractées, pièces hybrides entre des pièces foliaires et florales, et étamines respectivement, Figure 4.B et C), les verticilles 2 et 3 des plantes mutantes *ap3* et *pi* sont affectés (pétales et étamines changés en sépales et carpelles respectivement, Figure 4.D et E) et les verticilles 3 et 4 des plantes

mutantes *ag* sont affectés (étamines et carpelles changés en pétales et nouvelle structure de fleur respectivement, Figure 4.F) (Bowman, Smyth, et Meyerowitz 1989; Irish et Sussex 1990; Coen et Meyerowitz 1991).

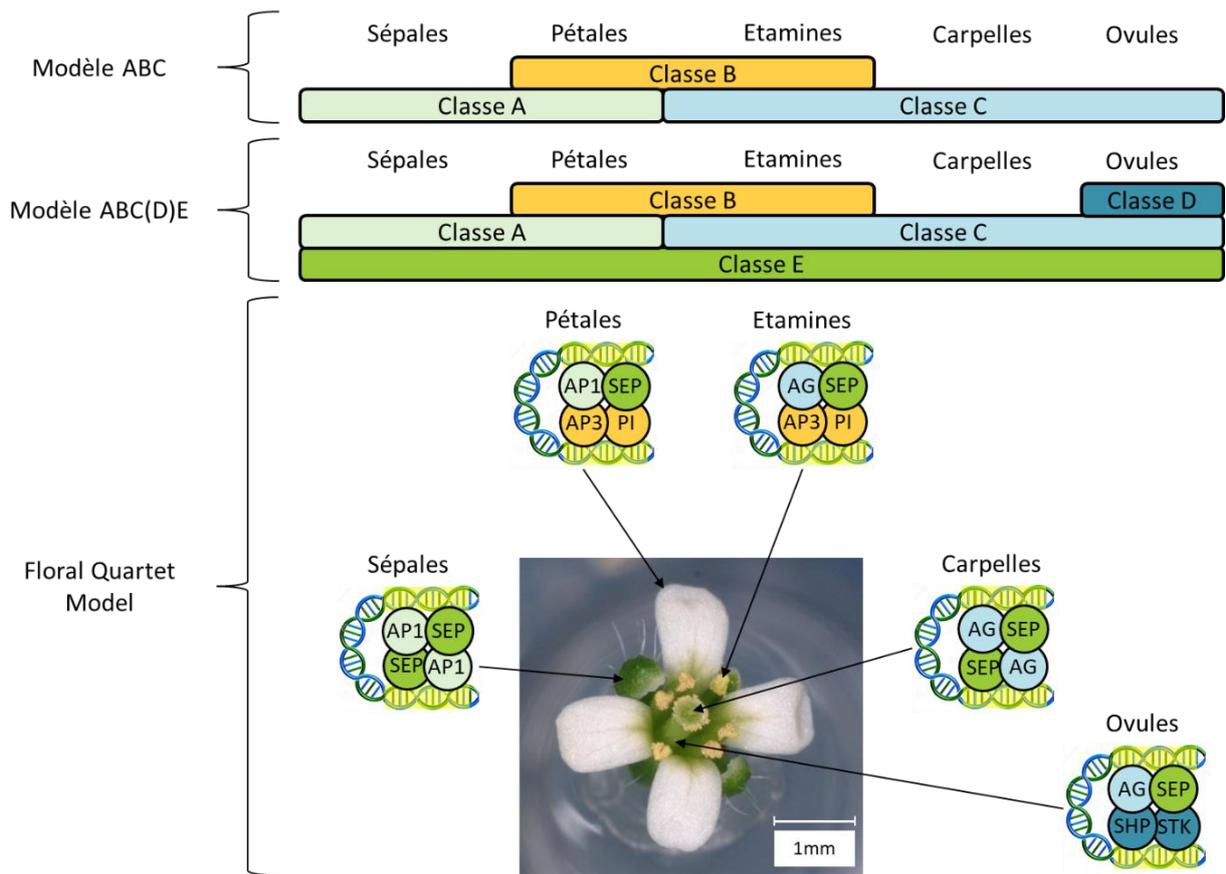


**Figure 4 : Phénotypes des plantes mutantes à l'origine du modèle ABC. (A)** Fleur d'une plante sauvage. Fleur d'une plante mutante *ap1* (B) et *ap2* (C) montrant des défauts dans les sépales et les pétales. Fleur d'une plante mutante *ap3* (D) et *pi* (E) montrant des défauts dans les pétales et les étamines. (F) Fleur d'une plante mutante *ag* montrant des défauts dans les étamines et le carpelle. La photographie B provient de Gustafson-Brown, Savidge, et Yanofsky 1994 et les autres photographies de Bowman, Smyth, et Meyerowitz 1989.

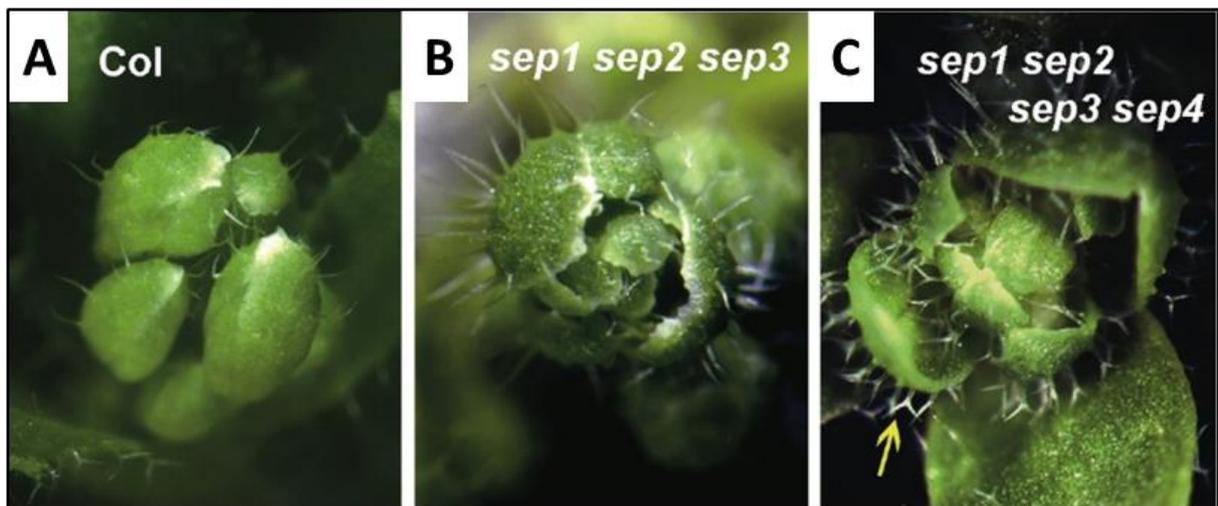
Ces différents gènes ont été classés en fonction des deux verticilles qu'ils semblent déterminer : la classe A (*AP1* et *AP2*) détermine les sépales et les pétales, la classe B (*AP3* et *PI*) détermine les pétales et les étamines et la classe C (*AG*) détermine les étamines et les carpelles (Figure 5). Ainsi certains organes nécessitent pour leur formation plusieurs classes de gènes agissant ensemble : les pétales sont formés par les classes A et B et les étamines par les classes B et C (Figure 5). Ces gènes ont été qualifiés d'homéotiques car ils déterminent l'identité d'organes et leur bon fonctionnement est requis pour la formation des organes.

## 2. Evolution du modèle génétique ABC en modèle génétique ABC(D)E

La première modification apportée au modèle ABC ne concerne pas les organes floraux mais la formation des ovules et est donc légèrement en marge de notre étude et des bases de ce modèle. Des études de plantes mutantes chez *Petunia hybrida* ont montré que, comme les organes floraux, les ovules nécessitent l'expression de différents gènes pour se différencier en ovules. Le gène homologue aux gènes de *Petunia hybrida* chez *A. thaliana* est le gène MADS *SEEDSTICK* (*STK*) qui a donc été ajouté au modèle ABC en une nouvelle classe D nécessaire pour la formation des ovules en association avec la classe C (Angenent et al. 1995; Angenent et Colombo 1996; Theissen et al. 2000) (Figure 5). L'ajout de cette classe n'est pas la raison de l'évolution du modèle ABC en modèle génétique ABC(D)E et en modèle fonctionnel du « Floral Quartet » (Figure 5). En effet, avec le modèle ABC, il est supposé que la feuille soit l'organe de base et que grâce à l'expression des gènes ABC, elle se convertisse en fleur. Il est donc attendu qu'en surexprimant les gènes des classes ABC, on puisse convertir des feuilles en fleurs. Or, la surexpression des gènes *AP1* ou *AG* ne permet pas la conversion de feuille en fleur présentant des sépales ou des carpelles à la place de tous les organes respectivement (Yukiko Mizukami et Ma 1992; Krizek et Meyerowitz 1996; Y. Mizukami et Ma 1997). Ces observations suggèrent qu'un autre facteur est impliqué dans ce modèle. Quelques années plus tard, l'étude d'une famille de gènes MADS appelée *SEPALLATA* (*SEP*), contenant quatre gènes *SEP1-4*, montrent que ces gènes sont nécessaires à la formation des quatre verticilles. Les simples et doubles mutants des gènes SEPs ne présentent pas de phénotypes forts ce qui suppose une forte redondance d'expression et de fonctions entre ces gènes. A l'inverse, les triples mutants *sep1sep2sep3* et quadruple mutants *sep1sep2sep3sep4* ont des organes semblables à des sépales et des feuilles respectivement (Figure 6, S. Pelaz et al. 2000; Ditta et al. 2004).



**Figure 5 : Schéma des modèles génétiques ABC et ABC(D)E et du Floral Quartet Model.** Dans le FQM, les MADS-TFs forment des tétramères et boucle l'ADN en se liant à deux CArG-box surlignées en jaune. Le modèle ABC(D)E montre que les gènes des différentes classes sont nécessaires pour les organes associés.



**Figure 6 : Phénotypes de plantes mutantes des SEPs.** (A-C) Sépales d'une fleur sauvage, d'une fleur triple mutante *sep1sep2sep3* et d'une fleur quadruple mutante *sep1sep2sep3sep4* respectivement d'après Ditta et al. 2004. La flèche jaune montre la présence de trichomes branchés symptomatiques d'organes foliaires.

De même, une plante mutante *SEP1/sep1sep2sep3* présente des organes floraux sauvages mais montre des ovules très affectés (Favaro et al. 2003). La conversion des organes floraux en feuilles chez le quadruple mutant *sep1sep2sep3sep4* et la malformation des ovules chez le mutant *SEP1/sep1sep2sep3* montrent l'implication des gènes SEPs dans les organes formés par les différentes classes A, B, C et D. En confirmation de ces observations, il a été montré que la surexpression conjointe de *SEP3* avec *AG*, *AP3* et *PI* (gènes supposés former les étamines) chez *A. thaliana*, convertit les feuilles en fleur présentant des étamines à la place de tous les organes. De même, les plantes surexprimant *SEP3*, *AP3* et *PI* ou *AP1*, *AP3* et *PI* (gènes supposés former les pétales) montrent des feuilles changées en fleurs présentant des pétales à la place de tous les organes (Honma et Goto 2001). Cette conversion des feuilles en fleur présentant des organes floraux sauvages montre que les gènes SEPs étaient le facteur manquant au modèle de départ pour la formation des organes floraux. Un nouveau modèle génétique naît, le modèle ABC(D)E, dans lequel la classe E est composée des gènes SEPs et nécessaire à la formation de tous les verticilles et au développement des ovules (Figure 5).

### 3. Modèle fonctionnel : modèle protéique du Floral Quartet

Avec ces résultats et ce nouveau modèle génétique se posent de nouvelles questions. Comment quatre gènes peuvent-ils être impliqués tous ensemble simultanément dans la formation d'un organe : par exemple, comment l'expression simultanée des gènes *SEP*, *AG*, *AP3* et *PI* peut-elle déterminer la formation des étamines ? Il est alors imaginé un modèle protéique permettant d'expliquer l'implication simultanée de ces gènes dans la formation des organes floraux, appelé le Floral Quartet Model (FQM) (Theißen et Saedler 2001). Grâce à des données préliminaires d'interactions de protéines, ce modèle a pu naître (Honma et Goto 2001). Dans ce modèle, les protéines codées par les gènes des classes ABC(D)E pourraient interagir entre elles en complexe. Ces complexes seraient constitués de quatre protéines MADS appelés tétramères, quartets ou tétrades et pourraient lier deux CArG-box sur l'ADN (Figure 5). On ne se sait pas encore si le tétramère déjà formé se lie aux deux CArG-box directement ou si deux dimères déjà liés à l'ADN interagissent entre eux et forment un tétramère liant les deux CArG-box. Dans les deux cas, il est supposé que l'ADN « boucle » autour du tétramère formé (Melzer, Verelst, et Theißen 2009). Ces tétramères permettraient de finement réguler l'identité des organes floraux par la spécificité de liaison à l'ADN des différents TFs composant chaque complexe. D'après ce modèle, le tétramère responsable de

l'identité des sépales est composé de SEP/AP1, celui des pétales d'AP1/SEP/AP3/PI, celui des étamines d'AG/SEP/AP3/PI et celui des carpelles de SEP/AG. Il a été montré que SEP3, AG, STK et deux TFs codés par les gènes MADS *SHATTERPROOF1* et 2 peuvent interagir en complexe. Il a donc été imaginé qu'un tétramère formé des TFs SEP, AG, STK et SHP permettent le développement des ovules (Favaro et al. 2003). Ce modèle explique l'importance des SEPs dans tous les verticilles par leur présence dans chaque tétramère formé (Figure 5). L'expression des gènes ABC(D)E, appelés régulateurs ou « directifs », se traduit par l'expression des TFs correspondants et la formation de ces quartets. Ces tétramères déclenchent des programmes de développement bien précis en régulant des gènes spécifiques appelés réalisateurs ou « exécutifs » (García-Bellido 1975). Ces gènes réalisateurs sont ceux qui modèlent minutieusement la formation des organes floraux et ne seront pas détaillés ici.

Ce modèle protéique hypothétique a été largement étayé par la suite par de nombreuses études. Les interactions de chaque TFs impliqués dans le FQM ont été observées en Yeast-Two-Hybrid (Y2H) et Yeast-Three-Hybrid (Y3H) (Honma et Goto 2001; Favaro et al. 2003; de Folter et al. 2005; Immink et al. 2009). La formation des tétramères du FQM et leurs liaisons à l'ADN ont été validées *in vitro* par EMSA en montrant que ces tétramères nécessitent deux CARG box pour leur formation (Melzer, Verelst, et Theißen 2009; Smaczniak, Immink, Muiño, et al. 2012). Il a également été montré que les TFs des tétramères du FQM interagissent *in planta* par immunoprécipitation et chromatographie en phase liquide puis spectrométrie de masse (LC-MS/MS) et que leur interaction est localisée au niveau des méristèmes floraux par Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) (Smaczniak, Immink, Muiño, et al. 2012). Il a aussi été démontré que la formation de tétramères est primordiale dans la morphogénèse florale puisque les plantes *sep1sep2sep3*, exprimant une version de SEP3 fortement affectée dans sa capacité à tétramériser, mais pas à dimériser, présentent une croissance indéterminée des fleurs (Hugouvieux et al. 2018) et les organes floraux sont malformés (Hugouvieux, unpublished).

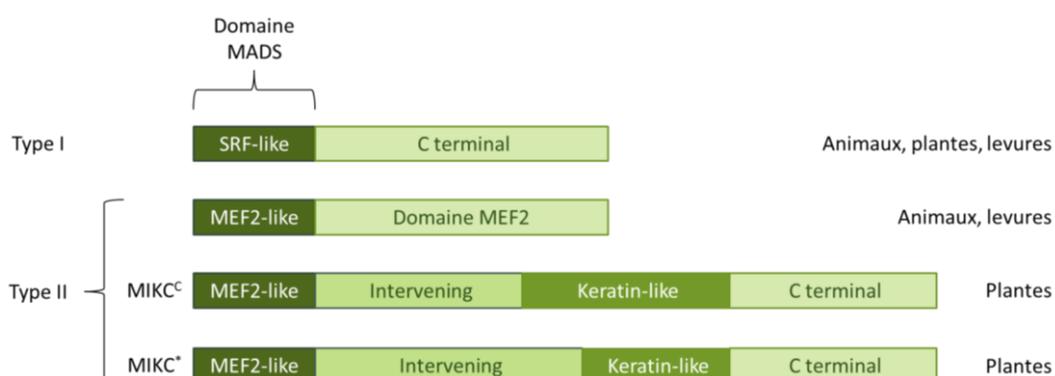
Dans ce modèle, les SEPs semblent jouer un rôle particulier. Ils sont présents dans le tétramère nécessaire pour la formation de chaque organe floral et montrent des propriétés d'interactions différentes des autres MADS-TFs du FQM. En effet, dans les expérimentations de crible de levures décrites précédemment, les SEPs, et plus particulièrement SEP3,

interagissent avec un nombre d'interacteurs MADS très élevé comparés aux autres MADS-TFs testés. Ces interacteurs sont pour la plupart des partenaires MADS-TFs directs dans les tétramères du FQM et dans le développement des ovules ou dans la régulation de la floraison (de Folter et al. 2005; Immink et al. 2009). De plus des études en EMSA ont montré que SEP3 est nécessaire à la formation du tétramère comprenant SEP3/AG/AP3/PI et sans SEP3, le complexe comprenant AG et AP3/PI ne se forme pas (Melzer et Theißen 2009; Smaczniak, Immink, Muiño, et al. 2012; Jetha, Theißen, et Melzer 2014). Des observations similaires en Y2H ont montré que SEP3 est nécessaire pour la formation d'un complexe contenant AG/STK ou AG/SHP (Favaro et al. 2003). Avec ces observations, plusieurs études suggèrent que les SEPs, et notamment SEP3, auraient des propriétés structurales permettant de faciliter la tétramérisation avec d'autres MADS (Immink et al. 2009; Melzer et Theißen 2009; Jetha, Theißen, et Melzer 2014; Lai et al. 2019).

Pour comprendre comment ces interactions complexes (dimère, tétramère, liaison à l'ADN et bouclage de l'ADN) sont possibles et pourquoi SEP3 semble comporter ces propriétés particulières, nous allons maintenant nous intéresser à la structure des MADS-TFs.

### C. Les différents types de MADS-TFs et la structure des MADS-TFs du FQM

Pour construire et rédiger cette partie, je me suis largement inspiré d'une revue à laquelle j'ai participé et que notre équipe a publiée en 2019 (Lai et al. 2019). J'ai décidé d'en reprendre ici les grands axes. Il existe différents types de MADS-TFs : les MADS-TFs de type I et II qui ont été regroupés en fonction de la conservation de séquence de leur domaine MADS (domaine M) (Figure 7).



**Figure 7 : Structures schématisées des différents types des MADS-TFs de type I et II.** Les différents domaines ne sont pas à l'échelle.

## 1. Les MADS-TFs de type I

Les MADS-TFs de type I sont présents chez les animaux, les levures et les plantes. Les MADS-TFs de type I jouent des rôles importants chez *A. thaliana* dans le développement et la spécification des gamétophytes et de l'embryon ainsi que dans le développement de l'endosperme (*AGL23*, *DIA*, *AGL62*, *AGL80* et *PHE1* décrits dans la Figure 1) (Masiero et al. 2011). Ils comprennent le domaine MADS et un autre domaine Carboxy-terminal (C-terminal) peu structuré et non conservé entre les espèces. Leur domaine M est très semblable au domaine M de SRF (Serum Response Factor, MADS-TF trouvé chez l'humain) ce qui a permis leur regroupement (Figure 8) (Alvarez-Buylla et al. 2000). Les MADS-TFs de type I sont subdivisés en trois sous-groupes M $\alpha$ , M $\beta$  et M $\gamma$  basés sur les analyses phylogénétiques de leur séquence (Pařenicová et al. 2003). Ils ont été bien moins étudiés que les MADS-TFs de type II et ne seront pas plus développés ici car ils ne sont pas pertinents dans notre étude.

TYPE I MADS-DOMAINS	
AGL36	MQMKKVKLSLIANERSRKTSTFKRKKDGFKKLHELSTLCCVQACALIYSPFIPVPESWPS
AGL38	M-KRKMKLSLIENSVSRKTTFTKRRKGMTKKLTTELVTLCGVVACAVVYSPFNISPEAWPS
AGL37	M-RGKMKLSFIENDSVRKTFTFKRKKGMLKKFNELVTLCVVDACAVIRSPYNSIQEPWPS
AGL35	R-QKVKMTFIENETARKSTFKRKKKGLLKKAEELGILCGVPIFAVNSPYELNPEWPS
SRF_Hs	RGRVKIKMEFIDNKLRRYTTFSKRKTGIMKKAYELSTLTGTQVLLLVASETGHVYTFATR
DSRF	KGRVKIKMEYIDNKLRRYTTFSKRKTGIMKKAYELSTLTGTQVMLLVASETGHVYTFATR
Col1	KGRVKIKMEYINNKLRRYTTFSKRKTGIMKKAFELSTLTGTQVMLLVASETGHVYTYATP
MCM1	KERRKIEIKFIENKTRRHVTFFSKRKKGIMKKAFELSVLTGTQVLLLVYSETGLVYTFSTP
TYPE II MADS-DOMAINS	
AGL14	MGRGKIEMKRIENATSRQVTFFSKRRNGLLKKAFELSVLCDAEVALIIFSPRGKLYEFSSS
AGAMOUS	SGRGKIEIKRIENTTNRQVTFCKRRNGLLKKAYELSVLCDAEVALIVFSSRGRLYEYSHH
AGL4	MGRGRVELKRIENKINRQVTFKRRNGLLKKAYELSVLCDAEVELIIVFSNRGKLYEFCST
AGL13	MGRGKVEVKRIENKITRQVTFFSKRRSGLLKKAYELSVLCDAEVELIIFSTGGKLYEFSNV
APETALA1	MGRGRVQLKRIENKINRQVTFFSKRRAGLLKKAHEISVLCDAEVALVVFSSRGGKLYEYSTD
AGL12	MARGKIQLKRIENPVHRQVTFCKRRTGLLKKAKELSVLCDAEIGVVIIFSPQKLFELATK
ANR1	MGRGKIVIRRIDNSTSRQVTFFSKRRSGLLKKAKELSVLCDAEVGVVIIFSSGKLYDYASH
AGL22	MAREKIQIRKIDNATARQVTFFSKRRNGLFKKAEELSVLCDAADVALIIFSSGKLFYFCSS
AGL25	MGRKLEIKRIENKSSRQVTFFSKRRNGLIEKARQLSVLCDAASVALLVVSASGKLYSFS
AGL15	MGRGKIEIKRIENANRQVTFFSKRRSGLLKKAHEISVLCDAEVAIVVFSSRGGKLYEYSS-
APETALA3	MARGKIQIKRIENQTNRQVTFYSKRRNGLFKKAHELTVLCDAARVSIIMFSSSNKLYEYISP
MEF2A_Hs	MGRKKIQITRIDERNRQVTFTRKRFGLMCKAYELSVLCDCIETALIIFNHNSNKLQYAST
MEF2C_Hs	MGRKKIQITRIDERNRQVTFTRKRFGLMCKAYELSVLCDCIETALIIFNHNSNKLQYAST
MEF2D_Hs	MGRKKIQIQRITDERNRQVTFTRKRFGLMCKAYELSVLCDCIETALIIFNHNSNKLQYAST
CEMEF2	MGRKKIQITRIQDERNRQVTFTRKRFGLMCKAYELSVLCDCIETALIVFNHNSNKLQYAST
MEF2B_Hs	MGRKKIQISRIDQRNRQVTFTRKRFGLMCKAYELSVLCDCIETALIIFNHNSNKLQYAST
DMEF2	MGRKKIQISRIDERNRQVTFNKRKFGVMCKAYELSVLCDCIETALIIFNHNSNKLQYAST
RIM1_Sc	MGRKIEIQRISDDRNRAVTFTRKRFGLMCKAYELSVLCQVDIARVILGNSNTFYEFSSV

Figure 8 : Alignements de séquences des domaine MADS des MADS de type I et II ayant permis de les regrouper d'après Alvarez-Buylla et al. 2000. Les séquences écrites en vert ou en rouge proviennent de protéines de plantes ou d'animaux et levures respectivement. Les acides aminés conservés au sein d'un type de MADS sont colorés en rouge.

## 2. Les MADS-TFs de type II

Les MADS-TFs de type II ont été regroupés par la séquence de leur domaine M très semblable à celle de Myocyte Enhancer Factor 2 (MEF2, MADS-TF identifié chez les animaux et les levures, Figure 8) (Alvarez-Buylla et al. 2000). Chez les animaux et les levures, ces MADS sont composés du domaine M semblable à celui de la protéine MEF2 et d'un domaine conservé impliqué dans la dimérisation (Figure 7, McDermott et al. 1993; Shore et Sharrocks 1995). Chez les plantes, les MADS de type II se sont complexifiés : le domaine M semblable à celui de MEF2 est également suivi d'un domaine impliqué dans la dimérisation (I), lui-même suivi des domaines K et C (Alvarez-Buylla et al. 2000; Theißen, Melzer, et Rümpler 2016) (Figure 7). On les appelle ainsi MADS MIKC.

### a. Les MADS-TFs MIKC

Les MADS-TFs MIKC ne se trouvent que chez les plantes et ont été nommés ainsi en référence à leurs quatre domaines : domaine M pour MADS, domaine I pour Intervening domain, domaine K pour Keratin-like domain et domaine C pour Carboxy-terminal domain. Il existe deux types de MADS-TFs MIKC, les MADS-TFs MIKC<sup>C</sup> pour « classiques » et les MADS-TFs MIKC\*, qui présentent des différences majoritairement dans leur domaine I même si certaines particularités sont observées dans les domaines K (Figure 7, Henschel et al. 2002). Chez les MADS-TFs MIKC\*, le domaine I est plus long que chez les MADS-TFs MIKC<sup>C</sup> (au moins 30 acides aminés de plus) et le domaine K semble contenir plusieurs insertions d'acides aminés changeant les propriétés physico-chimiques de ce domaine par rapport aux MADS-TFs MIKC<sup>C</sup>. Ces observations ont été faites chez la bryophyte *Physcomitrella patens* et les MADS-TFs MIKC\* sont peu connus chez les angiospermes (Becker et Theissen 2003). Les trois MADS MIKC\* étudiés chez *A. thaliana* (*AGL65*, *AGL66* et *AGL104* décrits dans la Figure 1) sont impliqués dans la maturation du pollen et dans la croissance du tube pollinique (Adamczyk et Fernandez 2009). Tous les MADS-TFs présentés dans le FQM sont de type MADS-TFs MIKC<sup>C</sup> et leur structure sera détaillée ci-dessous.

## 3. Structure des MADS-TFs MIKC<sup>C</sup> du FQM

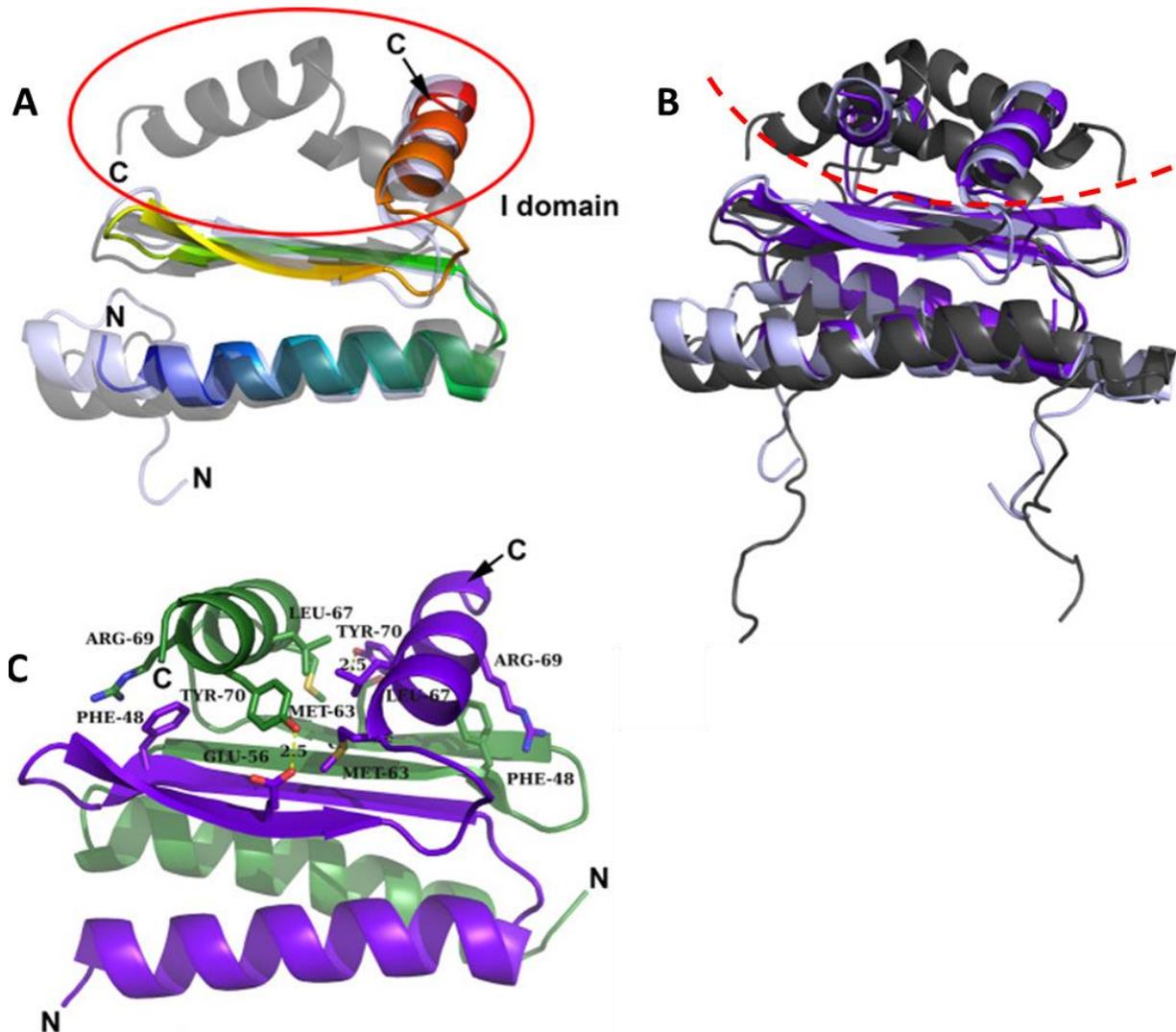
Les MADS-TFs MIKC<sup>C</sup> ne sont présents que chez les plantes chez lesquelles ils se sont multipliés et diversifiés pour former une famille nombreuse et jouant un rôle important dans multiples étapes clefs du développement (Alvarez-Buylla et al. 2000; Gramzow, Ritz, et Theissen 2010). En effet, ils sont impliqués dans la croissance des feuilles, la spécification de l'identité du

méristème, la transition florale, la floraison, le développement des ovules, de la graine et des fruits, la maturation des fruits, le développement des racines et dans d'autres processus du développement (Figure 1) (revus dans Smaczniak, Immink, Angenent, et al. 2012). C'est grâce à leur structure en 4 domaines que les MADS-TFs MIKC<sup>C</sup> peuvent former des tétramères et se lier à deux CA<sub>R</sub>G box en même temps, comme supposé dans le FQM (Melzer, Verelst, et Theißen 2009; Thangavel et Nayar 2018). Pour des raisons de simplicité, les MADS-TFs MIKC<sup>C</sup> seront désormais notés MADS-TFs.

#### a. Le domaine M de liaison à l'ADN

Le domaine M est composé de 55 à 60 acides aminés et la plupart de ces MADS-TFs contiennent une séquence prédite de localisation nucléaire (Dingwall et Laskey 1991; Krizek et Meyerowitz 1996). Comme nous l'avons dit précédemment, le domaine M est le domaine de liaison à l'ADN (Pellegrini, Tan, et Richmond 1995; Shore et Sharrocks 1995) mais il ne semble pas primordial pour la spécificité de liaison. En effet, des expériences d'échanges de la deuxième moitié des domaines M (acides aminés 27 à 57 : G à Y) de SRF ou MEF2 avec ceux d'AP1, AP3, PI et AG ont montré que la spécificité de liaison à l'ADN ne semble pas dépendante du domaine M *in vivo*. Riechmann et Meyerowitz ont remplacé la deuxième moitié du domaine M d'AP1, AP3, PI et AG par ceux de SRF et MEF2 et ont exprimé ces gènes chimères chez *A. thaliana*. La surexpression de ces gènes chimères reproduit le phénotype obtenu par la surexpression des gènes sauvages chez des plantes sauvages et chez des plantes *ap1-1*, *ap3-3*, *pi-1*, et *ag-3* respectivement (Riechmann et Meyerowitz 1997). Ces expériences suggèrent que le domaine M serait important pour lier l'ADN mais pas pour la spécificité de liaison.

Très récemment, la première structure de domaine M (et I) d'un MADS-TF de plante a été caractérisée par notre équipe (Lai et al. 2021). Cette structure du dimère MI de SEP3 montre que le domaine M est composé d'une région N-terminale désordonnée puis d'une hélice  $\alpha$  et de deux feuillets  $\beta$  antiparallèles (Figure 9.A). Cette structure de SEP3MI sans ADN montre une similitude de séquence tertiaire très forte avec les domaines M de MEF2A et SRF (7NB0 et 1HBX, respectivement) (Figure 9.B) comme prédit d'après la conservation de séquence entre les domaines M de ces protéines.



**Figure 9 : Structures des domaines MI de SEP3 et des protéines MEF2B et SRF d'après Lai et al. 2021. (A)** Structures de SEP3 MI (7NB0, arc-en-ciel) et SRF (1HBX, gris). La région de domaine I est entourée en rouge. **(B)** Structures des dimères de SEP3 MI (violet foncé), MEF2A (3KOV, violet clair) et SRF (gris-noir). Les domaines M (sous les pointillés rouges) sont extrêmement semblables entre les trois dimères alors que les domaines I et C terminaux (au-dessus des pointillés rouges) varient entre SRF et SEP3/MEF2A. **(C)** Structure du dimère de SEP3 MI. Les acides aminés importants pour l'interaction entre les domaines I et entre les domaines M et I des deux monomères (vert et violet) sont annotés.

#### b. Le domaine I : spécificité de dimérisation et de liaison à l'ADN

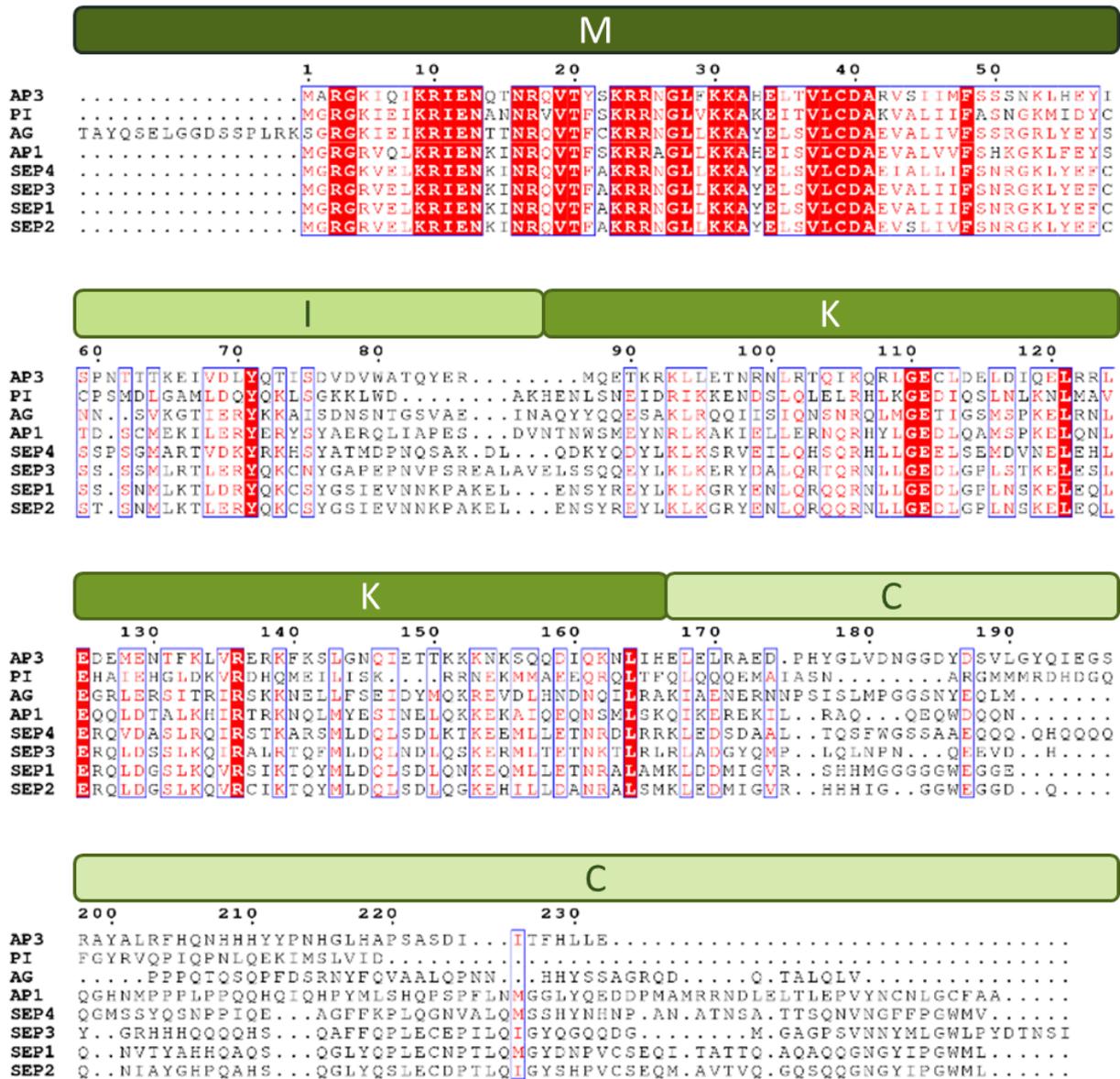
Le domaine I est un petit domaine de 25 à 30 acides aminés liant les domaines M et K (Figure 10). L'implication du domaine I dans la spécificité de dimérisation a été démontrée dans plusieurs études. En effet, des études d'échanges de résidus (déterminés par analyses informatiques) entre les domaines I de SOC1 et AGAMOUS-LIKE 14 (AGL14) montrent que le domaine I est primordial pour la spécificité de dimérisation. En Y2H, SOC1 perd de nombreuses interactions lorsque l'on échange les acides aminés importants de son domaine I avec celui d'AGL14 alors qu'inversement, ce dernier gagne de nouvelles interactions lorsque les acides

aminés de SOC1 lui sont substitués (van Dijk et al. 2010). Des observations similaires ont été obtenues en substituant le domaine I d'AG par celui d'AP1 (Lai et al. 2021).

En influençant la spécificité d'interaction, le domaine I semble influencer la liaison à l'ADN. En effet, des expériences d'EMSA montrent que des échanges des domaines I entre les MADS-TFs AP1, AP3, PI et AG altèrent leur capacité d'interaction et/ou de liaison à l'ADN (Riechmann, Krizek, et Meyerowitz 1996). Ces résultats ont été confirmés récemment par notre équipe. Il a été prouvé par co-immunoprécipitation (co-IP) et EMSA que le domaine I est nécessaire pour la liaison à l'ADN mais moins important pour la dimérisation puisqu'il est possible d'immunoprécipiter un hétérodimère SEP3M/AGM mais que la liaison à l'ADN de ce dernier est très faible (Lai et al. 2021). L'ensemble de ces résultats indiquent que le domaine I serait donc un liant très puissant capable de stabiliser et de spécifier la dimérisation des MADS-TFs et ainsi d'influencer la liaison et la spécificité de liaison à l'ADN.

Des données *in planta* ont confirmé l'importance du domaine I d'AP1 dans son rôle dans la morphogénèse florale. En effet, des plantes mutantes *ap1* qui expriment AG dont le domaine I est celui d'AP1 ( $AG^{IAP1}$ ) sont quasiment complémentées, alors que les autres domaines testés (M et KC) complètent très faiblement le phénotype d'*ap1* (Lai et al. 2021). Ces résultats indiquent que le domaine I serait déterminant dans l'interaction avec d'autres partenaires et ainsi dans la liaison à l'ADN d'AP1.

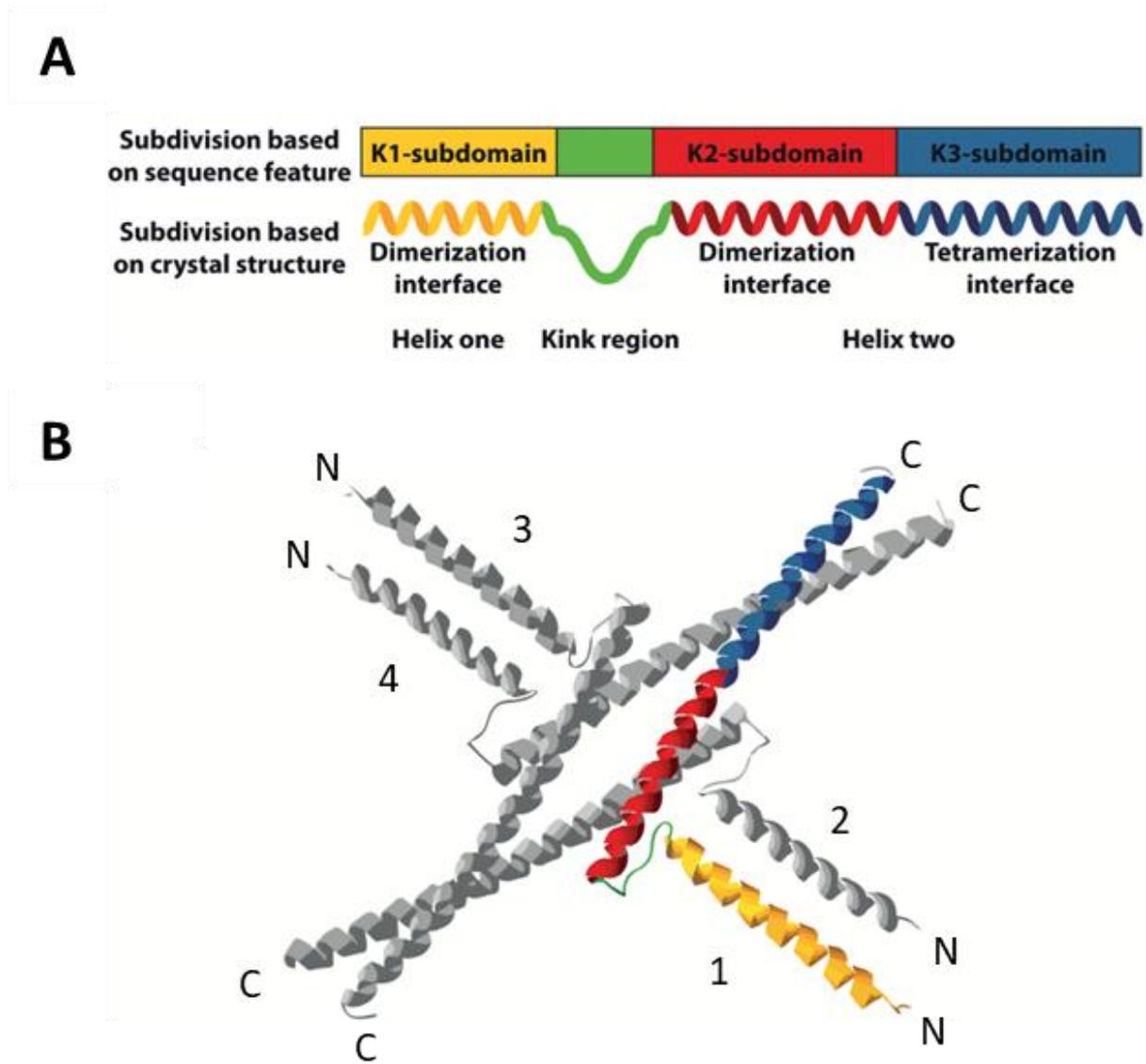
Ces deux propriétés peuvent être en partie expliquées par la structure de SEP3MI caractérisée récemment (Lai et al. 2021). Le domaine I de SEP3 comprend une hélice  $\alpha$  perpendiculaire aux feuillets  $\beta$  du domaine M (Figure 9). Les EMSAs et les expérimentations de stabilité thermique de différents mutants (R69P, R69L et Y70E) de l'hélice  $\alpha$  du domaine I de SEP3 montrent que les dimères de ces protéines ne peuvent plus lier l'ADN et qu'ils sont moins stables que les dimères de SEP3MI (Figure 9.C). Ces acides aminés sont donc primordiaux pour la stabilité du dimère et sa liaison à l'ADN. De plus, l'hélice  $\alpha$  du domaine I de SEP3 réalise de nombreuses interactions avec les feuillets  $\beta$  du domaine M stabilisant très sûrement le dimère et pouvant peut-être moduler la conformation de ces feuillets, changeant la spécificité de liaison à l'ADN (Figure 9.C) (Lai et al. 2021).



**Figure 10 : Alignement des séquences protéiques des MADS-TFs présents dans le FQM.** Les domaines MIKC annotés correspondent aux domaines de SEP3. Les différentes teintes de vert symbolisent les pourcentages d'identité des domaines, le plus foncé étant le plus conservé.

### c. Le domaine K : clé de l'oligomérisation des MADS-TFs

Le domaine K est un domaine d'oligomérisation d'environ 80 acides aminés situé après le domaine I (Figure 10). Les prédictions de structure secondaire ont décomposé le domaine K en trois hélices  $\alpha$  K1, K2 et K3 (colorées en jaune, rouge et bleue respectivement sur la Figure 11) et une zone de rupture entre les hélices  $\alpha$  K1 et K2 que nous appellerons « pont » (« kink » coloré en vert sur la Figure 11) (Y. Yang et Jack 2004).



**Figure 11 : Schéma des hélices  $\alpha$  présentes dans le domaine K de SEP3 et structure d'un homotétramère du domaine K de SEP3 d'après Puranik et al. 2014; Rümpler, Theißen, et Melzer 2018. (A) Divisions du domaine K de SEP3 basées sur des prédictions de structure secondaire (haut) et sur la structure caractérisée (bas). (B) Structure d'un homotétramère du domaine K de SEP3. Les quatre monomères sont numérotés, le monomère 1 est entièrement coloré (jaune, rouge et bleu) et les trois autres monomères sont colorés en gris. Deux monomères (1 et 2) interagissent ensemble grâce à l'hélice une (jaune) et à la première moitié de l'hélice deux (rouge). Les deux dimères (1 et 2 avec 3 et 4) interagissent ensemble grâce à la deuxième moitié de l'hélice deux (bleue). Les extrémités N et C-terminales sont annotées pour chaque monomère.**

i. Le domaine K, interface de dimérisation et de tétramérisation primordiale pour la formation des organes floraux

Les études sur le domaine K ont montré qu'il est impliqué dans la dimérisation et la tétramérisation des MADS. Les études de dimérisation ont été réalisées sur AP3 et PI car ce sont des dimères obligatoires. Après avoir réalisé différentes délétions des domaines K d'AP3

et PI, la capacité d'interaction des mutants a été testée en Y2H et montre que les hélices  $\alpha$  K1 et K2 ainsi que la région de pont sont impliquées dans la dimérisation d'AP3/PI. L'étude de mutations simples d'AP3 et PI a montré que la dimérisation était largement dépendante des acides aminés hydrophobes présents dans ces hélices  $\alpha$ . Différents mutants montrant des réductions d'interaction ont été surexprimés chez *A. thaliana* et ne reproduisent pas les phénotypes des plantes surexprimant les versions sauvages des gènes respectifs montrant l'importance de la dimérisation pour la morphogénèse florale (Y. Yang, Fanning, et Jack 2003) (Figure 11.A).

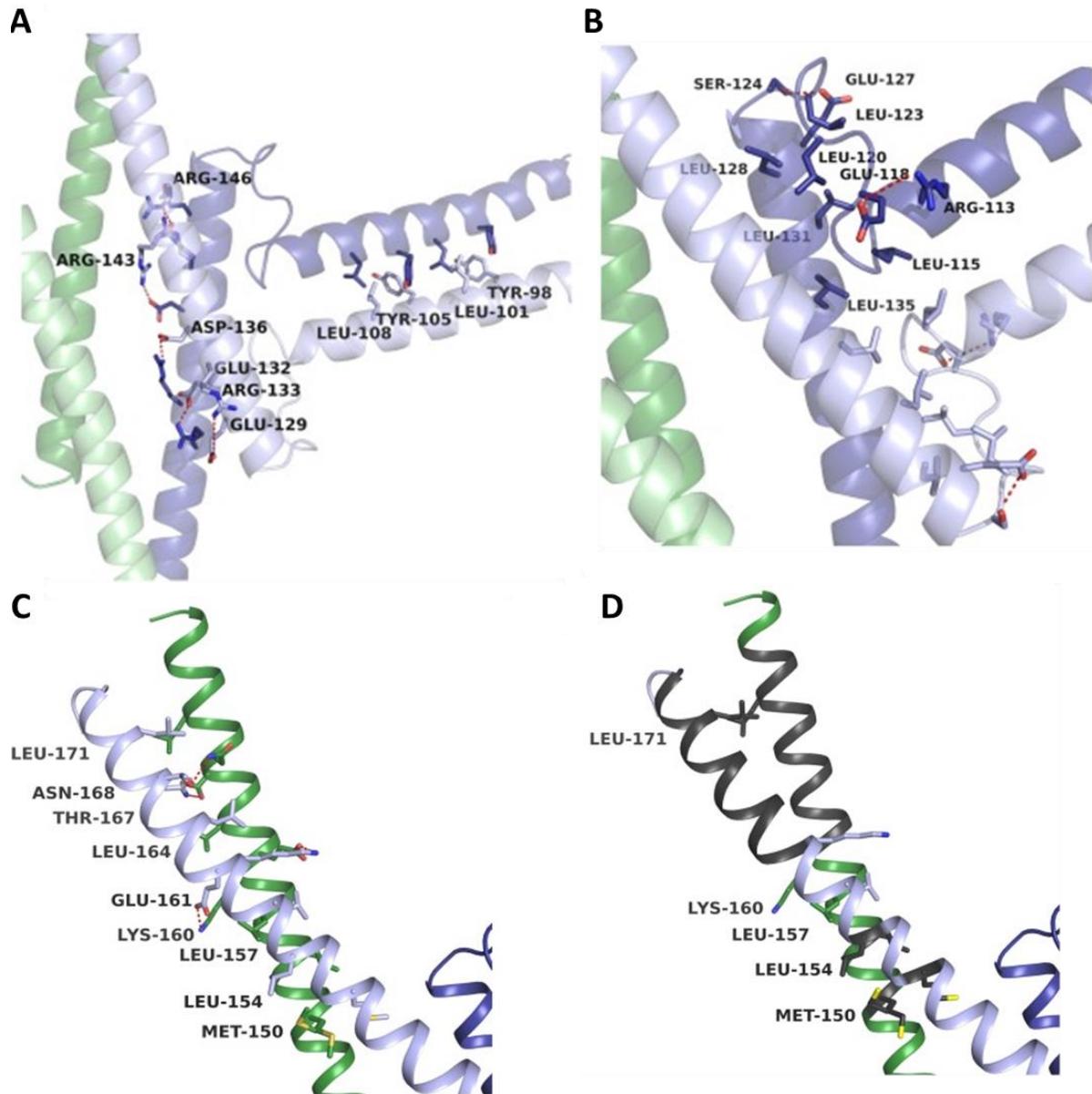
La zone de pont (acides aminés 115 à 125 chez SEP3) est donc capitale puisqu'elle est impliquée dans la dimérisation et la tétramérisation. En effet, cette zone contient plusieurs acides aminés hydrophobes importants pour l'interaction mais aussi un résidu glycine. Cet acide aminé semble comporter une structure particulière permettant une rupture du motif hélicoïdal entre les deux hélices et une flexibilité de ces deux hélices (Y. Yang, Fanning, et Jack 2003).

En reproduisant le même schéma expérimental que pour la zone de dimérisation avec des tests d'interaction en Y3H, il a été montré que les domaines K2 et K3 ainsi que les acides aminés présents dans le pont d'AP3, PI et des SEPs sont nécessaires pour la tétramérisation (Figure 11.A) (Y. Yang et Jack 2004).

La structure de la totalité du domaine K de SEP3 a été caractérisée par notre équipe en 2014 (Puranik et al. 2014) (Figure 11.B et Figure 12) avec les acides aminés 75 à 178 de SEP3 incluant ainsi la moitié du domaine I (acides aminés 75 à 90) et cinq acides aminés du domaine C (acides aminés 174 à 178). Cette structure a permis de confirmer certaines observations vues précédemment et d'en nuancer d'autres. En effet, la structure publiée du domaine K de SEP3 montre qu'il n'y a en fait que deux hélices  $\alpha$  : la première impliquée totalement dans la dimérisation et la deuxième impliquée dans la dimérisation (première moitié de l'hélice  $\alpha$ ) et la tétramérisation (deuxième moitié de l'hélice  $\alpha$ ) (Figure 11.B et C) (Puranik et al. 2014).

Ces observations ont été largement confirmées par des études de mutagenèse sur SEP3 suivies d'EMSA et de formation d'homocomplexes de SEP3 par SEC et détermination du degré d'oligomérisation. En effet, les mutations des acides aminés hydrophobes de la première hélice  $\alpha$  (Y98 et Y105, Figure 12.A) et de la première moitié de la seconde hélice  $\alpha$  du domaine

K (L115, L131 et L135, Figure 12.A et B) affectent grandement la dimérisation (Puranik et al. 2014; Silva et al. 2016; Rümpler, Theißen, et Melzer 2018).



**Figure 12 : Structure et acides aminés des zones de dimérisation et de tétramérisation du domaine K de SEP3. (A)** Acides aminés impliqués dans la dimérisation de SEP3 d’après Puranik et al. 2014. **(B)** Acides aminés impliqués dans la région de pont de SEP3 d’après Puranik et al. 2014. **(C)** Acides aminés impliqués dans la tétramérisation de SEP3 d’après Puranik et al. 2014. **(D)** SEP3<sup>Δ161-174</sup>, variant d’épissage de SEP3 ayant une délétion entre les acides aminés 161 et 174 colorés en noir d’après Puranik et al. 2014.

La structure publiée a confirmé l’importance des deux résidus glycine mais aussi d’une proline présente dans la zone de pont de SEP3 (Figure 12.B). Ces trois acides aminés permettent une rupture du motif hélicoïdal et les glycines apportent également une flexibilité aux deux hélices  $\alpha$ . Ce phénomène empêche les hélices  $\alpha$  d’un même monomère d’interagir entre elles mais

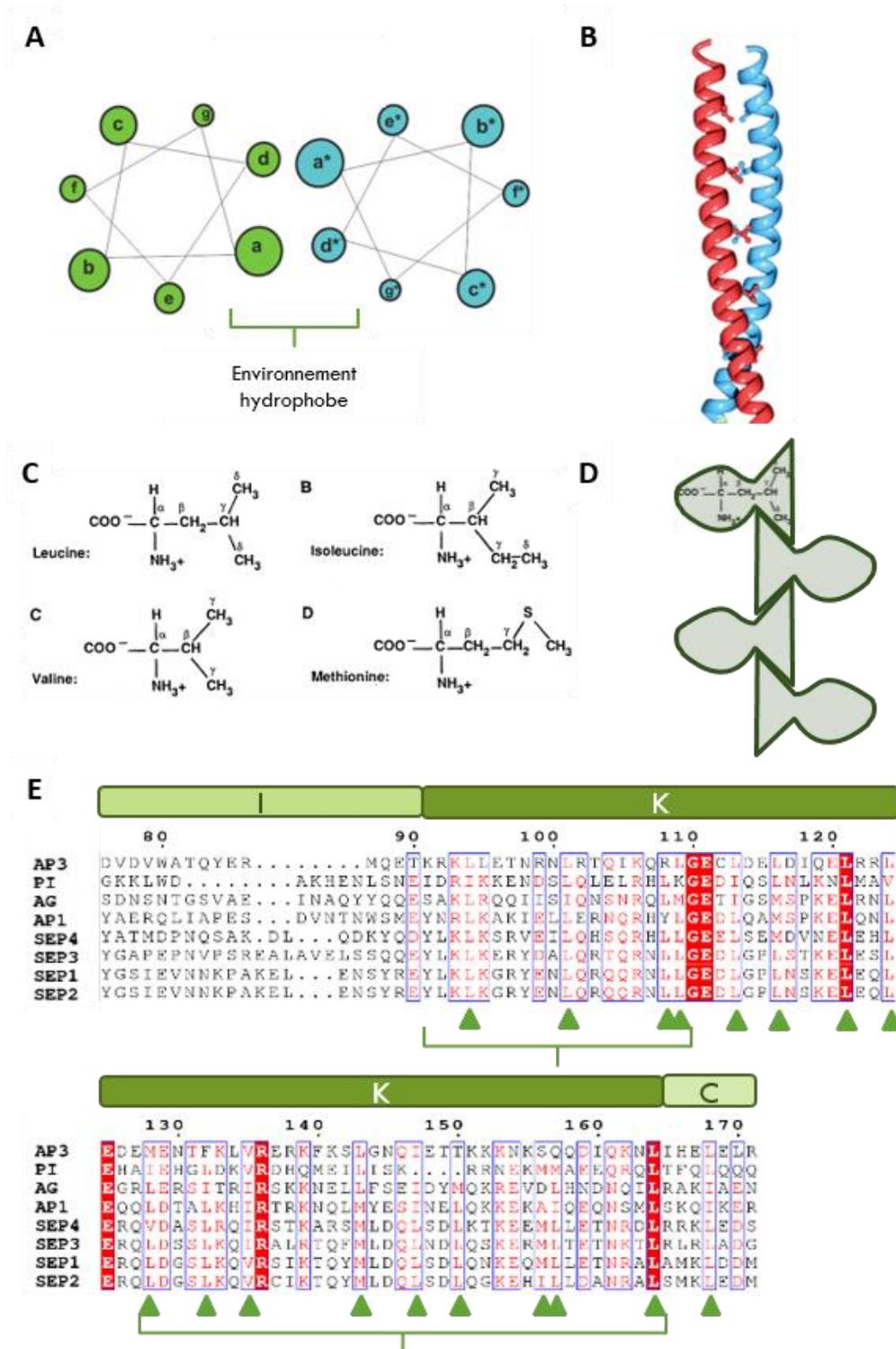
leur permet d'être suffisamment mobiles pour créer des zones de dimérisation et de tétramérisation (Y. Yang, Fanning, et Jack 2003; Y. Yang et Jack 2004; Puranik et al. 2014; Lai et al. 2019).

La zone de tétramérisation a été réduite à la deuxième moitié de la seconde hélice  $\alpha$  de SEP3 (Melzer et Theißen 2009; Puranik et al. 2014). De même que pour la dimérisation, de nombreuses études de mutagenèses suivies d'EMSA ou de formation d'homocomplexes de SEP3 par SEC confirment l'importance des acides aminés hydrophobes (M150, L154, L157, L164 et L171, Figure 12.C) dans la tétramérisation (Puranik et al. 2014; Rümpler, Theißen, et Melzer 2018; Hugouvieux et al. 2018). Cette tétramérisation est primordiale *in vivo* puisqu'un variant d'épissage de SEP3 ne comportant pas les acides aminés 161 à 174 (SEP3 $\Delta$ 161-174, Figure 12.D) est affecté dans sa tétramérisation et ne peut pas restaurer la croissance déterminée de la fleur lorsqu'il est exprimé dans un triple mutant *sep1sep2sep3* (Hugouvieux et al. 2018).

D'autres acides aminés, non hydrophobes, jouent un rôle également dans l'interaction (Figure 12). En effet, des acides aminés chargés comme l'asparagine, la lysine, l'acide glutamique ou la thréonine peuvent renforcer les interactions hydrophobes (Y. Yang, Fanning, et Jack 2003; Y. Yang et Jack 2004; Puranik et al. 2014).

#### ii. Le domaine K est une zone propice aux interactions en leucine-zipper

L'importance des acides aminés hydrophobes et spécifiquement des leucines dans les interactions du domaine K montre que ce domaine réalise des interactions en leucine-zipper (glissière à leucines ou fermeture éclair de leucines). Les leucine-zipper sont des interactions de deux hélices  $\alpha$  composées de répétitions d'heptades d'acides aminés (notés abcdefg pour les positions 1234567) comportant des leucines en position a et d (Landschulz, Johnson, et McKnight 1988). Au sein d'une hélice  $\alpha$ , les acides aminés sont orientés vers l'extérieur de l'hélice  $\alpha$  et un tour d'hélice  $\alpha$  correspond à approximativement 3,6 acides aminés et deux tours à environ 7,2 acides aminés. Ainsi, les acides aminés aux positions a et d des répétitions d'heptades sont exposés du même côté de l'hélice  $\alpha$  (Figure 13.A). Si les acides aminés à ces positions sont hydrophobes (comme les leucines), l'exposition de ces acides aminés du même côté de l'hélice  $\alpha$  crée un environnement hydrophobe (Figure 13.A). Deux hélices  $\alpha$  présentant ces mêmes environnements hydrophobes peuvent interagir en s'enroulant entre elles et forment un coiled-coil (superhélice ou bobines enroulées) (Figure 13.B) (Crick 1952; 1953; Pauling et Corey 1953).



**Figure 13 : Modèles et structures des interactions en coiled-coil et leucine-zipper. (A)** Modèle d'une interaction en coiled-coil entre deux hélices  $\alpha$  de deux protéines différentes d'après Härmä et al. 2018. Les acides aminés hydrophobes (a et d) forment un environnement hydrophobe propice à l'interaction des deux hélices. **(B)** Structure d'une interaction en coiled-coil d'après Yin et al. 2017. **(C)** Formules semi développées des acides aminés hydrophobes d'après Landschulz, Johnson, et McKnight 1988. **(D)** Schéma d'une interaction en leucine-zipper. **(E)** Alignement de séquences du domaine K cristallisé de SEP3 avec les domaines équivalents des autres MADS-TFs du FQM. Les domaines IKC annotés correspondent aux domaines de SEP3. Les flèches et accolades vertes montrent les acides aminés hydrophobes conservés et les zones propices aux interactions coiled-coil respectivement.

Les interactions en leucine-zipper forment des coiled-coil particulièrement forts grâce à la structure spécifique des leucines. En effet, les leucines sont très hydrophobes et, comparées aux autres acides aminés hydrophobes (valine, isoleucine et méthionine, Figure 13.C), la chaîne carbonée des leucines est longue et élargie à la pointe grâce aux deux groupements méthyles symétriques du carbone  $\gamma$  (Figure 13.C). Quand les leucines sont en position a et d, cette forme particulière permet une interdigitation des groupements méthyles entre eux à la manière d'une fermeture éclair, d'où le nom de leucine-zipper (Figure 13.D). Cette interdigitation renforce donc l'environnement déjà hydrophobe et confère une force supplémentaire pour l'interaction.

Les autres acides aminés présents dans les heptades peuvent également jouer des rôles dans l'interaction : les acides aminés chargés e et g peuvent réaliser des interactions électrostatiques avec les acides aminés g' et e' de l'autre protéine respectivement et les acides aminés b, c et f stabilisent l'interaction en étant hydrophiles et opposés à la zone hydrophobe (Figure 13.A) (O'Shea, Lumb, et Kim 1993; Arndt et al. 2002) . C'est le cas des acides aminés asparagine, lysine, acide glutamique et thréonine que nous avons cités précédemment dans la dimérisation et la tétramérisation de SEP3.

Certains outils de prédiction d'interaction en coiled-coil montrent que tous les MADS-TFs du FQM comportent des zones propices aux interactions en coiled-coil et surtout en leucine-zipper entre les acides aminés 110 et 160 correspondant au domaine K (Lai et al. 2019). Cette zone englobe les interfaces de dimérisation et de tétramérisation des MADS-TFs (Figure 13.E).

#### d. Le domaine C-terminal, un domaine de régulation des gènes très peu structuré

Le domaine C-terminal des MADS-TFs est un domaine très variable en termes de séquences primaire qui ne comporte pas de structure secondaire particulière (Figure 10). Le domaine C semble avoir des importances et des rôles différents selon les MADS-TFs. En effet, le domaine C d'AP3 et PI ne semble pas important pour leur fonction dans la morphogénèse florale puisque des versions de ces gènes sans leur domaine C peuvent compléter les mutants *ap3* et *pi* respectivement (Piarzyk, Yang, et Jack 2007). Chez d'autres MADS-TF, certains petits motifs ont été observés et pourraient jouer des rôles dans l'activation ou la répression de gènes directement ou par le recrutement ou l'interaction avec d'autres protéines. Le

domaine C-terminal d'AP1 contient deux petits motifs riches en glutamines et en acides aminés acides respectivement. Ces deux motifs seraient nécessaires simultanément pour l'activation de gènes par AP1 (S. Cho et al. 1999). D'autres études ont montré que les domaines C de SEP3 et AP1 sont associés à l'activation de certains gènes (Honma et Goto 2001; Kaufmann et al. 2009). Les mécanismes moléculaires par lesquels le domaine C active l'expression des gènes n'ont pas été élucidés ; il est donc impossible de prévoir si ces activations sont directes ou indirectes. En revanche, il a été observé que le domaine C peut interagir avec des répresseurs de l'expression de gènes. En effet, le motif EAR (ethylene-responsive element binding factor-associated amphiphilic repression) est un motif impliqué dans la répression transcriptionnelle (Kagale et Rozwadowski 2010). Ce motif EAR présente une séquence consensus LxLxL ou DLNxxP présente dans le domaine C de nombreux MADS-TFs chez *A. thaliana* tels que SEP3, AP1 et CAULIFLOWER (CAL) (Kagale, Links, et Rozwadowski 2010). De même, les domaines C de SEP3 et AP1 sont nécessaires pour interagir avec le complexe SEUSS-LEUNIG, SEUSS étant un corépresseur (Sridhar, Surendrarao, et Liu 2006). Le domaine C des MADS-TFs reste quelque peu énigmatique du fait de sa non-conservation et des fonctions spécifiques qu'il pourrait avoir pour chaque MADS-TF.

---

### En résumé

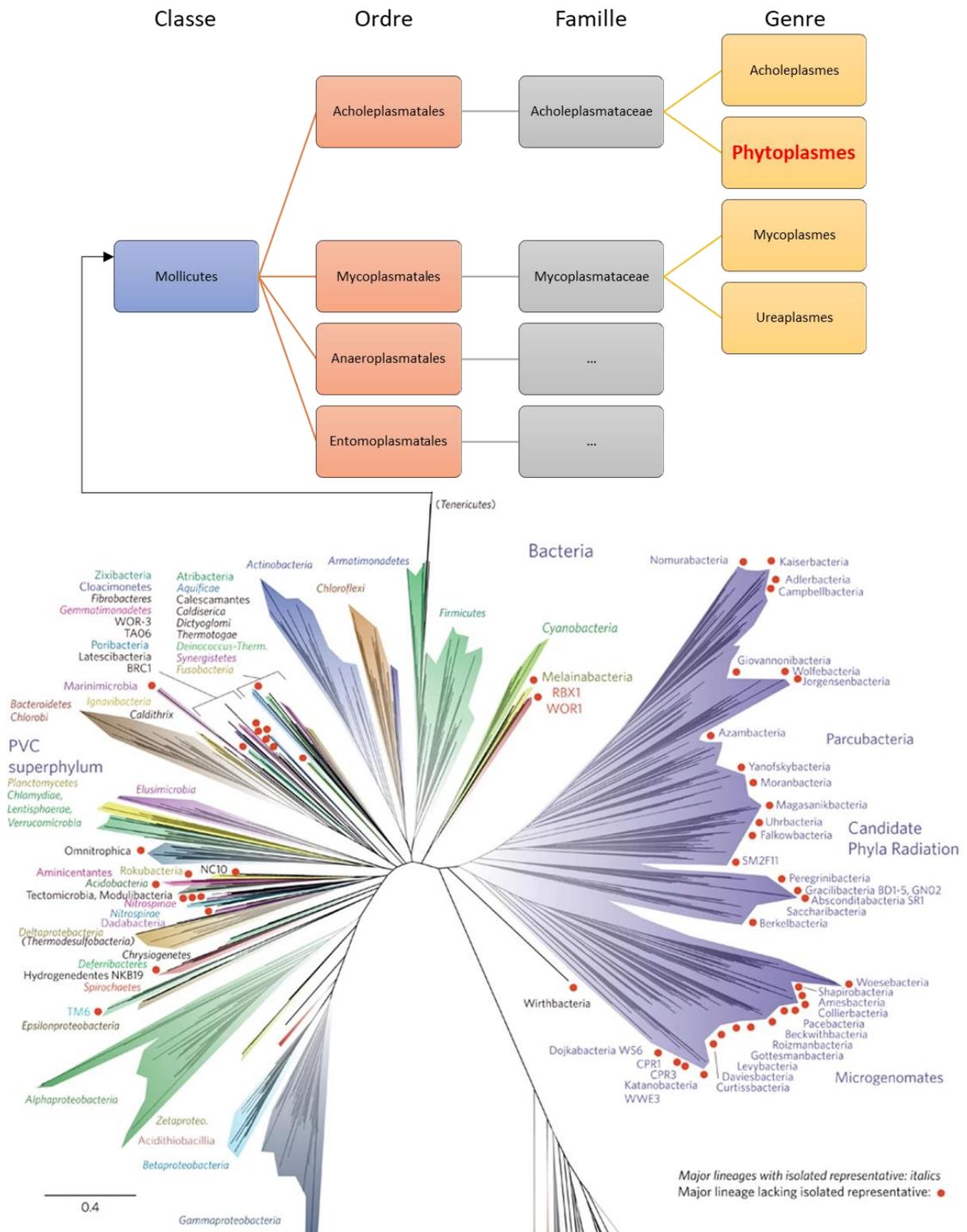
---

Comme nous l'avons vu dans cette partie, les MADS-TFs sont essentiels à la survie des angiospermes car ils sont impliqués dans la floraison, dans le développement de la fleur et dans sa fertilité. Le phénotype très fort des quadruples mutants *sep1sep2sep3sep4* est quelquefois observé dans la nature notamment chez des plantes infectées par des bactéries, appelées phytoplasmes. Nous allons maintenant nous intéresser à ces bactéries et plus précisément à leurs effecteurs qui ciblent les MADS-TFs dont SEP3 et causent des phénotypes floraux délétères.

## II. Les phytoplasmes, bactéries parasitaires de nombreux végétaux

### A. La découverte et la classification des phytoplasmes

Les phytoplasmes sont des bactéries parasitaires obligatoires ce qui signifie qu'ils ne peuvent vivre et se reproduire qu'au sein et aux dépens d'un organisme en lui soustrayant les ressources dont ils ont besoin. La première caractérisation de symptômes due à l'infection par des phytoplasmes remonte à plus de 1000 ans en Chine (M. Q. Wang et Maramorosch 1998; Namba 2019). Les plantes observées comportaient des fleurs vert-pâle et n'étaient aucunement considérées comme des plantes malades mais plutôt offertes en guise de cadeaux prestigieux. Ce n'est qu'à partir des années 1900 que des observations de jaunissement des fleurs de Reine-marguerite (*Callistephus chinensis*) sont considérées comme des symptômes d'une maladie. Les chercheurs pensent alors que cette maladie provient d'un virus infectant les plantes et se propageant par les cicadelles (Kunkel 1926). Dans le début des années 1960, des bactéries ont été observées au microscope dans les cellules de phloème de plants de riz et de cannes à sucre ainsi que dans des insectes appelés cicadelles (Doi et al. 1967; Shikata, Teng, et Matsumoto 1969). Avec ces premiers clichés microscopiques, les phytoplasmes sont d'abord considérés comme des mycoplasmes car comme eux, ils ne comportent pas de parois cellulaires et sont de petite taille ; ils sont d'ailleurs nommés MLO pour Mycoplasma-Like-Organisms (Doi et al. 1967; Maramorosch, Shikata, et Granados 1968; Shikata, Teng, et Matsumoto 1969). Les mycoplasmes sont des parasites animaux qui infectent entre autres les humains ; ils appartiennent à l'embranchement des Tenericutes (bactéries sans paroi cellulaire) et à la classe des Mollicutes (bactéries sans paroi cellulaire avec un cytosquelette interne) (Trachtenberg 1998) (Figure 14). Dans la fin des années 1980 et le début des années 90, l'étude des séquences d'acide ribonucléique des ribosomes (ARNr) 16S suggèrent que les MLO seraient plus proches d'autres mollicutes appelés Acholeplasmes (Lim et Sears 1989; Kuske et Kirkpatrick 1992). Finalement en 1992 les phytoplasmes, organismes parasitaires de plantes et d'insectes sont séparés des mycoplasmes et forment un nouveau genre appelé « Candidatus Phytoplasma » ou Phytoplasmes au sein de la famille des Acholeplasmataceae (« International Committee on Systematic Bacteriology Subcommittee on the Taxonomy of Mollicutes » 1993). Ce n'est que récemment que la classification des phytoplasmes semble adopter des règles bien définies basées sur l'analyse d'ARNr 16S (Pérez-López et al. 2016; Y. Zhao et Davis 2016).



**Figure 14 : Arbre phylogénétique des phytoplasmes d'après Hug et al. 2016. Les branches de l'arbre ne sont pas à l'échelle temporelle.**

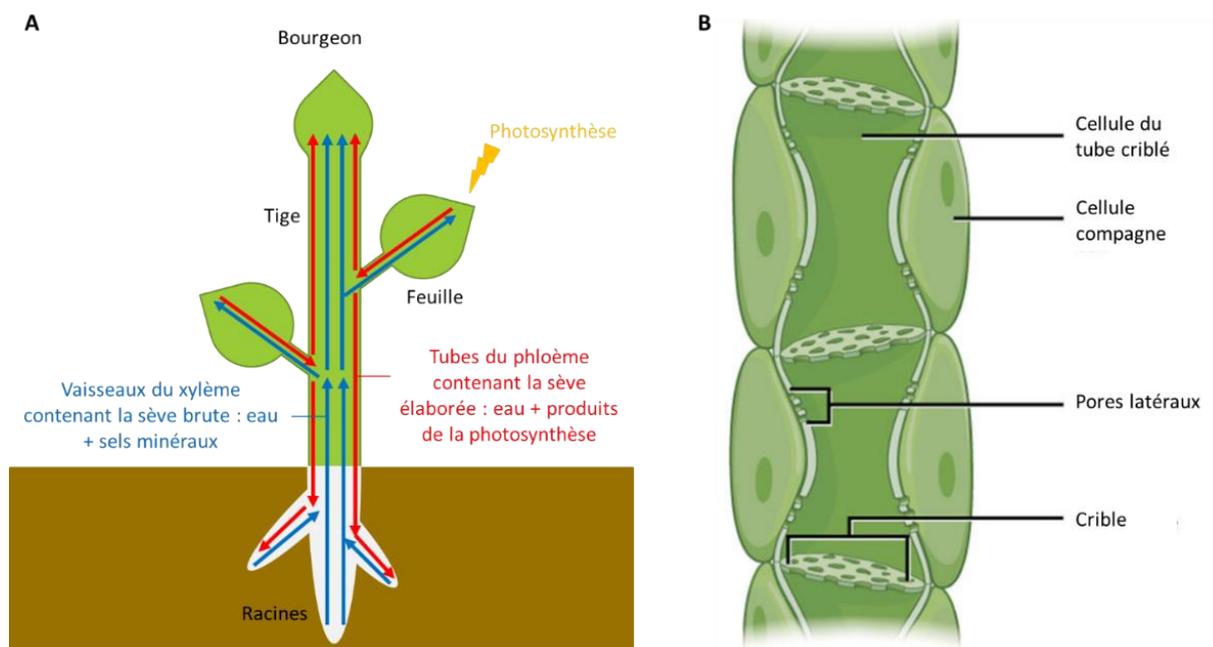
## B. Une bactérie adaptée pour le parasitisme efficace

Les phytoplasmes sont des bactéries particulièrement adaptées au parasitisme par leur cycle d'infection et leur génome ce qui explique en partie la diversité d'organismes qu'ils infectent. Si les phytoplasmes ont été observés dans les plantes et les cicadelles, c'est parce qu'ils sont capables d'infecter et de se multiplier dans ces deux organismes. L'organisme le plus grandement affecté par l'infection est la plante d'où le nom de phytoplasme. Cependant les phytoplasmes ont besoin d'infecter les insectes pour se propager dans les plantes.

### 1. Un cycle de vie dans deux hôtes très différents

#### a. Le vecteur mobile des phytoplasmes : les hémiptères

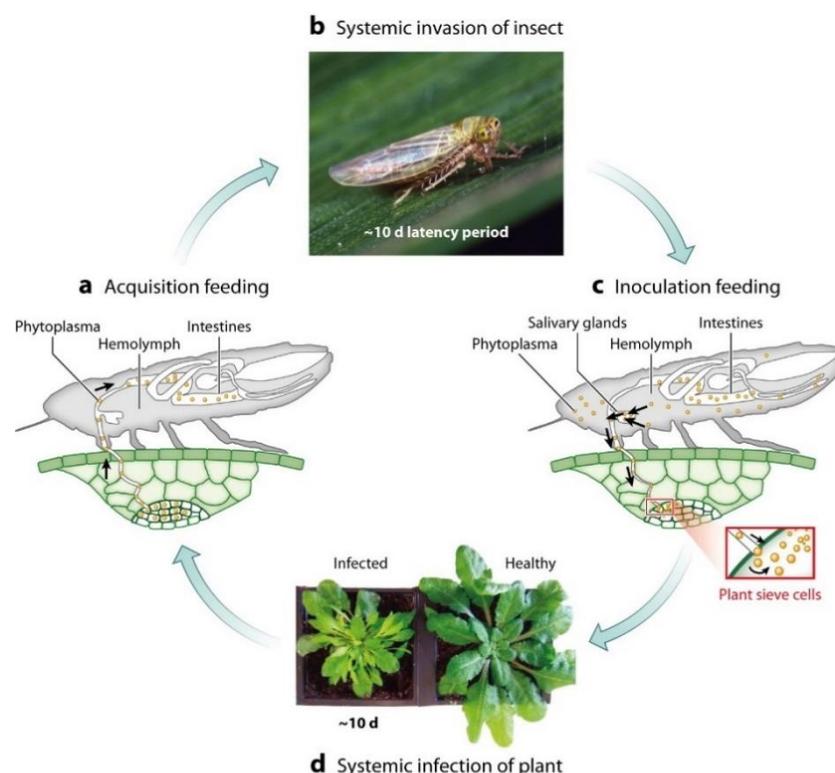
La zone d'échange entre les insectes et les plantes est l'un des deux tissus conducteurs de sève chez les spermatophytes (angiospermes et gymnospermes) appelé le phloème. Il est constitué de cellules vivantes (tubes criblés et cellules compagnes) qui permettent le transport de sève élaborée contenant de l'eau et les produits de la photosynthèse nécessaires au développement des organes de la plante (Figure 15).



**Figure 15 : Schéma des tissus conducteurs et des constituants du phloème chez les angiospermes. (A)** Schéma des deux tissus conducteurs de sève chez les angiospermes. **(B)** Schéma des types de cellules constituant le phloème d'après le site de cours en ligne lumenlearning.

Le cycle d'infection des phytoplasmes se compose de quatre phases (Figure 16). Les cicadelles, psyllides et fulgores, insectes hémiptères phytophages se nourrissent des nutriments présents

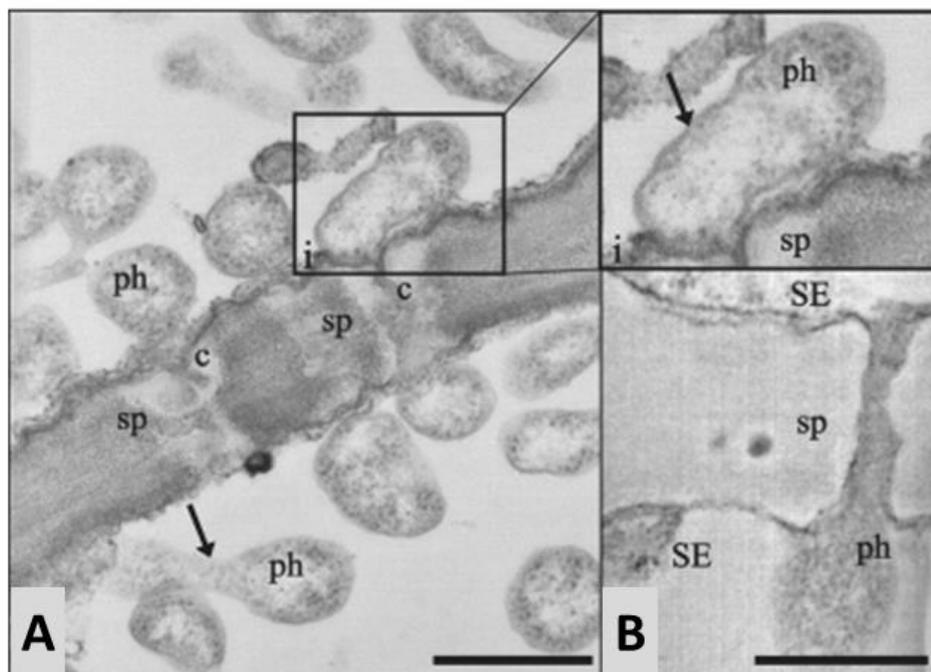
dans la sève dite élaborée véhiculée par le phloème des plantes (Weintraub et Beanland 2006). Pour se nourrir, les insectes insèrent leur rostre dans la plante jusqu'aux cellules du phloème et ingèrent les nutriments issus de la photosynthèse. Si la cicadelle se nourrit de la sève d'une plante infectée, elle peut ingérer également des phytoplasmes et être infectée (Figure 16.A). Commence alors la période dite de latence pendant laquelle les phytoplasmes se multiplient dans l'insecte avant de pouvoir être de nouveau inoculés dans une nouvelle plante (Figure 16.B). Les phytoplasmes sont très rarement nocifs pour leurs insectes vecteurs puisque leurs effecteurs ne ciblent pas, en général, les protéines animales. Cette période dure en général une dizaine de jours mais peut être de durée variable selon différents facteurs (Whitcomb, Jensen, et Richardson 1966; Murrall et al. 1996). Une fois ingérés, les phytoplasmes se multiplient dans l'intestin de la cicadelle et traversent la paroi intestinale pour se trouver dans l'hémolymphe (fluide équivalant au sang chez les invertébrés) (Özbek et al. 2003; Hogenhout et al. 2008). Ils peuvent ensuite se multiplier dans tout l'organisme de l'insecte et plus particulièrement dans les glandes salivaires. Si la cicadelle infectée se nourrit de la sève d'une plante saine, elle va excréter de la salive contenant des phytoplasmes dans les cellules du phloème de la plante saine (Figure 16.C) et ainsi infecter celle-ci (Figure 16.D) (Nault 1997).



**Figure 16 : Schéma du cycle d'infection des phytoplasmes d'après Sugio, MacLean, et al. 2011.**

## b. Les phytoplasmes, petites bactéries sectorisées dans le phloème des plantes

Après inoculation par les cicadelles, les phytoplasmes se trouvent donc dans les cellules du phloème de la plante. Aucun phytoplasme connu à ce jour n'a été observé dans d'autres cellules chez la plante que dans les tubes criblés et les cellules compagnes du phloème ; il est donc supposé qu'ils soient restreints à cette zone et qu'ils ne puissent se déplacer que dans ces cellules. Sur la Figure 17, on peut d'ailleurs observer la forme pléomorphique des phytoplasmes ainsi que leur petite taille autour de 200 à 800 nm. Les phytoplasmes semblent adhérer aux membranes plasmiques des cellules du phloème et se déplacer uniquement par les pores des tubes criblés du phloème (Figure 17.B).

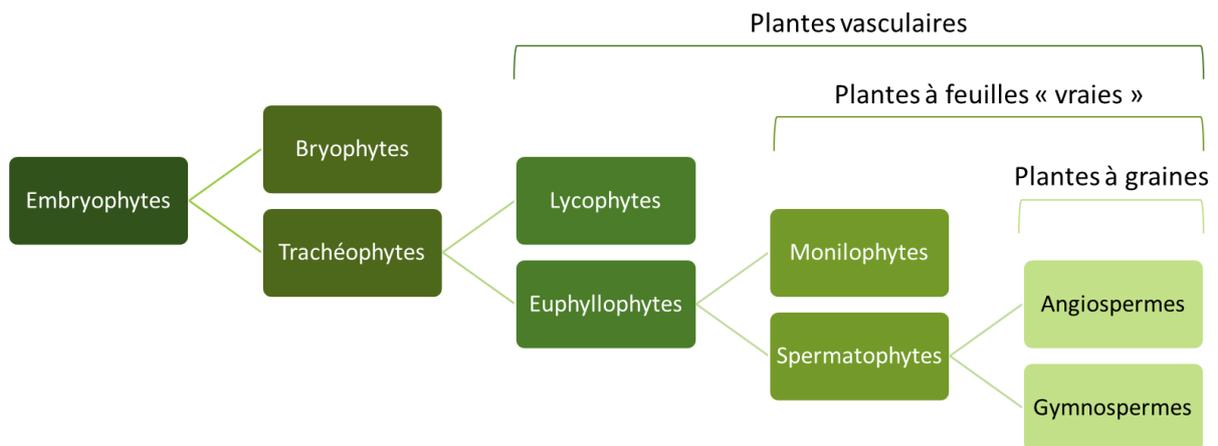


**Figure 17 : Cellules de phloème d'*Arabidopsis thaliana* infectées par « *Candidatus Phytoplasma asteris* » observées au microscope électronique à balayage d'après Pagliari et al. 2016. (A) Phytoplasmes adhérant à la membrane plasmique des cellules du phloème, la flèche montre un phytoplasme en division. *i.* Phytoplasme pléomorphe, la flèche montre la densité électronique correspondant à la membrane du phytoplasme. (B) Phytoplasme traversant un tube criblé. Les échelles correspondent à 500nm. *c* : callose, *ph* : phytoplasme, *SE* : élément du tube criblé, *sp* : pore du tube criblé.**

## 2. Les plantes infectées par les phytoplasmes

Les phytoplasmes infectent des centaines d'espèces différentes de plantes. Leur mode de transmission et leur génome particulièrement adapté à la vie de parasite leur permettent une adaptation très forte et un développement rapide. On trouve les phytoplasmes dans de

nombreux groupes de plantes à graines appelées spermatophytes (Figure 18) (Bertaccini et al. 2014) aussi bien chez les angiospermes que chez les gymnospermes. C'est au sein des angiospermes que le plus grand nombre d'espèces sont touchées, qu'elles soient monocotylédones ou dicotylédones. De très nombreuses cultures à fort intérêt agronomique et donc économique sont infectées partout dans le monde ; on peut citer par exemple les cultures de coton, vigne, riz, blé, maïs et bien d'autres (Bertaccini et al. 2014).



**Figure 18 : Arbre phylogénétiques des embryophytes.** Les branches de l'arbre ne sont pas à l'échelle temporelle. Les divisions écrites en noir contiennent des espèces infectées par les phytoplasmes.

### 3. Les défenses primaires des plantes et leur court-circuitage par les phytoplasmes

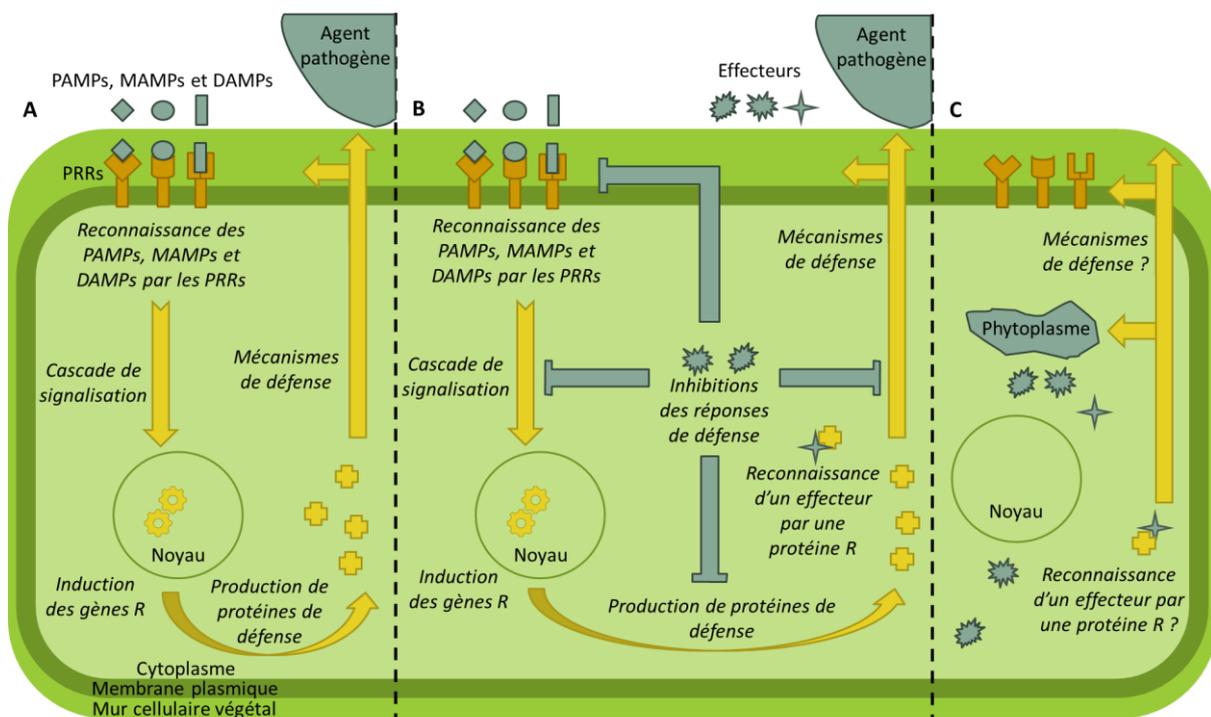
Depuis toujours, parasites et hôtes évoluent conjointement pour améliorer leur pathogénicité ou leur résistance respectivement. Les plantes ont développé des moyens de défense robustes et efficaces contre la plupart des agresseurs. Cependant dans le cas des phytoplasmes, la pénétration dans la plante contourne ces défenses primaires. Pour montrer ce contournement, nous allons d'abord définir les défenses primaires des plantes puis expliquer comment les phytoplasmes évitent ces mécanismes.

#### a. Les défenses primaires des plantes, protection globale et ciblage des effecteurs

##### i. La défense basale des plantes, une reconnaissance non spécifique

Lorsqu'un microorganisme pathogène se trouve en contact d'une plante, il utilise différents stratagèmes afin de se lier et de rentrer dans les cellules végétales. Cependant, une première ligne de défense appelée PAMP-Triggered Immunity (PTI) est présente à la surface des cellules

végétales. Cette défense, non spécifique du pathogène est déclenchée lors de la reconnaissance extracellulaire de diverses molécules par des récepteurs transmembranaires (PRRs pour Pattern Recognition Receptors) des cellules végétales. Les molécules reconnues sont de deux types : les PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns) et MAMPs (Microbe-Associated Molecular Patterns) provenant le plus souvent de la paroi cellulaire ou de la membrane de l'agent pathogène ainsi que les DAMPs (Damage-Associated Molecular Patterns) provenant de la dégradation des parois végétales par l'agent pathogène. Cette reconnaissance entraîne une cascade de signalisation induisant les gènes de résistance (gènes R) des plantes (Figure 19.A). Cependant cette PTI peut être supprimée par la production de protéines de virulence appelées effecteurs par les agents pathogènes et mène à une Effector-Triggered Susceptibility (ETS). La suppression de la PTI induit une seconde ligne de défense appelée Effector-Triggered Immunity (ETI) (Jones et Dangl 2006).



**Figure 19 : Schéma des réactions de défense des plantes. (A)** Mécanismes de mise en place de la PTI **(B)** Mécanismes de mise en place de l'ETS (inhibition par les effecteurs pathogènes) et de l'ETI (reconnaissance d'un effecteur qui induit les défenses des plantes) **(C)** Mécanismes de défense des plantes lors de l'attaque d'un phytoplasme. La PTI est contournée et l'ETI pourrait être induite, mais cela n'a jamais été démontré. Les flèches à bord entaillé représentent des cascades de signalisation. PRRs : Pattern Recognition Receptors. Les textes en italique expliquent les mécanismes d'action.

## ii. La défense intracellulaire des plantes, spécificité effecteur-protéine de résistance

L'ETI est une résistance spécifique qui implique la reconnaissance des effecteurs produits, par des protéines R de la plante hôte. Ces protéines sont codées par des gènes R. A la suite de cette nouvelle reconnaissance intracellulaire, une cascade de signalisation est entraînée (Figure 19.B). Cette cascade induit notamment la synthèse d'acide jasmonique (JA) et d'éthylène importants pour la défense contre les insectes et les organismes nécrotrophes (Creelman et Mullet 1997; Thomma et al. 1999) ainsi que d'acide salicylique important pour la défense contre les organismes biotrophes et héli-biotrophes (Delaney et al. 1994).

## b. La pénétration non destructive des phytoplasmes dans la plante et le contournement des réactions de défense des plantes

La grande force du système de pénétration des phytoplasmes dans la plante via les cicadelles est qu'elle est non destructive et apoplastique. Ainsi aucune dégradation de paroi cellulaire végétale n'est réalisée et aucun DAMP n'est perçu par la plante (Weintraub et Beanland 2006). Les phytoplasmes n'ayant pas de paroi cellulaire et étant directement inoculés dans la cellule, aucun MAMP ne peut être reconnu dans le milieu extracellulaire : toute la PTI est contournée (Figure 19.C). La reconnaissance des effecteurs par les protéines R de la plante menant à l'ETI se fait dans le milieu intracellulaire des cellules végétales le plus souvent (Jones et Dangl 2006). Cependant, il n'a jamais été montré que les cellules de tubes criblés puissent induire une ETI. Il est donc possible que les effecteurs des phytoplasmes ne soient pas reconnus par des protéines R des plantes dans ce type de cellules ou qu'ils soient capables d'inhiber l'ETI (Sugio, MacLean, et al. 2011). Il a cependant été montré dans des feuilles de tabac que certains effecteurs de phytoplasmes peuvent induire une ETI et que d'autres (semblables à l'effecteur TENGU que nous verrons ultérieurement) peuvent l'inhiber (N. Wang et al. 2018).

## 4. Un petit génome adapté au parasitisme (exemple de la souche 'Candidatus Phytoplasma asteris' Onion Yellows : OY)

Une des caractéristiques des mollicutes est leur génome particulièrement petit entre 580kb et 2Mb (Citti et al. 2018) contenant un taux de bases guanines (G) et thymines (T) faible. Nous allons ici nous intéresser principalement au génome de la souche de notre étude « *Candidatus Phytoplasma asteris* » Onion Yellow strain (OY).

### a. Un petit génome codant pour peu de gènes différents

Les phytoplasmes sont des eubactéries et ne contiennent donc pas de noyau. Leur information génétique contenue dans leur chromosome et leurs plasmides est située dans le cytoplasme. Il existe deux mutants très étudiés de la souche sauvage OY-W : OY-Mildly pathogenic line (OY-M) une souche moins pathogène que la sauvage (Shiomi et al. 1998; K. Oshima et al. 2001) ainsi que OY-Non-Insect-Transmissible derivative of OY-M (OY-NIM) non transmissible par insecte que nous ne détaillerons pas ici (K. Oshima et al. 2001). A l'heure actuelle, deux génomes ont été séquencés : celui de la souche OY-W (presque complètement séquencée : 750kb sur 1Mb total (K. Oshima et al. 2001; Kenro Oshima et al. 2002)) et celui de la souche OY-M (totalement séquencé pour une taille de 860kb (Kenro Oshima et al. 2004)). Nous allons nous intéresser majoritairement au génome de OY-M (du fait de son séquençage précis et très semblable à celui de OY-W) que nous allons comparer à d'autres génomes bactériens : *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*), *Mycoplasma genitalium* (*M. genitalium*) et la souche « *Candidatus Phytoplasma asteris* » aster yellows witches' broom (AY-WB) (Tableau 1). Cette comparaison a pour but de montrer les différences et similitudes avec une bactérie non parasitaire éloignée phylogénétiquement (*B. subtilis*), une bactérie proche phylogénétiquement (même classe, Figure 14) parasitaire chez les animaux (*M. genitalium*) ayant le plus petit génome connu de cette classe et une autre souche de phytoplasmes (même genre, Figure 14) parasitaire chez les végétaux et les insectes vecteurs (AY-WB) (Tableau 1). On peut tout d'abord observer que les deux souches de phytoplasmes comportent un génome de petite taille (4 à 5 fois plus petits que *B. subtilis*, Tableau 1) de même ordre de grandeur que les mycoplasmes. Il est important de remarquer que les phytoplasmes semblent coder moins de gènes différents par rapport à la taille de leur génome que d'autres bactéries (72 et 73% contre 87 et 88% du génome respectif, Tableau 1). Ceci peut s'expliquer par la structure de leur génome ; les génomes des phytoplasmes comportent de grandes et nombreuses portions d'ADN répétées. Ces portions comportent souvent des gènes répétés et sont organisées au sein de groupes d'ADN transposables appelés PMU (pour potential mobile units). Ces PMUs peuvent être transposés lors de la réplication de l'ADN du phytoplasme et créer une grande variabilité et adaptation du génome des phytoplasmes (Bai et al. 2006). Certains gènes ou pseudogènes compris dans ces PMUs codent pour des protéines pathogènes ou des protéines permettant l'apport d'énergie que nous allons détailler ci-après.

Caractéristiques du génome	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i>	AY-WB	OY-M
Taille (pb)	4,214,810	580,070	706,569	860,631
Contenu en G+C (%)	43,5	32	27	28
Région codant pour des protéines (% du génome)	87	88	72	73
Nombre total de gènes prédits	4100	482	671	754
Taille moyenne des gènes (pb)	890	1040	779	785
PMU (% du génome)	?	?	13,8	22,7
Gènes de la glycolyse	+	+	+	+
Gènes de la voie des pentoses phosphates (NADPH, certains acides aminés et nucléotides)	+	+	-	-
Gènes du système phosphotransférase (PTS)	+	+	-	-
Gènes de l'ATP synthase (de type F)	+	+	-	-
Gènes de cytochrome	+	-	-	-
Gènes du cycle de Krebs	+	-	-	-
Gènes pour la synthèse d'acides aminés	+	-	-	-
Gènes pour la synthèse d'acides gras	+	-	-	-

**Tableau 1 : Comparaison des génomes de *Bacillus subtilis*, *Mycoplasma genitalium*, AY-WB et OY-M.** ? : donnée inconnue, + : présence des gènes dans le génome, - : absence des gènes dans le génome. Les données ont été obtenues dans les publications suivantes : Kunst et al. 1997; Kenro Oshima et al. 2002; 2004; Bai et al. 2006; Glass et al. 2006.

#### b. Un génome adapté au détournement de métabolites de l'hôte

Si l'on s'intéresse plus particulièrement aux gènes codés par les génomes de phytoplasmes, on peut remarquer que beaucoup de voies métaboliques sont absentes ou incomplètes (Tableau 1) alors qu'elles sont présentes chez *B. subtilis* et parfois chez *M. genitalium*. Les phytoplasmes ne disposent ni de gènes leur permettant la synthèse de nucléotides et d'acides aminés (nécessaires à la réplication de leur ADN et à la production de leur protéine) ni de gènes permettant la production d'énergie (voie des pentoses phosphates, système

phosphotransférase, ATP synthase, cycle de Krebs) (Kenro Oshima et al. 2002; 2004; Bai et al. 2006). Il semblerait que seule la glycolyse puisse leur permettre de produire de l'énergie. Certains gènes glycolytiques ont même été observés à plusieurs endroits du génome de la souche OY-W (Kenro Oshima et al. 2007). Ces gènes répétés font partie de PMUs montrant que ces gènes conservés jouent un rôle primordial dans la production d'énergie de ces bactéries. Les phytoplasmes possèdent de nombreux transporteurs leur permettant de subtiliser à leur hôte les molécules dont ils ont besoin (ATP, acides aminés, sucre, métaux, ions) (Kenro Oshima et al. 2002; 2004; Bai et al. 2006). Vivant dans les cellules du phloème particulièrement riches en sucres et autres molécules nécessaires à la vie des cellules, les phytoplasmes ont pu réduire leur génome et surtout les gènes nécessaires à la production de sucre et d'énergie. Il est intéressant de constater que *Xylella fastidiosa*, une autre bactérie phyto-pathogène mais vivant dans les cellules du xylème moins riches que celles du phloème utilise diverses voies non présentes chez les phytoplasmes (cycle de Krebs, synthèse d'ATP) (Simpson et al. 2000; Kenro Oshima et al. 2002).

### c. Un génome favorisant la pathogénicité chez les plantes

D'autres gènes codés par les phytoplasmes favorisent la propagation des phytoplasmes dans la plante. En effet, certains gènes trouvés chez OY-M, OY-W et AY-WB codent pour des protéines homologues à des métalloprotéases nommées FtsH et hflB. Il est supposé que ces protéases puissent dégrader les protéines de défense sécrétées par la plante (Kenro Oshima et al. 2002; 2004; Bai et al. 2006). On trouve également dans ces génomes trois protéines homologues nécessaires pour la translocation de protéines vers le milieu extracellulaire (ici le cytoplasme des cellules du phloème) : secA, secE et secY (Economou 1999; Kakizawa et al. 2001; Kenro Oshima et al. 2002). Ces trois protéines assemblées créent un complexe qui autorise uniquement la translocation de protéines possédant une séquence particulière : la séquence signal (Blobel et Dobberstein 1975). Ce phénomène de translocation est appelé voie Sec-dépendante et permet la libération des effecteurs mobiles de phytoplasmes dans le cytoplasme des cellules du phloème ; ces effecteurs migreront ensuite dans les divers organes de la plante par la voie symplastique du fait de leur petite taille (Hoshi et al. 2009; Bai et al. 2009; MacLean et al. 2011). Les effecteurs de phytoplasmes ont été recherchés et identifiés dans les différents génomes séquencés en recherchant informatiquement la présence de la séquence signal. D'après diverses recherches, de nombreux effecteurs ont été trouvés

représentant jusqu'à 15% des gènes codés par chaque génome respectif (Bai et al. 2009; Hoshi et al. 2009; Chung et al. 2013; Anabestani et al. 2017). Plus particulièrement, 30 effecteurs potentiels ont été trouvés dans le génome OY-M et deux de ces effecteurs (TENGU et PHYL1<sub>OY</sub>) ont été très étudiés et seront détaillés dans la partie suivante (Hoshi et al. 2009; Maejima et al. 2014). Les différents effecteurs exprimés par les phytoplasmes sont d'ailleurs différemment exprimés en fonction de l'espèce infectée (insecte ou plante) ; certains effecteurs dérégulant les mécanismes moléculaires des plantes sont plus exprimés lorsque les phytoplasmes infectent les plantes que les insectes (Hoshi et al. 2009; MacLean et al. 2011). Il est également intéressant de noter une redondance ou identité entre certains effecteurs de souches différentes (Chung et al. 2013; Anabestani et al. 2017). Ces effecteurs homologues ne représentent pas la majorité des effecteurs de chaque souche mais laissent supposer que les gènes codant pour des effecteurs évoluent plus rapidement que les autres gènes du génome sans doute pour s'adapter aux espèces infectées (Chung et al. 2013). De plus, certains effecteurs tels que SAP54 (un effecteur homologue à PHYL1<sub>OY</sub>) sont présents sur le PMU2 du génome de la souche AY-WB suggérant une évolution mais aussi une conservation de ces effecteurs (Sugio et Hogenhout 2012). Il semblerait donc que les effecteurs des phytoplasmes demeurent la clé de leur survie et de leur adaptation.

### C. Caractérisation des maladies et effecteurs associés

Chaque effecteur et ses homologues utilisent des mécanismes moléculaires de pathogénicité similaires et peuvent engendrer un ou plusieurs symptômes et maladies. C'est pourquoi, les différentes maladies ne sont pas toujours trouvées au sein d'une plante infectée ; certaines souches de phytoplasmes causent certains symptômes plus que d'autres en fonction des effecteurs qu'elles contiennent. On peut cependant citer les cinq principaux symptômes et maladies causés par les phytoplasmes : le nanisme, la maladie du « balai de sorcière », le gondolement de feuilles, la virescence et la phyllodie.

#### 1. Le nanisme : la dérégulation des mécanismes de réponse à l'auxine

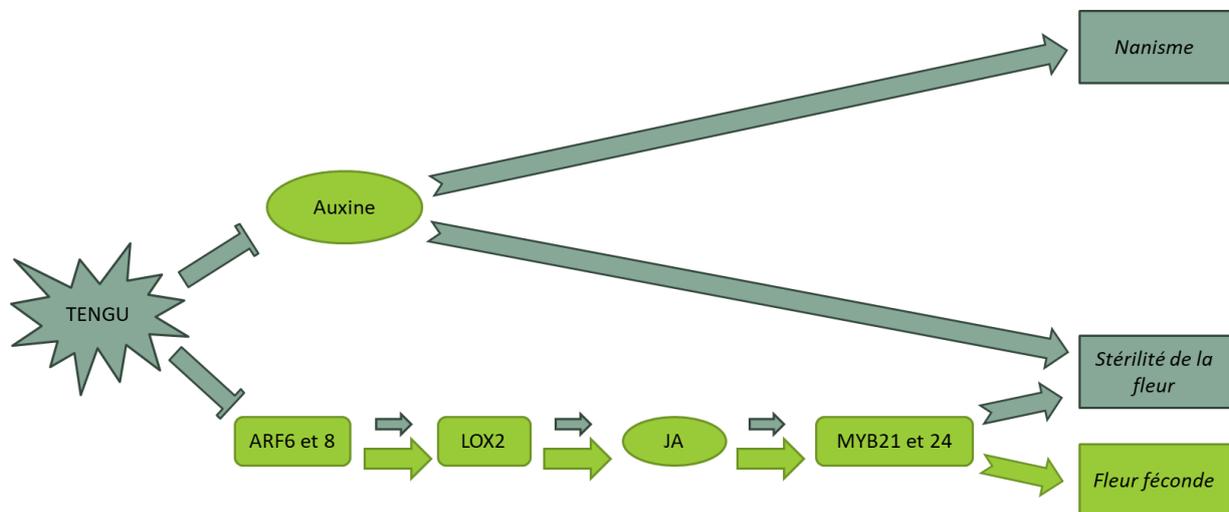
Le nanisme chez les plantes est caractérisé par une réduction de la longueur des entre-nœuds des tiges, de la taille des feuilles, des fleurs et globalement de la plante entière (Figure 20). Cette maladie est liée à une dérégulation de la croissance de la plante dans laquelle est largement impliquée une hormone bien connue : l'auxine ou acide indole acétique (IAA) (Hoshi et al. 2009; Minato et al. 2014; Paque et Weijers 2016).



**Figure 20 : Observation de symptômes de nanisme et de maladie du « balai de sorcière » causés par les phytoplasmes sur des plants d'*A. thaliana*.** La plante infectée par la souche AY-WB (droite) montre une taille réduite (nanisme) et un grand nombre de tiges secondaires (encart) par rapport à la plante sauvage (gauche) (Sugio, Kingdom, et al. 2011). Les barres blanches correspondent à 1cm.

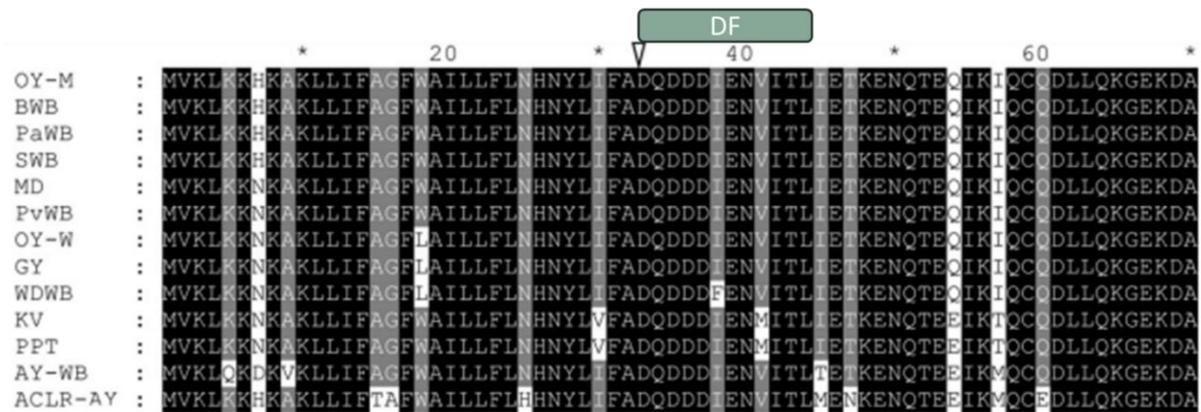
Le premier effecteur de phytoplasme isolé est TENGU (Hoshi et al. 2009). Il a été montré que la surexpression de cet effecteur chez *A. thaliana* et *Nicotiana benthamiana* reproduit les symptômes de nanisme, de stérilité des fleurs mais aussi de la maladie « du balai de sorcière » induits par la souche OY-W dont il est isolé (Hoshi et al. 2009; Minato et al. 2014). TENGU a été observé par analyse immunohistochimique dans le cytoplasme des bourgeons apicaux ainsi qu'au niveau de l'apex d'*A. thaliana*. Cela démontre la mobilité des effecteurs contrairement aux phytoplasmes restreints aux cellules du phloème. De nombreux gènes impliqués dans le transport de l'hormone auxine (de la famille *pin-formed (PIN)*) mais aussi dans la signalisation et la réponse à cette hormone (des familles *AUX/IAA*, *small auxin-induced RNA (SAUR)*, *GH3* ainsi que les *auxin response factor (ARF) 6* et *8*) sont sous-exprimés dans les plantes transgéniques surexprimant TENGU (Hagen et Guilfoyle 2002; Petrásek et al. 2006; Hoshi et al. 2009; Minato et al. 2014). Une baisse du niveau d'auxine (IAA) est observée dans les bourgeons des plantes 35S:TENGU même si les mécanismes moléculaires responsables de cette baisse ne sont pas clairement déterminés (Minato et al. 2014). Ces observations montrent que l'effecteur TENGU induit de nombreuses modifications dans les mécanismes de signalisation, de régulation, de transport et de synthèse de l'auxine. De plus, les ARF6 et 8 stimulent l'expression du gène *LIPOXYGENASE 2 (LOX2)* qui est impliqué dans la première

étape de la synthèse d'acide jasmonique (JA) et dans la senescence des plantes (Bell, Creelman, et Mullet 1995; Schommer et al. 2008). La synthèse de JA est nécessaire à l'expression des gènes *MYB21* et *MYB24* impliqués dans le développement des pétales et étamines ainsi que dans la croissance du gynécée (Reeves et al. 2012). Il a également été montré par expression de diverses versions tronquées de TENGU chez *A. thaliana* que les 11 premiers acides aminés après la séquence signal sont nécessaires et suffisants pour l'activité de TENGU (Figure 21 et Figure 22) (Sugawara et al. 2013). Ainsi, l'effecteur TENGU altère très fortement l'expression et les mécanismes liés à deux hormones primordiales chez les plantes (l'auxine et JA). Il provoque le nanisme et la stérilité des plantes en dérégulant la synthèse, la signalisation et les mécanismes de réponse à l'auxine mais aussi la synthèse de JA (Figure 21).



**Figure 21 : Schéma des mécanismes d'action de l'effecteur TENGU induisant le nanisme et la stérilité des fleurs.** Les activations/inhibitions vertes et grises représentent les mécanismes chez une plante saine et chez une plante infectée respectivement. Les textes en italique indiquent les phénotypes observés sur une plante saine (vert) et une plante infectée (gris). JA : acide jasmonique.

TENGU est, avec ses homologues, le seul effecteur des phytoplasmes capable d'induire le nanisme. Cette famille d'effecteur est très conservée entre les souches mais très différente, en termes de structure, des autres familles d'effecteurs dont nous allons parler ci-après. La longueur de TENGU et de ses homologues est d'environ 70 acides aminés alors que les autres effecteurs en comportent en général au moins 100 (Figure 22) (S.-T. Cho, Lin, et Kuo 2019). Il a également été montré par western blot que lorsqu'exprimé dans la plante, TENGU (et ses homologues) est clivé par une protéine de plante non identifiée (Sugawara et al. 2013). Ce clivage n'a pas été observé pour les autres types d'effecteurs ce qui montre davantage la particularité de l'effecteur TENGU et de ses homologues (Figure 22).



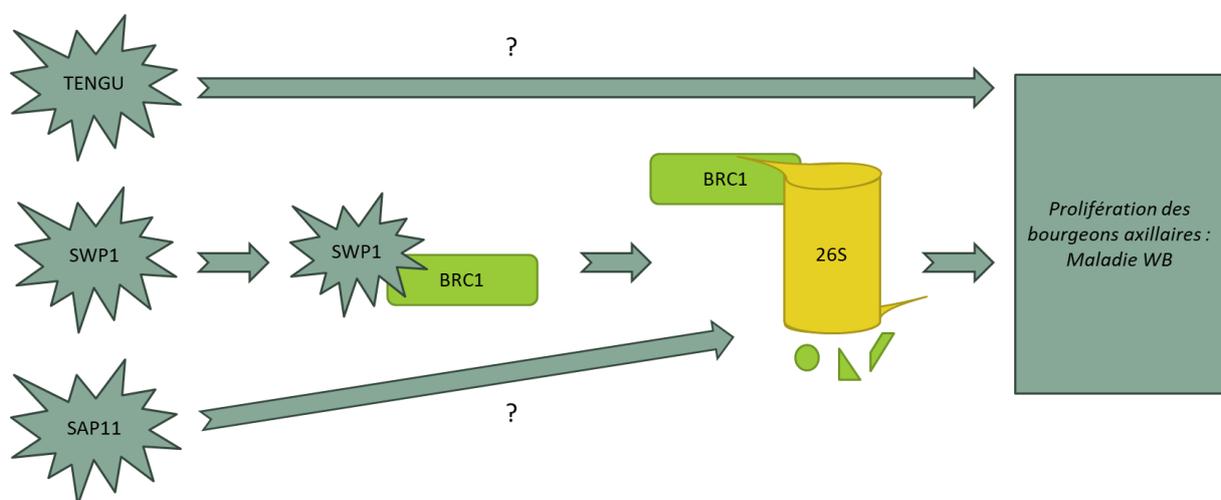
**Figure 22 : Alignement de séquences des effecteurs TENGU de différentes souches de phytoplasmes** d'après Sugawara et al. 2013. Les acides aminés colorés en noir, gris et blanc sont totalement conservés, très conservés ou peu conservés respectivement. La flèche blanche montre le site de clivage de la séquence signal prédite. Le cadre en gris correspond au domaine fonctionnel (DF) identifié de TENGU<sub>OY-M</sub>.

## 2. La maladie du « balai de sorcière » (witches' broom : WB) : la déstabilisation des CYC/TB1-TCP

La maladie WB se caractérise par la prolifération incontrôlée de tiges chez la plante. En effet, la dominance normalement contrôlée d'un bourgeon apical par rapport aux autres (bourgeons secondaires) est supprimée ce qui conduit à la croissance et à la prolifération de bourgeons secondaires (Figure 20).

Plusieurs effecteurs peuvent causer des symptômes de maladie WB comme TENGU ou les effecteurs que nous allons détailler ci-après. L'effecteur SWP1 (pour secreted Wheat Blue Dwarf phytoplasma protein 1) isolé de la souche Wheat Blue Dwarf, a permis de comprendre les mécanismes moléculaires causant cette maladie (N. Wang et al. 2017; 2018). La surexpression de SWP1 reproduit les symptômes de la maladie WB de la souche Wheat Blue Dwarf. Les mécanismes moléculaires élucidés montrent que SWP1 lie et déstabilise certains facteurs de transcription TCP (pour TEOSINTE BRANCHED1, CYCLOIDEA, PROLIFERATING CELL FACTORS) de classe II (N. Wang et al. 2018). Cette classe de facteurs de transcription est composée de deux familles : les CININNATA-related TCP (CIN-TCP) et les CYCLOIDEA/TEOSINTE BRANCHED1 TCP (CYC/TB1-TCP) (Kosugi et Ohashi 2002). Les expériences de Y2H et BiFC montrent que SWP1 se lie à tous les facteurs de transcription de la famille des CYC/TB1-TCP et notamment TCP18 et TCP12 (nommé BRANCHED1 et 2 (BRC1 et 2) respectivement). La dégradation de BRC1 et BRC2 par SWP1 serait dépendante de la voie ubiquitine/protéasome 26S : les protéines ciblées sont poly-ubiquitinées puis transportées

par les protéines RADIATION SENSITIVE23 (RAD23) jusqu'au protéasome 26S par lequel elles seraient dégradées. Le protéasome 26S est un complexe très étudié et connu pour la dégradation de protéines dans lequel interviennent très fréquemment les protéines RAD23 (Hershko et Ciechanover 1998; Farmer et al. 2010). Les expériences de co-expression de BRC1 et SWP1 dans des feuilles de tabac suivies de quantification des abondances protéiques par western-blot montrent qu'avec un traitement d'inhibiteur du protéasome, la dégradation est inhibée (N. Wang et al. 2018). BRC1 participe à la conservation de la dominance du bourgeon apical en réprimant la croissance et le développement des bourgeons axillaires. Les mutants *brc1* développent un grand nombre de tiges très semblables au phénotype de la maladie WB (Aguilar-Martínez, Poza-Carrión, et Cubas 2007). Ainsi en dégradant BRC1, SWP1 inhibe la répression de la croissance et du développement des bourgeons axillaires engendrant la prolifération des tiges et la maladie WB (Figure 23). Des expériences de mutagenèse, d'expression des protéines mutées chez *A. thaliana* et de localisation de ces protéines mutées dans la plante par fluorescence ont montré que les trente derniers acides aminés ainsi que la localisation nucléaire de SWP1 sont nécessaires à son activité (N. Wang et al. 2018).



**Figure 23 : Schéma des mécanismes d'action des effecteurs TENGU, SWP1 et SAP11 induisant la maladie WB.** Le point d'interrogation représente les mécanismes d'action non élucidés. Les textes en italique indiquent les phénotypes observés sur une plante infectée.

La surexpression chez *A. thaliana* d'un effecteur homologue à SWP1 appelé SAP11 (pour secreted AY-WB protein 11) isolé de la souche AY-WB reproduit les symptômes de la maladie WB (Sugio, Kingdom, et al. 2011). Cette famille d'effecteurs semble cibler les TCPs (Sugio, Kingdom, et al. 2011; Sugio, MacLean, et Hogenhout 2014; N. Wang et al. 2018; Chang et al. 2018; Marrero et al. 2020). Ces effecteurs sont plus différents en termes de séquence que la

famille des effecteurs homologues de TENGU (Figure 24). Certains de ces effecteurs semblent comporter un site de localisation nucléaire (comme SAP11 et surement SWP1, Bai et al. 2009; N. Wang et al. 2018) mais aussi des domaines prédits d'interaction en coiled-coil (Figure 24). La similitude entre ces effecteurs laisse supposer qu'ils auraient des mécanismes moléculaires d'action similaires. En effet, il a été montré par co-expression de SAP11 et BRC1 et BRC2 dans des feuilles de tabac suivie de quantification des abondances protéiques par western-blot que SAP11 déstabilise BRC1 et BRC2 (N. Wang et al. 2018; Chang et al. 2018). Mais les mécanismes d'interaction et de dégradation n'ont pas été élucidés. De même, les mécanismes moléculaires qui causent la maladie « du balai de sorcière » lors de la surexpression de TENGU n'ont pas encore été élucidés (Figure 23).

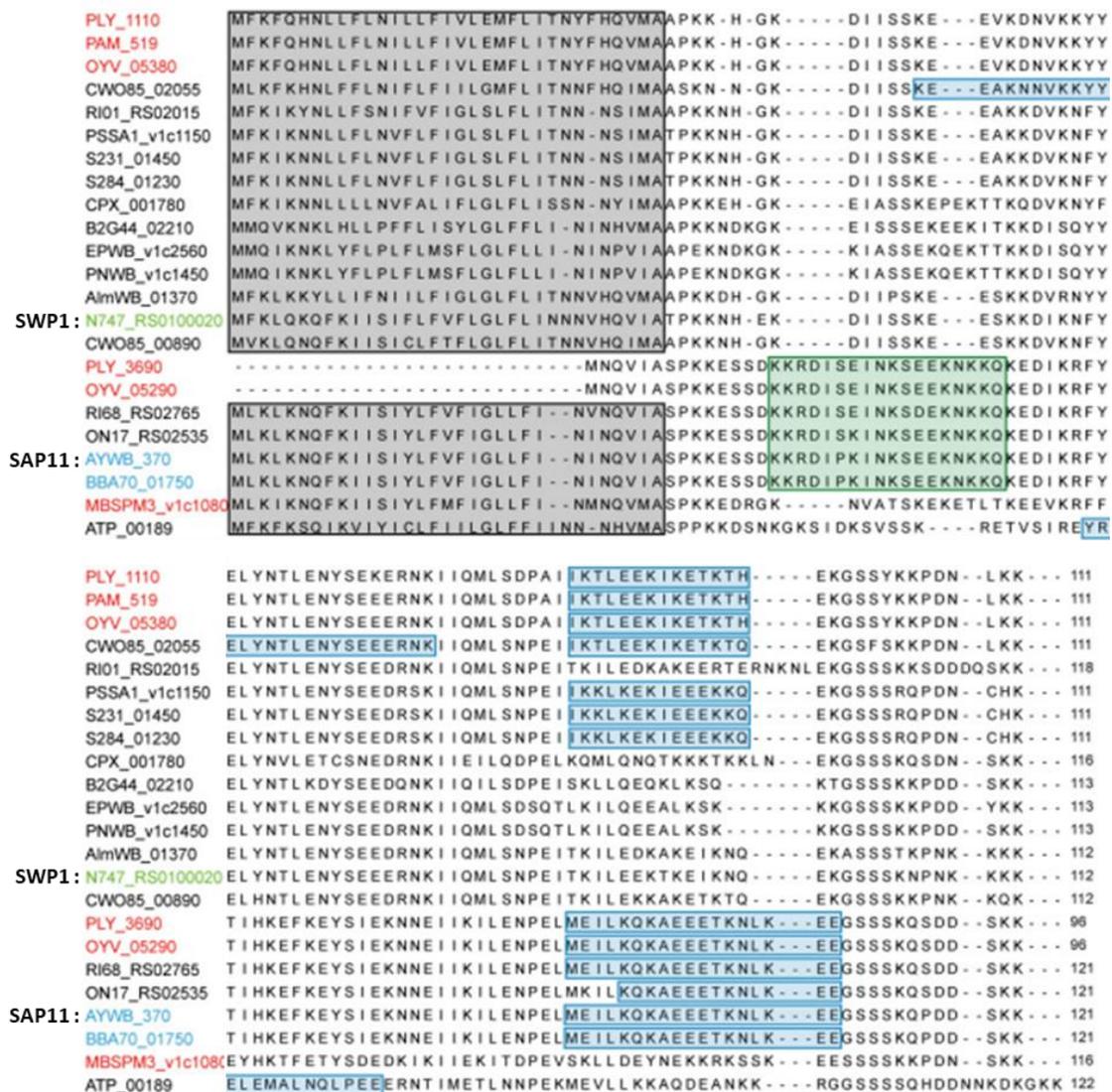


Figure 24 : Alignement de séquences des effecteurs SWP1, SAP11 et de leurs homologues d'après Cho, Lin, et Kuo 2019. Les cadres noirs, vert et bleu représentent les domaines prédits de séquence signal, de localisation nucléaire et d'interaction en coiled-coil respectivement.

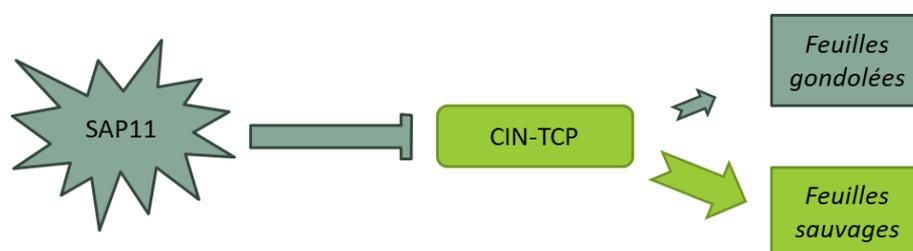
### 3. Le gondolement des feuilles : la déstabilisation des CIN-TCP

La surexpression de SAP11 reproduit les symptômes de la maladie WB mais aussi de feuilles gondolées (« crinkled leaves ») de la souche AY-WB (Figure 25).



**Figure 25 : Observation de symptômes de gondolement de feuille causés par les phytoplasmes sur des plants d'*A. thaliana*.** La feuille d'une plante sauvage (gauche) par rapport à la feuille gondolée d'une plante *35S:SAP11* (droite) (Sugio, Kingdom, et al. 2011). La barre blanche correspond à 1cm.

SAP11 lie les CIN-TCP (notamment les TCP2, TCP4 et TCP13) grâce à son domaine prédit d'interaction en coiled-coil comme l'ont montré les expériences de co-IP et de Y2H (Figure 24). Les expériences de co-agroinfiltration et les images au microscope confocal montrent que SAP11 déstabilisent TCP2 et TCP13 et que la localisation nucléaire est nécessaire pour cette déstabilisation (Sugio, Kingdom, et al. 2011; Sugio, MacLean, et Hogenhout 2014; Marrero et al. 2020). Les plantes octuples mutantes *cin-tcp* présentent de larges feuilles gondolées ainsi que de petites cellules dont la croissance est réprimée (Efroni et al. 2008). Ainsi en déstabilisant les CIN-TCP, SAP11 provoquent les symptômes de feuilles gondolées (Figure 26).



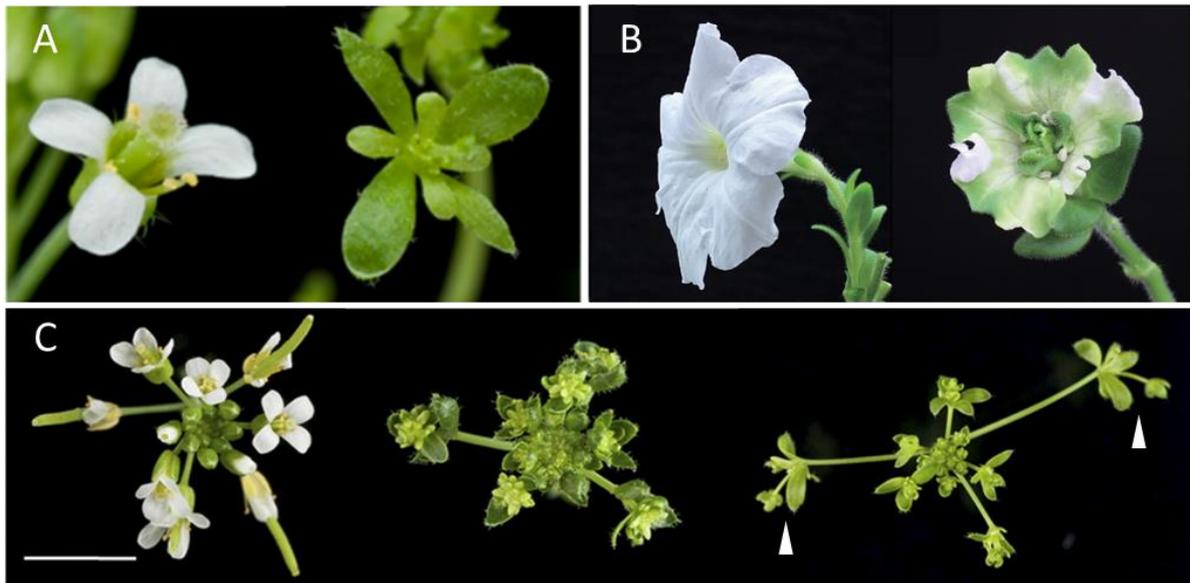
**Figure 26 : Schéma des mécanismes d'action de SAP11 induisant le gondolement des feuilles** Les activations/inhibitions vertes et grises représentent les mécanismes chez une plante saine et chez une plante infectée respectivement. Les textes en italique indiquent les phénotypes observés sur une plante saine (vert) et une plante infectée (gris).

## 4. La phyllodie et la virescence : la dégradation des MADS-TF floraux par les effecteurs phyllogènes

Les effecteurs, symptômes et mécanismes moléculaires de la phyllodie seront davantage détaillés ci-dessous car ils sont au cœur de notre étude.

### a. Caractérisation des phénotypes de phyllodie

La phyllodie se caractérise par une malformation des organes floraux (sépalés, pétales, étamines et carpelles). Dans les cas peu sévères, un simple verdissement de certains organes non verts à l'état sauvage (pétales et étamines) est observé (Figure 27.B). Ce verdissement est appelé virescence et correspond en fait, à une forme atténuée de la phyllodie (Namba 2019). Dans les cas extrêmes, les 4 couronnes présentent des organes très semblables à des feuilles (présence de trichomes, cellules de feuilles) (Figure 27.A) Dans ces cas, on observe aussi une nouvelle inflorescence qui repart du centre de la « fleur » précédente (l'emplacement du carpelle) (MacLean et al. 2011). Cette nouvelle inflorescence va, à son tour, produire des organes malformés et une autre inflorescence va démarrer à l'emplacement de son carpelle et ainsi de suite (Figure 27.C). Ce phénomène est appelé croissance indéterminée de la fleur en opposition à la croissance déterminée d'une fleur qui cesse lorsque tous ses organes floraux sont formés. Cette croissance ininterrompue de la fleur a valu aux plantes infectées par les phytoplasmes causant la phyllodie, le nom de plantes « zombie » car elles ne peuvent plus se reproduire mais survivent et permettent la multiplication des phytoplasmes. De nombreux phénotypes ont été observés chez des plants d'*A. thaliana* surexprimant les effecteurs induisant la phyllodie. Certains de ces phénotypes ressemblent beaucoup à des doubles mutants *ap1 cal*, des triples ou quadruples mutants *sep1sep2sep3*, *sep1sep2sep3sep4* et aussi à des mutants *sep ap1* (MacLean et al. 2011; Maejima et al. 2014; Aurin et al. 2020).



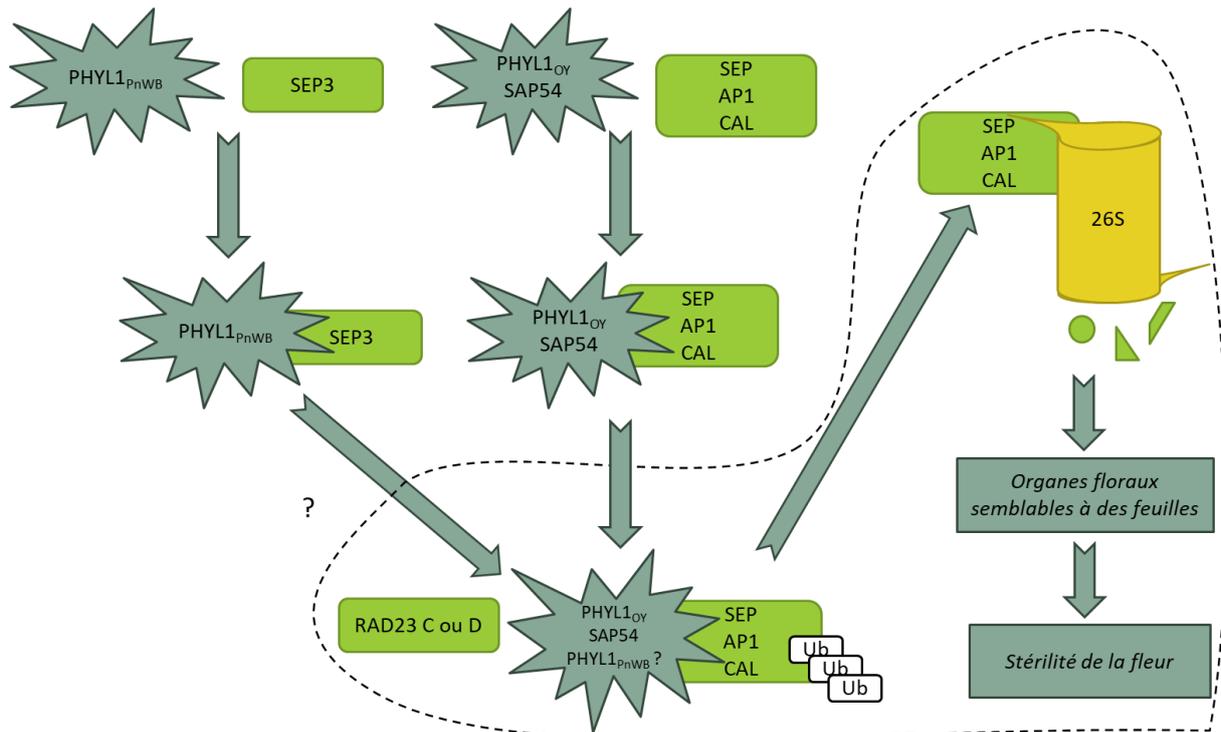
**Figure 27 : Observation des différents symptômes de phyllodie. (A)** Les fleurs d'une plante sauvage d'*A. thaliana* (gauche) et d'une plante infectée par la souche AY-WB (droite) montrant une malformation des organes floraux en organes semblables à des feuilles (MacLean et al. 2014). **(B)** Les fleurs d'une plante sauvage de Pétunia (gauche) et d'une plante surexprimant l'effecteur phyllogène PHY1<sub>OY</sub> (droite) montrant un verdissement des pétales et étamines (virescence) et une légère malformation des organes floraux (Kitazawa et al. 2017). **(C)** Inflorescences d'une plante sauvage d'*A. thaliana* (gauche) et de plantes infectées surexprimant l'effecteur phyllogène SAP54 (milieu et droite) montrant une croissance indéterminée des fleurs (flèches blanches, droite) (MacLean et al. 2011). La barre blanche correspond à 0,5cm.

### b. Mécanismes moléculaires d'action des effecteurs responsables de la phyllodie

Les effecteurs responsables de la phyllodie sont appelés phyllogènes (pour phyllody-inducing genes) et sont des effecteurs, d'environ 100 acides aminés, très semblables en termes de séquences primaires, secondaires et tertiaires comme nous le verrons dans la partie suivante. Trois effecteurs responsables de cette maladie ont été identifiés et très étudiés : SAP54, PHY1<sub>OY</sub> et PHY1<sub>PnWB</sub> provenant des souches AY-WB, OY-W et Peanut Witches' Broom (PnWB) respectivement (MacLean et al. 2011; Chung et al. 2013; Maejima et al. 2014; C.-Y. Yang et al. 2015). Les effecteurs SAP54 et PHY1<sub>OY</sub> ont des mécanismes d'action similaires provoquant les maladies de virescence et de phyllodie. Leur surexpression chez *A. thaliana* reproduit les symptômes de ces deux maladies (MacLean et al. 2011; Maejima et al. 2014). En accord avec les phénotypes observés, il a été observé que ces effecteurs lient certains MADS-TFs de type MIKC nécessaires à la formation des organes floraux de la plante, notamment SEP3 et AP1. L'interaction de PHY1<sub>OY</sub> avec les trois MADS-TFs SEP3, AP1, CAL (homologue d'AP1) a été testée et confirmée. SAP54 a été testé avec de nombreux MADS-TFs et il interagit avec les

mêmes protéines que PHYL1<sub>OY</sub> et bien d'autres (comme SOC1) comme l'ont montré les expériences de Y2H et de co-IP *in planta* (MacLean et al. 2014; Maejima et al. 2014; 2015; Marrero et al. 2020). Cependant il a aussi été observé qu'il n'interagit pas avec certains MADS-TFs MIKC comme AG, AP3, PI ou SHP1 et 2 (MacLean et al. 2014). Il a également été observé *in vitro* et par Y2H que le domaine K de SEP3 et d'AP1 est nécessaire et suffisant pour l'interaction avec PHYL1<sub>PnWB</sub> et SAP54 respectivement (MacLean et al. 2014; Kitazawa et al. 2017; Liao et al. 2019). Les phyllogènes ciblent donc spécifiquement certains MADS-TFs impliqués dans la morphogénèse florale et plus particulièrement leur domaine K. L'interaction entre MADS-TFs et phyllogènes entraîne ensuite la dégradation des protéines ciblées. En effet, l'expression transitoire de ces MADS-TFs comportant un tag Yellow Fluorescent Protein (YFP) dans des feuilles de tabac montre une perte de fluorescence en présence de PHYL1<sub>OY</sub>. La dégradation des YFP-MADS-TFs a été confirmée par western blot (Maejima et al. 2014). PHYL1<sub>OY</sub> entraîne la dégradation de AP1, SEP1-4, CAL et possiblement AG. SAP54 dégrade également les MADS-TFs SEP3, AP1 et SOC1 comme l'ont montré des expériences d'expression transitoire dans des feuilles de tabac de ces MADS-TFs avec SAP54 suivies de western blot (MacLean et al. 2014). La dégradation des MADS-TFs par les phyllogènes seraient dépendante de la voie ubiquitine/protéasome 26 S. Plusieurs évidences étaiènt cette hypothèse. Il a été montré que : (i) SEP3 est poly-ubiquitiné en présence de PHYL1<sub>OY</sub> par Immunoprécipitation et immunoblotting (IP-IB) (Maejima et al. 2014), (ii) PHYL1<sub>OY</sub>, SAP54 et PHYL1<sub>PnWB</sub> se lient à RAD23C et D par Y2H et co-IP *in planta* (MacLean et al. 2014; Iwabuchi et al. 2019; 2020), (iii) les plantes mutantes *rad23cd* et *rad23bcd* surexprimant SAP54 n'induisent plus les symptômes de phyllody (MacLean et al. 2014) et (iv) l'inhibition du protéasome 26S empêche la dégradation de SEP3 par PHYL1<sub>OY</sub> et de SEP3 et AP1 par SAP54 (MacLean et al. 2014; Maejima et al. 2014).

Ainsi les effecteurs PHYL1<sub>OY</sub> et SAP54 bloquent la différenciation des organes floraux en liant et dégradant les TFs SEP3 (et sûrement SEP1, SEP2 et SEP4) et AP1 (Figure 28). En ce qui concerne l'effecteur PHYL1<sub>PnWB</sub>, il est fort probable qu'il suive les mêmes mécanismes d'action que PHYL1<sub>OY</sub> et SAP54 mais seule son interaction directe avec le domaine K de SEP3 a été documentée jusqu'à présent (C.-Y. Yang et al. 2015).

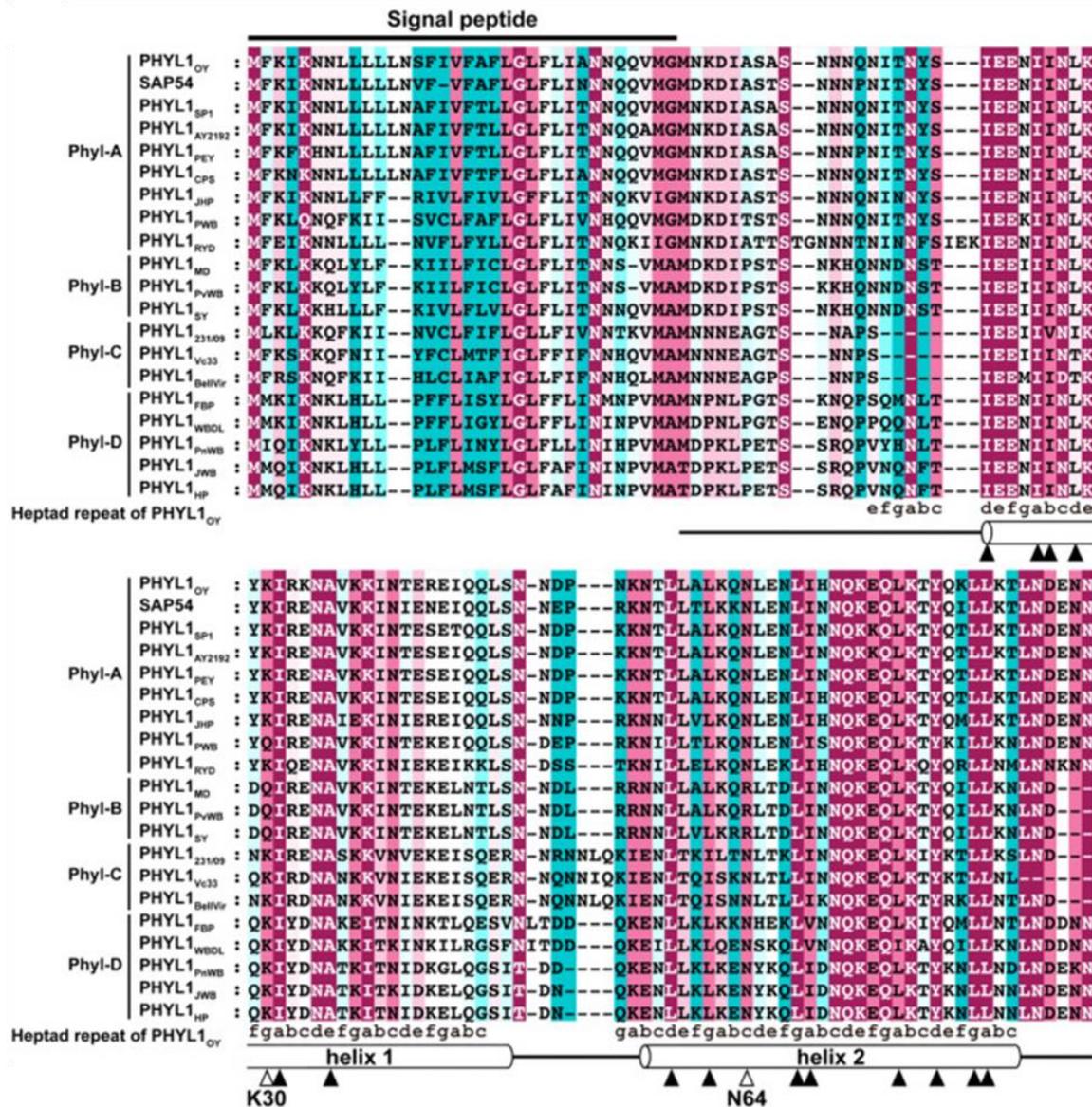


**Figure 28 : Schéma des mécanismes d'action des effecteurs de phytoplasmes induisant la phyllodie et la virescence.** Il n'a pas été montré si les effecteurs pouvaient lier simultanément RAD23 et un MADS-TF et si l'étape d'ubiquitination intervient avant ou après la liaison de l'effecteur avec RAD23. La forme pointillée jointe au point d'interrogation montre les possibles mécanismes d'actions de PHYL1<sub>PnWB</sub> expliquant les symptômes observés. Les textes en italique indiquent les phénotypes observés chez une plante infectée. Ub : ubiquitine.

### c. Structure des effecteurs phylogènes et interaction avec le domaine K des MADS-TFs floraux

#### i. La structure hélicoïdale des phylogènes confère de fortes propriétés d'interaction protéine-protéine

Comme nous l'avons évoqué précédemment, les effecteurs de la famille des phylogènes ont une séquence primaire en acides aminés et une structure secondaire très similaires (Figure 29). En effet, des prédictions de structure de SAP54 ont montré que la protéine comporte deux hélices  $\alpha$  séparées par quelques acides aminés créant une rupture du motif hélicoïdal. Ces hélices comportent des répétitions d'heptades riches en acides aminés hydrophobes avec une majorité de leucines sur la deuxième hélice  $\alpha$ . Ces deux premières évidences ont fortement suggéré la capacité de SAP54, et plus largement des phylogènes, à former des interactions en leucine-zipper avec d'autres protéines à la manière dont les MADS-TFs du FQM interagissent (Figure 29) (Rümler et al. 2015; Aurin et al. 2020).



**Figure 29 : Alignement de séquences de la famille des effecteurs phylogènes d'après Iwabuchi et al. 2020.** La conservation des acides aminés est représentée par la gamme de couleurs allant de cyan (non conservé), blanche (assez conservé) à magenta (très conservé). La séquence signal et les hélices  $\alpha$  sont représentées par le trait noir et les cylindres en haut et en bas des séquences respectivement. Les flèches noires et blanches représentent les acides aminés hydrophobes conservés et les polymorphismes spécifiques au groupe B respectivement. Les motifs hydrophobiques de type leucine-zipper sont représentés par les heptades de lettres « abcdefg » en bas des séquences.

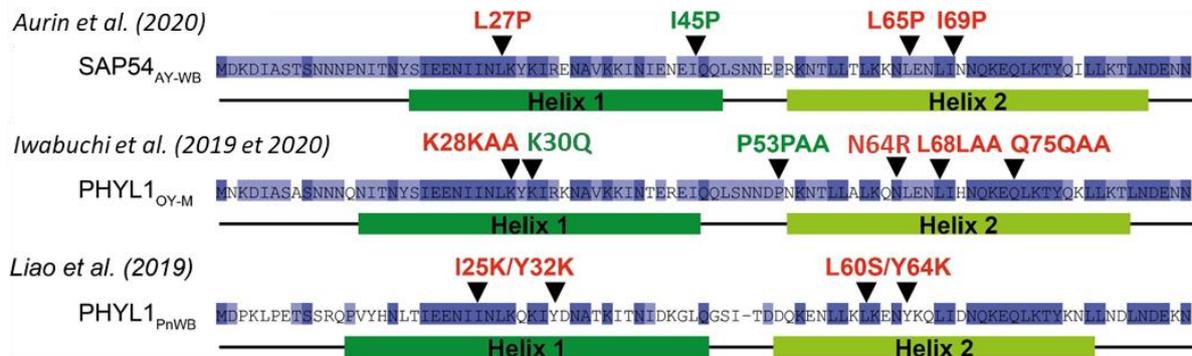
Ces observations faites sur SAP54 ont été confirmées grâce à la caractérisation de deux structures tridimensionnelle de phylogènes : PHYL1<sub>OY</sub> et PHYL1<sub>PnWB</sub> (Figure 30) (Iwabuchi et al. 2019; Liao et al. 2019). Ces structures démontrent la capacité des phylogènes à former des interactions en coiled-coil grâce à l'orientation des acides aminés hydrophobes des hélices tournés vers l'intérieur de l'épingle à cheveux (Figure 30.B) (Iwabuchi et al. 2019; Liao et al. 2019). Cette orientation particulière des acides aminés hydrophobes permet la formation d'un



de SAP54 sont nécessaires pour l'interaction avec les MADS-TFs. En revanche, le pont reliant les deux hélices  $\alpha$  n'est pas important pour l'interaction (Aurin et al. 2020). De même, (Iwabuchi et al. 2019) ont montré par Y2H et co-expression de PHYL1<sub>OY</sub> et SEP3 dans des feuilles de tabac suivie de western blot, qu'une double insertion d'alanines placée dans les hélices  $\alpha$  de PHYL1<sub>OY</sub> (K28KAA, L68LAA et Q75QAA) empêche l'interaction avec SEP3 et RAD23C. En revanche, lorsque ces deux alanines sont insérées dans le pont (P53PAA), les interactions sont conservées (Figure 31). Les plants d'*A. thaliana* exprimant ces différents mutants restaurent le phénotype de plantes sauvages sauf pour la mutation P53PAA. De plus, la double substitution d'acides aminés hydrophobes sur la deuxième hélice  $\alpha$  de PHYL1<sub>PnWB</sub> (L60S-Y64K) empêche l'interaction avec SEP3 K. En revanche, la double substitution d'acides aminés hydrophobes sur la première hélice  $\alpha$  de PHYL1<sub>PnWB</sub> (I25KY32K) n'affaiblit que très peu l'interaction et la dégradation de SEP3 comme l'ont montré les expériences de co-IP et d'expression transitoire dans des feuilles de tabac suivie d'immunoprécipitation (Liao et al. 2019). Cela suggère que la deuxième hélice  $\alpha$  de PHYL1<sub>PnWB</sub> serait plus importante que la première pour l'interaction et pourrait agir comme un senseur d'une hélice  $\alpha$  de SEP3. De manière assez inattendue, il a été observé dans cette étude que PHYL1<sub>PnWB</sub> peut interagir avec SEP3FL et SEP3K mais ne peut dégrader que la version FL de SEP3. Ceci suggère que l'interaction est liée au domaine K mais que la dégradation serait dépendante d'un autre domaine de SEP3 (Liao et al. 2019). Il a été observé par EMSA que la délétion de l'hélice  $\alpha$  K3 de SEP3 (impliquée dans la tétramérisation) serait nécessaire à l'interaction avec SAP54 (Aurin et al. 2020). Ces études nous permettent donc de réduire l'interaction des phyllogènes et SEP3 aux deux hélices  $\alpha$  des phyllogènes (probablement la deuxième hélice  $\alpha$  jouant le rôle de senseur pour faciliter l'interaction) et possiblement à l'hélice  $\alpha$  K3 de SEP3, toutes trois riches en acides aminés hydrophobes et particulièrement en leucines.

Au sein de ces hélices  $\alpha$ , les acides aminés hydrophobes sembleraient jouer un rôle particulièrement important. Comme l'ont montré les expériences de dichroïsme circulaire, certains acides aminés hydrophobes des hélices  $\alpha$  de SAP54 (L27 et L65) sont importants pour la capacité de réaliser des interactions en coiled-coil de la protéine. Lorsque ces mêmes acides aminés sont substitués en proline, la structure de l'hélice  $\alpha$  est perturbée, l'interaction avec les MADS-TFs est rompue en Y2H et les symptômes de phyllodie abolis chez *A. thaliana* (Aurin et al. 2020). On peut également rappeler que les doubles insertions d'alanines réalisées sur

PHYL1<sub>OY</sub> modifie la structure des hélices  $\alpha$  et induisent une rotation axiale de 200° de l'hélice  $\alpha$  changeant l'orientation des acides aminés hydrophobes les uns par rapport aux autres. Ce changement d'orientation pourrait être responsable de la perte d'interaction (Iwabuchi et al. 2019).



**Figure 31 : Schéma des différentes mutations de phylogènes testées en interaction avec des MADS-TFs d'après Aurin et al. 2020.** Les mutations en rouge annihilent les phénotypes de phyllodie et l'interaction entre MADS-TFs et phylogènes alors que les mutations en vert ne changent pas les phénotypes de phyllodie et l'interaction entre MADS-TFs et phylogènes.

Récemment, il a été montré que les phylogènes peuvent être séparés en quatre groupes au vu de leur séquence. Le groupe Phyl-B n'induit aucun phénotype de phyllodie contrairement aux trois autres groupes Phyl-A, Phyl-C et Phyl-D (Figure 29) (Iwabuchi et al. 2020). Cette différence de phénotype peut être expliquée par deux polymorphismes d'acides aminés aux positions 30 et 64. En effet, les expériences de co-expression transitoire dans des feuilles de tabac suivies de western blot montrent que la double substitution K30Q/N64R chez les phylogènes des groupes A, C et D inhibe la dégradation des SEP et d'AP1. Ces observations ont été corroborées par l'expression de PHYL1<sub>OY</sub>, PHYL1<sub>231/09</sub> et PHYL1<sub>PnWB</sub> (groupe A, C et D respectivement) comportant chaque substitution ou la double substitution chez *A. thaliana*. Chez les phylogènes des groupes A, C et D, la seule substitution K30Q n'altère pas les phénotypes de phyllodie alors que la substitution N64R semble limiter en très grande partie les phénotypes de phyllodie et que la double substitution annule complètement les phénotypes de phyllodie chez *A. thaliana*. Inversement, la substitution R64N et la double substitution Q30K/R64N chez PHYL1<sub>SY</sub> (groupe B) induisent des phénotypes de phyllodie similaires à ceux induits par les phylogènes des groupes A, C et D chez *A. thaliana* mais pas la substitution Q30K. De plus, il a été montré par Y2H que les phylogènes du groupe B interagissent aussi bien avec RAD23C et D que les phylogènes des autres groupes suggérant

que la baisse de dégradation observée avec les substitutions serait liée à l'interaction entre les phyllogènes et les MADS-TFs et non à l'étape de liaison à RAD23 C et D. L'acide aminé N64 de PHYL1<sub>0Y</sub> jouerait donc un rôle très important dans l'interaction des phyllogènes et des MADS-TFs.

---

### *En résumé*

---

Nous avons d'abord vu que les MADS-TFs jouent des rôles primordiaux dans la formation des organes floraux. Leur structure spécifique leur permet, notamment grâce à leur domaine K, de former des tétramères nécessaires à l'activation des gènes engendrant la formation de ces organes. Ce domaine K est ciblé par certains effecteurs de bactéries phytoplasmes, les phyllogènes. Cette interaction est suivie d'une dégradation des MADS-TFs ciblés, comme SEP3, qui engendre la malformation des organes floraux et la stérilité de la plante. Cependant, les mécanismes précis de l'interaction entre les phyllogènes, comme PHYL1<sub>0Y</sub>, et les MADS-TFs restent inconnus et de nombreuses questions demeurent sans réponse. Comment les phyllogènes ciblent-ils spécifiquement certains MADS-TFs ? Quels acides aminés déterminent cette spécificité et quelle est l'affinité de l'interaction ? Comment l'interaction des phyllogènes aux MADS-TFs change-t-elle leur capacité à lier l'ADN ? Pour tenter de répondre à ces questions, j'ai étudié l'interaction entre PHYL1<sub>0Y</sub> et les MADS-TFs. Je me suis plus particulièrement intéressé à l'interaction entre PHYL1<sub>0Y</sub> et le complexe SEP3/AG, impliqué dans la morphogénèse de la couronne 4, et j'ai obtenu des résultats offrant de précieux indices qui sont présentés dans le Chapitre III :

## Chapitre II : Matériels et méthodes

## I. Matériels biologiques

### A. Matériel végétal

La plante modèle *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) d'écotype *Columbia* (Col-0) est utilisée pour la génération des plantes transgéniques *35S::PHYL1<sub>0Y</sub>*, *AP1::PHYL1<sub>0Y</sub>* et *SEP3::PHYL1<sub>0Y</sub>*. Des plantes *A. thaliana* mutantes *sep3*, *sep1sep2* et *sep1sep2sep3+/-* sont utilisées pour la génération des plantes transgéniques *sep3 SEP3::PHYL1<sub>0Y</sub>*, *sep1sep2 SEP3::PHYL1<sub>0Y</sub>*, *sep1sep2sep3+/- SEP3::PHYL1<sub>0Y</sub>* et *sep1sep2sep3 SEP3::PHYL1<sub>0Y</sub>* respectivement. Les plantes mutantes *sep3* sont des mutants nuls générés par CRISPR-Cas9 et fournis par le groupe de K. Kaufmann. Les mutants *sep1sep2* et *sep1sep2sep3+/-* ont été générés par croisements des mutants *sep1* (mutant nul T-DNA insertion, Soraya Pelaz et al. 2001), *sep2* (mutant nul généré au laboratoire par CRISPR-Cas9) et *sep3*.

### B. Matériel bactérien

Les bactéries *Escherichia coli* (*E. coli*) de souche *DH5 $\alpha$*  (Merck Millipore) sont utilisées pour l'amplification de plasmides. Cette souche ne contient aucune résistance spécifique aux antibiotiques.

Les bactéries *E. coli* de souche *Rosetta™2* (Novagen) sont utilisées pour la production de protéines recombinantes. Cette souche contient le gène de l'acide ribonucléique (ARN) polymérase T7 sous le contrôle du promoteur lacUV5 qui peut être induit par ajout d'isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) et permet la transcription du gène transformant et la synthèse de la protéine d'intérêt. Cette souche contient également un gène de résistance au chloramphénicol et le gène tARN qui permet d'améliorer le rendement des protéines produites.

Les agrobactéries *Agrobacterium tumefaciens* de souche *C58C1* (*pMP90*) sont utilisées pour les transformations de plantes. Cette souche contient deux gènes de résistance à la rifampicine et la gentamycine respectivement.

### C. Matériel de levures

Les levures *Saccharomyces cerevisiae* de souche *AH109* et *Y187* (Clontech) sont utilisées pour les expériences de Yeast-Two-Hybrid et sont transformées par les plasmides pGAD-T7 et pGBK-T7 respectivement (Annexe 1 et Annexe 2, Clontech). La souche *AH109* contient quatre

gènes rapporteurs *HIS3*, *ADE2*, *MEL1* et *lacZ* sous le contrôle de trois promoteurs distincts GAL1 (pour *HIS3*), GAL2 (pour *ADE2*), et MEL1 (pour *MEL1* et *lacZ*). Ces quatre gènes codent respectivement pour la synthèse d'histidine, d'adénine, d' $\alpha$ -galactosidase et de  $\beta$ -galactosidase. Les promoteurs contrôlant leur expression peuvent être induits par le TF Gal4 ou par un assemblage de ses 2 sous-unités : Gal4AD et Gal4BD. Lors de l'induction de ces promoteurs, l'adénine et l'histidine (entre autres) sont synthétisées.

Le système utilisé est le système Matchmaker™ GAL4 Two-Hybrid System 3 (Clontech) et détaillé dans la section Identification des interactions par Yeast Two-Hybrid.

## II. Méthodes

### A. Technique générale de clonage

Tous les clonages réalisés dans cette thèse sont effectués par Gibson Assembly® (Gibson et al. 2009). Cette technique permet l'assemblage d'un ou plusieurs inserts avec un plasmide préalablement linéarisé, grâce à la complémentarité des brins d'ADN. La séquence des amorces à utiliser pour la PCR est générée grâce au logiciel NEBuilder® Assembly Tool et assure la complémentarité des bases entre l'insert et le plasmide linéarisé ou entre les différents inserts.

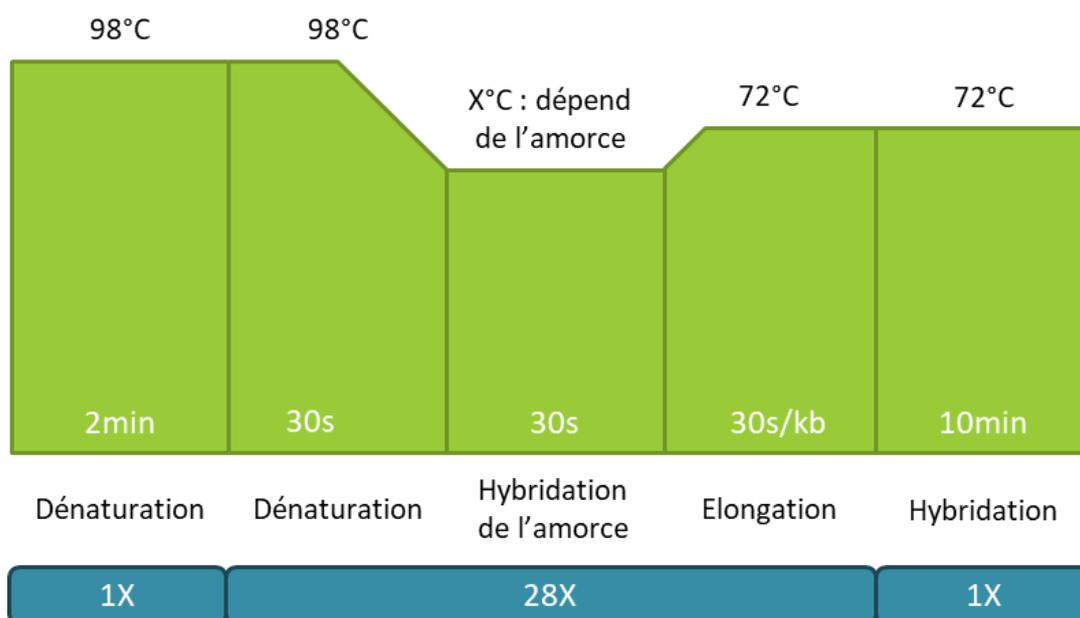
Le plasmide peut être linéarisé soit par PCR soit par digestion enzymatique.

#### 1. Amplification des inserts et linéarisation de plasmides par PCR

Toutes les amplifications de gènes et linéarisation de plasmides par PCR réalisées dans cette thèse suivent le protocole suivant :

- 50ng de plasmide contenant le gène d'intérêt ou de plasmide à linéariser
- 0,2µM de l'amorce Forward
- 0,2µM de l'amorce Reverse
- 0,2mM de désoxyribonucléosides triphosphates (dNTP)
- 0,25µL de Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific)
- 5µL de tampon Phusion GC 5X (Thermo Scientific)
- de l'eau Milli-Q® en quantité suffisante pour (QSP) 25µL

Les mélanges PCR obtenus sont ensuite incubés sous différentes températures et temps détaillés sur la Figure 32.



**Figure 32 : Détails des températures, temps et nombre de cycles utilisés pour les réactions de PCR réalisées dans ce manuscrit.** Les températures d'hybridation des différentes amorces utilisées sont répertoriées Annexe 3.

Le produit PCR de plasmide linéarisé est digéré 1h à 37°C par l'enzyme DpnI pour dégrader le plasmide modèle de la PCR et ne conserver que le plasmide linéarisé. L'ensemble des amorces utilisées dans cette thèse est répertorié (Annexe 3).

## 2. Linéarisation des plasmides par digestion enzymatique

Les plasmides pGAD-T7 et pGBK-T7 sont linéarisés par EcoRI-HF (NEB) et les plasmides pFP100, pFP101 et pSP64 PolyA par BamHI-HF (NEB). Pour cela, 5µg de plasmide auxquels sont ajoutés 2µL d'enzyme de restriction, 5µL de tampon CutSmart® (NEB) et de l'eau Milli-Q® en QSP 50µL sont incubés à 37°C pendant 1h.

## 3. Purification des inserts et plasmides et ligation par Gibson Assembly®

Les fragments (plasmides linéarisés et inserts) sont ensuite purifiés (à l'aide du kit Monarch® DNA Gel Extraction) sur gel d'agarose composé de TBE 1X (Tris 89mM, Borate 89mM, EDTA 20mM) et d'agarose 1%. Ensuite, la liaison entre les différents fragments et le plasmide est réalisée par ajout de dNTP, de ligase d'acide désoxyribonucléique (ADN), d'exonucléase et d'ADN polymérase. Le mix final de 20µL Gibson Assembly® contient :

- 15µL de mix (Tris HCl 133mM, dNTPs 0,27mM, 0,05u de T5 exonuclease (NEB), 0,5u d'ADN polymerase (Phusion High Fidelity DNA Polymerase NEB) et 80u de T4 DNA ligase (NEB))
- 100ng de vecteur
- un excès d'insert (calculé pour avoir trois fois plus de moles d'insert que de vecteur)
- de l'eau Milli-Q® en QSP 20µL

Ce mélange est incubé 1h à 50°C.

#### 4. Transformation thermique des bactéries

10µL du mélange (plasmide+inserts) sont ajoutés à 50µL de bactéries *E. coli DH5α* compétentes puis incubés à 4°C pendant 10 minutes. Ce mélange est ensuite incubé 45 secondes à 42°C (choc thermique) puis 2 minutes à 4°C. 450µL de Luria-Bertani (LB 20g/L) liquide sont ajoutés aux bactéries de façon stérile et incubés 1h à 37°C à 150 tours par minutes (rpm). De façon stérile, la totalité de ce mélange est étalée sur milieu LB/Agar (LB 20g/L et Agar 15g/L) auquel est ajouté un antibiotique. Cet antibiotique est déterminé par le gène de résistance contenu dans le plasmide utilisé pour la transformation (Tableau 2). Les boîtes sont incubées 16h à 37°C et les colonies isolées obtenues sont testées par PCR (sur colonie) pour vérifier la présence de l'insert avec les amorces utilisées pour synthétiser l'insert correspondant. Les colonies positives sont repiquées dans milieu sélectif LB (LB 20g/L) liquide auquel est ajouté l'antibiotique correspondant. Les plasmides sont purifiés (à l'aide du kit Macherey-Nagel™ NucleoSpin™ Gel and PCR Clean-up) puis séquencés (Eurofins Genomics) par divers amorces présentes dans le plasmide (Tableau 2) ou sur l'insert afin de vérifier la séquence du gène d'intérêt et la conservation du cadre de lecture si besoin.

Plasmide utilisé	Utilisation des clones	Résistance	Linéarisation du plasmide	Amorces de séquençage (5'-3') Forward : F et Reverse : R
pGAD-T7	Yeast-Two-Hybrid	Carbénicilline	Digestion par EcoRI-HF	Promoteur T7 F : TAATACGACTCACTATAGG
pGBK-T7		Kanamycine		
pFP101	Plantes transgéniques	Spectinomycine	Digestion par BamHI-HF	CACATACAAATGGACGAAC
pFP100				F : CACATACAAATGGACGAAC R : CTCTCTCTACAAATCTATC
pGEX-4T-1	Production de protéines recombinantes	Carbénicilline	Construction déjà réalisée	F : TGACAATTAATCATCGGCTCGTATAATGT R : GAGCTGCATGTGTCAGAGG
pESPRIT2		Kanamycine	Construction déjà réalisée et PCR	Terminateur T7 R : CTAGTTATTGCTCAGCGGT
pETDuet-1		Carbénicilline	Construction déjà réalisée et PCR	F : GATGCGTCCGGCGTAGAG R : TTATGCGGCCGTGACAATACG Duet UP2 F : TTGTACAGCCGCATAATC Terminateur T7 R : CTAGTTATTGCTCAGCGGT
pSP64 PolyA	Production de protéines pour EMSA	Carbénicilline	Digestion par BamHI-HF	M13 R -49 : GTCATAGCTGTTTCCTG
pTNT			Construction déjà réalisée	Séquençage déjà réalisé

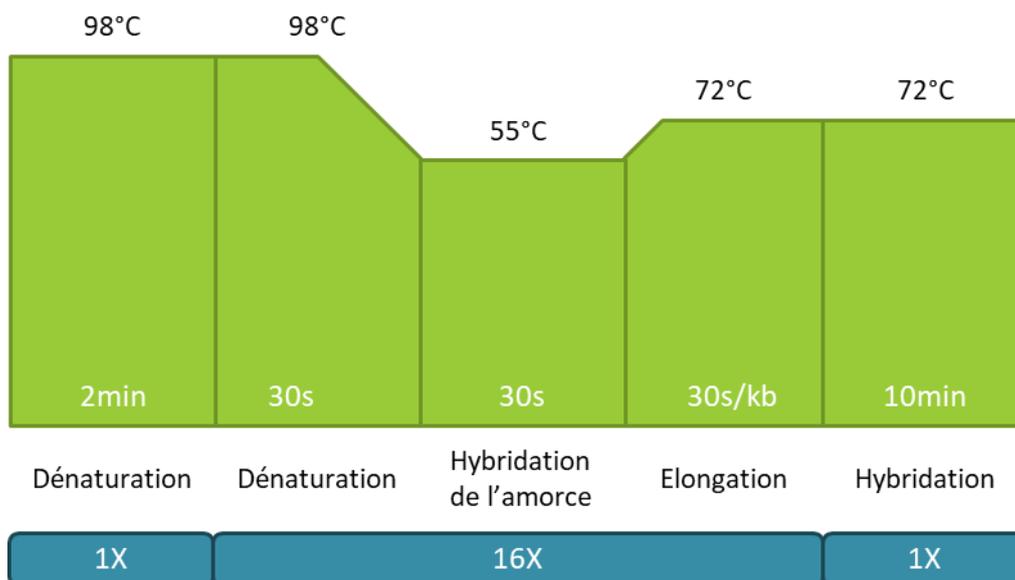
**Tableau 2 : Description des plasmides utilisés.**

## B. Mutagenèse dirigée

Toutes les mutagenèses dirigées sont réalisées par PCR. Un mélange PCR est réalisé en suivant le protocole suivant :

- 50ng de plasmide à muter
- 0,2µM de l'amorce Forward
- 0,2µM de l'amorce Reverse
- 0,2mM de dNTP
- 3% de diméthylsulfoxyde (DMSO)
- 0,5µL (1µL pour les plasmides > 6kb) de Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific)
- 10µL de tampon Phusion GC 5X (Thermo Scientific)
- de l'eau Milli-Q® en QSP 50µL

Ce mélange PCR obtenu est ensuite incubé sous différentes températures et temps détaillés sur la Figure 33.



**Figure 33 : Détails des températures, temps et nombre de cycles utilisés pour les réactions de PCR de mutagenèse dirigée.**

Le produit PCR est digéré 1h à 37°C par l'enzyme DpnI pour dégrader le plasmide modèle de la PCR et ne conserver que les plasmides mutés. 10µL de ce produit PCR digéré sont ajoutés à 50µL de bactéries *E. coli DH5α* compétentes qui sont transformées comme décrit précédemment.

## C. Identification des interactions par Yeast Two-Hybrid

### 1. Système choisi

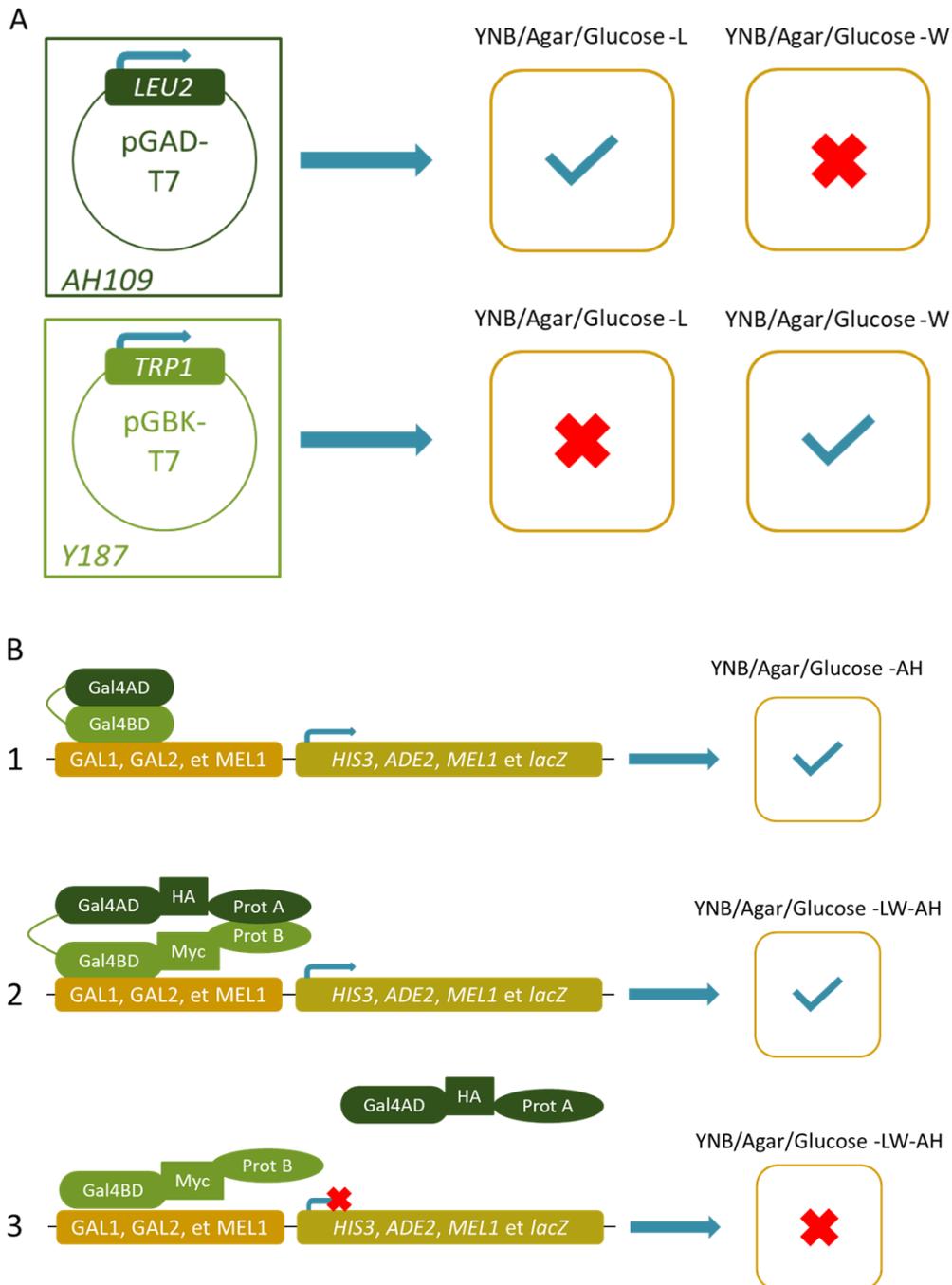
Les souches *AH109* et *Y187* sont transformées par les plasmides pGAD-T7 et pGBK-T7 respectivement. En levure, la sélection des transformants se fait grâce à la production d'acides aminés ou de nucléotides essentiels à la vie de levure sur milieu appauvri Yeast Nitrogen Base (YNB) dépourvu de ces acides aminés ou nucléotides. Le système choisi ici sélectionne les transformants par la production d'acides aminés.

### 2. Sélections apportées par les vecteurs et les souches de ce système

Lorsqu'ils sont exprimés, pGAD-T7 et pGBK-T7 expriment le gène *LEU2* codant pour la 3-isopropylmalate déshydrogénase (nécessaire pour la synthèse de leucine) et le gène *TRP1* codant pour la phosphoribosylanthranilate isomérase (nécessaire pour la synthèse du tryptophane) respectivement. Ainsi sur milieu YNB/Agar/Glucose sans leucine (-L) seules les colonies comportant le plasmide pGAD-T7 peuvent survivre (Figure 34.A). Il en va de même pour un milieu YNB/Agar/Glucose sans tryptophane (-W) et le plasmide pGBK-T7.

Le vecteur pGAD-T7 contient la séquence de Gal4AD suivie du tag Human influenza hémagglutinine (HA) et de la séquence d'intérêt insérée (appelée ici protéine A). Le vecteur pGBK contient la séquence de Gal4BD suivie du tag human c-Myc oncogène (Myc) et de l'autre séquence d'intérêt insérée (appelée ici protéine B). Après traduction, les séquences obtenues sont Gal4AD-HA-ProtA et Gal4BD-Myc-ProtB. Si les deux protéines A et B interagissent, elles permettent la liaison des deux sous-unités de Gal4 qui induisent les promoteurs GAL1 et GAL2 de la souche *AH109*, entraînant la synthèse d'histidine et d'adénine respectivement (Figure 34.B.1). En revanche si les deux protéines A et B n'interagissent pas, l'adénine et l'histidine ne sont pas synthétisées et la levure ne pousse pas (Figure 34.B.2). Une deuxième sélection est donc possible sur milieu YNB/Agar/Glucose -AH.

Sur milieu YNB/Agar/Glucose -LW-AH, les levures qui survivent contiennent les deux plasmides et les deux protéines dont l'interaction est testée et confirmée (permettant la liaison de Gal4AD et BD, Figure 34.B.2).



**Figure 34 : Schéma des sélections des expériences de Yeast-Two-Hybrid. (A)** Sélection par le plasmide. **(B)** Sélection par les souches. **(1)** Lorsque Gal4AD et BD sont liés, les gènes rapporteurs sont exprimés et permettant la synthèse d'adénine et d'histidine. **(2)** Lorsque que les deux protéines A et B interagissent, Gal4AD et BD se lient. Ceci permet l'expression des gènes rapporteurs et la synthèse d'adénine et d'histidine (la leucine et le tryptophane sont fournis par le croisement des deux plasmides pGAD-T7 et pGBK-T7). **(3)** Lorsque que les deux protéines A et B n'interagissent pas, Gal4AD et BD ne se lient pas et les levures ne poussent pas.

### 3. Constructions réalisées

Le Tableau 3 répertorie l'ensemble des constructions utilisées pour ces expérimentations.

Nom du vecteur	Insert total (en a.a)	Insert total (en domaines de MADS)	Nom du vecteur	Insert total (en a.a)	Insert total (en domaines de MADS)
pGAD-T7	Aucun	Aucun	pGAD-T7	<u>SEP3<sup>M164A+L171A</sup></u>	<u>MIKC</u>
pGAD-T7	SEP3 <sup>[1-252]</sup>	MIKC	pGAD-T7	<u>SEP3<sup>M150A+L154A+L164A</sup></u>	<u>MIKC</u>
pGAD-T7	SEP3 <sup>[1-90]</sup>	MI	pGAD-T7	<u>SEP3<sup>M150A+L154A+L157A+L164A</sup></u>	<u>MIKC</u>
pGAD-T7	SEP3 <sup>[1-173]</sup>	MIK	pGAD-T7	<u>SEP3<sup>Δ161-174+M150A+L154A+L157A</sup></u>	<u>MIKC</u>
pGAD-T7	SEP3 <sup>[59-252]</sup>	IKC	pGAD-T7	<u>SEP1<sup>[1-252]</sup></u>	<u>MIKC</u>
pGAD-T7	SEP3 <sup>[91-252]</sup>	KC	pGAD-T7	<u>SEP2<sup>[1-251]</sup></u>	<u>MIKC</u>
pGAD-T7	SEP3 <sup>[75-178]</sup>	K	pGAD-T7	<u>SEP4_2<sup>[1-258]</sup></u>	<u>MIKC</u>
pGAD-T7	SEP3 <sup>Δ161-174</sup>	MIKC	pGAD-T7	AG <sup>[1-253]</sup>	MIKC
<u>pGAD-T7</u>	<u>SEP3<sup>M150A</sup></u>	<u>MIKC</u>	pGAD-T7	AP1 <sup>[1-257]</sup>	MIKC
<u>pGAD-T7</u>	<u>SEP3<sup>L154A</sup></u>	<u>MIKC</u>	pGAD-T7	AP3 <sup>[1-233]</sup>	MIKC
<u>pGAD-T7</u>	<u>SEP3<sup>L157A</sup></u>	<u>MIKC</u>	pGAD-T7	AP3 <sup>[59-233]</sup>	IKC
<u>pGAD-T7</u>	<u>SEP3<sup>L164A</sup></u>	<u>MIKC</u>	<u>pGAD-T7</u>	<u>AP3<sup>59-233+T150L</sup></u>	<u>IKC</u>
<u>pGAD-T7</u>	<u>SEP3<sup>L171A</sup></u>	<u>MIKC</u>	<u>pGAD-T7</u>	<u>AP3<sup>59-233+Q157L</sup></u>	<u>IKC</u>
<u>pGAD-T7</u>	<u>SEP3<sup>M150A+L154A</sup></u>	<u>MIKC</u>	<u>pGAD-T7</u>	<u>AP3<sup>59-233+T150L+Q157L</sup></u>	<u>IKC</u>
<u>pGAD-T7</u>	<u>SEP3<sup>M150A+L157A</sup></u>	<u>MIKC</u>	pGAD-T7	PI <sup>[1-209]</sup>	MIKC
<u>pGAD-T7</u>	<u>SEP3<sup>M150A+L164A</sup></u>	<u>MIKC</u>	pGAD-T7	PI <sup>[59-209]</sup>	IKC
<u>pGAD-T7</u>	<u>SEP3<sup>M150A+L171A</sup></u>	<u>MIKC</u>	pGBK-T7	Aucun	Aucun
<u>pGAD-T7</u>	<u>SEP3<sup>M154A+L164A</sup></u>	<u>MIKC</u>	pGBK-T7	SEP3 <sup>[1-252]</sup>	MIKC
<u>pGAD-T7</u>	<u>SEP3<sup>M154A+L171A</sup></u>	<u>MIKC</u>	pGBK-T7	AG <sup>[1-253]</sup>	MIKC
<u>pGAD-T7</u>	<u>SEP3<sup>M157A+L164A</sup></u>	<u>MIKC</u>	<u>pGBK-T7</u>	<u>PHYL1<sub>oy</sub></u>	<u>Aucun</u>
<u>pGAD-T7</u>	<u>SEP3<sup>M157A+L171A</sup></u>	<u>MIKC</u>			

**Tableau 3 : Constructions réalisées et utilisées en Y2H dans cette thèse.** Les constructions soulignées sont celles réalisées durant ma thèse.

Les constructions dans pGAD-T7 SEP3<sup>[1-252]</sup>, SEP3<sup>[1-90]</sup>, SEP3<sup>[1-173]</sup>, SEP3<sup>[59-252]</sup>, SEP3<sup>[91-252]</sup>, SEP3<sup>[75-178]</sup>, SEP3<sup>Δ161-174</sup>, AG<sup>[1-253]</sup>, AP1<sup>[1-257]</sup>, AP3<sup>[1-233]</sup>, AP3<sup>[59-233]</sup>, PI<sup>[1-209]</sup> et PI<sup>[59-209]</sup> et les constructions dans pGBK-T7 SEP3<sup>[1-252]</sup> et AG<sup>[1-253]</sup> étaient disponibles au laboratoire à mon arrivée (Tableau 3, constructions non soulignées). Les séquences SEP1<sup>[1-252]</sup> (amorces 1, Annexe 3), SEP2<sup>[1-251]</sup> (amorces 2, Annexe 3) et SEP4\_2<sup>[1-258]</sup> (amorces 3, Annexe 3) ont été amplifiées par PCR à partir de cDNA de fleur et les séquences SEP3<sup>M150A+L154A+L164A</sup>, SEP3<sup>M150A+L154A+L157A+L164A</sup> et SEP3<sup>Δ161-174+M150A+L154A+L157A</sup> ont été amplifiées (amorces 4, Annexe 3) à partir de constructions déjà présentes au laboratoire. Le vecteur pGAD-T7 est digéré par l'enzyme EcoRI-HF et les différents fragments obtenus sont purifiés et liés par Gibson Assembly<sup>®</sup> comme décrit précédemment. La construction PHYL1<sub>oy</sub> dans pGBK-T7 est réalisée en digérant le vecteur pGBK-T7 par l'enzyme EcoRI-HF et en amplifiant la séquence de PHYL1<sub>oy</sub>

(amorces 5, Annexe 3) du vecteur pGEX-4T-1\_PHYL1<sub>0Y</sub> fourni par nos collaborateurs (Iwabuchi et al. 2019). De même, ces deux fragments sont purifiés et liés par Gibson Assembly<sup>®</sup> comme décrit précédemment. Les constructions SEP3<sup>M150A</sup> (amorces 6, Annexe 3), SEP3<sup>L154A</sup> (amorces 7, Annexe 3), SEP3<sup>L157A</sup> (amorces 8, Annexe 3), SEP3<sup>L164A</sup> (amorces 9, Annexe 3), SEP3<sup>L171A</sup> (amorces 10, Annexe 3) et SEP3<sup>M150A+L154A</sup> (amorces 11, Annexe 3) sont réalisées par mutagénèse dirigée à partir de la construction pGAD-T7\_SEP3<sup>[1-252]</sup>. Les constructions SEP3<sup>M150A+L157A</sup> (amorces 8, Annexe 3), SEP3<sup>M150A+L164A</sup> (amorces 9, Annexe 3) et SEP3<sup>M150A+L171A</sup> (amorces 10, Annexe 3) sont réalisées par mutagénèse dirigée à partir de la construction pGAD-T7\_SEP3<sup>M150A</sup>. Les constructions SEP3<sup>M154A+L164A</sup> (amorces 9, Annexe 3) et SEP3<sup>M154A+L171A</sup> (amorces 10, Annexe 3) sont réalisées par mutagénèse dirigée à partir de la construction pGAD-T7\_SEP3<sup>M154A</sup>. Les constructions SEP3<sup>M157A+L164A</sup> (amorces 9, Annexe 3) et SEP3<sup>M157A+L171A</sup> (amorces 10, Annexe 3) sont réalisées par mutagénèse dirigée à partir de la construction pGAD-T7\_SEP3<sup>M157A</sup>. La construction SEP3<sup>M164A+L171A</sup> (amorces 10, Annexe 3) est réalisée par mutagénèse dirigée à partir de la construction pGAD-T7\_SEP3<sup>M164A</sup>. Les constructions AP3<sup>59-233+T150L</sup> (amorces 12, Annexe 3) et AP3<sup>59-233+Q157L</sup> (amorces 13, Annexe 3) sont réalisées par mutagénèse dirigée à partir de la construction pGAD-T7\_AP3<sup>[59-233]</sup>. La construction AP3<sup>59-233+T150L+Q157L</sup> (amorces 13, Annexe 3) est réalisée par mutagénèse dirigée à partir de la construction pGAD-T7\_AP3<sup>59-233+T150L</sup>.

#### 4. Technique de Yeast-Two-Hybrid

Tous les composants des milieux de levures proviennent de MP Biomedicals. Toutes les manipulations sont réalisées à température ambiante (20°C) de façon stérile avec des solutions stériles.

##### a. Jour 1 : Préparation de levures à transformer

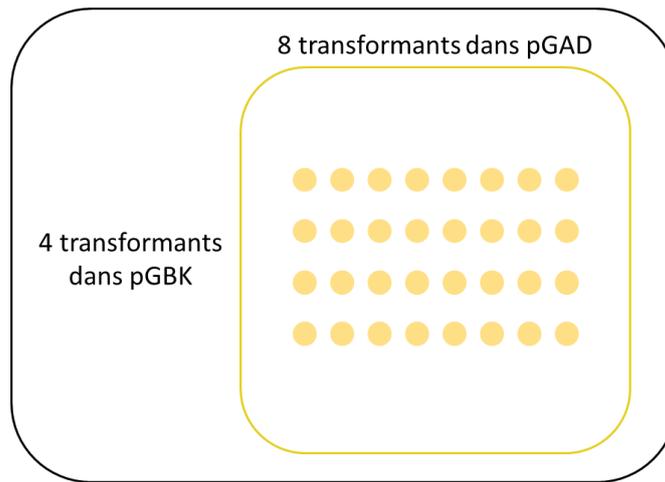
Une colonie de souche *AH109* est prélevée et homogénéisée dans 1,5mL d'eau Milli-Q<sup>®</sup>. La même chose est réalisée avec la souche *Y187* dans un autre tube. Des gouttes de 50µL sont déposées sur milieu riche Yeast Extract-Peptone-Dextrose (YPD)/Agar/Adénine (YPD 50g/L, Agar 17 g/L et Adénine 20mg/L). Les gouttes des deux souches sont déposées sur des boîtes différentes afin d'éviter toute contamination. Une fois les gouttes sèches, les boîtes sont incubées 24h à 30°C.

### b. Jour 2 : Transformation des levures

Ici la souche *AH109* est transformée par les constructions dans pGAD-T7 et la souche *Y187* par celles dans pGBK-T7. Pour chaque transformation, trois gouttes de la souche choisie sont homogénéisées dans 1mL d'eau Milli-Q®. Les tubes sont centrifugés 10 secondes à 13000rpm à température ambiante puis le surnageant est jeté. Chaque culot est homogénéisé avec 1mL d'eau Milli-Q®. La centrifugation est répétée et le surnageant jeté à nouveau. Cette étape a pour but de débarrasser les levures d'éventuel reste de milieu avant leur transformation. Dans chaque tube sont ajoutés 10µL d'ADN compétiteur (à 10mg/mL), 1µg du vecteur d'intérêt ainsi que 500µL de solution destinée à fragiliser les levures (PEG 3350 40%, acétate de Lithium 0,1M, TRIS-HCl 10mM pH 7,5, EDTA 1mM) et à les rendre compétentes. Les tubes sont incubés pendant 15 minutes à température ambiante puis 57µL de DMSO sont ajoutés. Les tubes sont mélangés par retournement puis incubés 15 minutes à 42°C (ici se réalise le choc thermique). Les tubes sont ensuite centrifugés 10 secondes à 10000rpm et le surnageant est jeté. 200µL d'eau Milli-Q® sont ajoutés et le culot est resuspendu. Chaque transformant incluant le plasmide pGAD-T7 est ensuite étalé sur boîte YNB/Agar/Glucose -L (YNB 6,7g/L, Agar 17g/L, Glucose 2% et CSM-L 0,69g/L). De même, les transformants incluant le plasmide pGBK-T7 sont étalés sur boîte YNB/Agar/Glucose -W (YNB 6,7g/L, Agar 17g/L, Glucose 2% et CSM-W 0,74g/L). Les boîtes sont incubées 48h à 30°C.

### c. Jour 4 : Croisement des souches

Ici le but est de croiser les souches afin d'obtenir une nouvelle levure contenant les deux vecteurs (pGAD-T7 et pGBK-T7) et donc les deux protéines dont on souhaite tester l'interaction. Une dizaine de colonies de chaque transformant est homogénéisée dans 100µL d'eau Milli-Q®. En prenant l'exemple de la Figure 35, 8 gouttes de 5µL du premier transformant pGBK-T7 sont déposées en ligne sur une boîte YPD/Agar/Adénine. 8 gouttes de 5µL du second transformant pGBK-T7 sont déposées à la ligne et ainsi de suite jusqu'au dernier transformant pGBK-T7 (4 ici). Ensuite, une goutte de 5 µL du premier transformant pGAD-T7 est déposée sur chaque goutte de la première colonne permettant le croisement des deux souches (donc 4 gouttes au total en suivant l'exemple de la Figure 35). Chaque nouveau transformant pGAD-T7 est déposé de la même manière en changeant de colonne. Lorsque les gouttes de croisement sont sèches, la boîte est incubée à 30°C pendant 24h. Sur ce milieu riche, les levures se multiplient et le croisement des deux souches est favorisé.



**Figure 35 : Exemple de croisements de levures.**

#### d. Jour 5 : Sélection des croisements

A partir des boîtes précédentes, pour sélectionner uniquement les levures contenant les deux transformants, chaque goutte est prélevée et striée sur  $\frac{1}{4}$  de boîte YNB/Agar/Glucose -LW (YNB 6,7g/L, Agar 17g/L, Glucose 2% et CSM-LW 0,64g/L). Ces boîtes sont ensuite incubées à 30°C pendant 72h.

#### e. Jour 8 : Dépôt des croisements sur milieu très sélectif et sur milieu sélectif témoin

Chaque croisement est totalement repris dans 500 $\mu$ L d'eau Milli-Q®. L'absorbance de chaque croisement à 600nm est mesurée. Tous les croisements sont ensuite amenés à une absorbance de 10. Ceci a pour but d'homogénéiser les quantités de tous les croisements avant de les déposer sur les deux milieux de façon comparable. Pour chaque croisement, deux dilutions sont réalisées : par 10 ( $A_{600nm}=1$ ) et par 100 ( $A_{600nm}=0,1$ ) dans de nouveaux tubes. Deux milieux sont ensuite préparés : un milieu sélectif YNB/Agar/Glucose-LW et un milieu très sélectif YNB/Agar/Glucose -LW-Adénine Histidine (-AH) (YNB 6,7g/L, Agar 17g/L, Glucose 2% et CSM-LW-AH 0,61g/L). Le premier milieu est utilisé comme témoin d'expérience afin de vérifier la bonne multiplication des croisements et le second milieu représente le milieu test. Pour chaque croisement, une goutte de 5 $\mu$ L de la dilution 10 et de la dilution 100 sont déposées côte à côte sur les deux milieux. Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 7 jours en prenant une photo des deux boîtes aux jours 1, 2, 3, 4 et 7. Les photographies présentées dans la partie résultat sont prises après 4 jours.

## D. Production de lignées transgéniques

### 1. Semis et cultures des plantes

Les graines sont stérilisées avant semis. Pour cela, elles sont incubées 2h à -80°C pour tuer les éventuels œufs d'insectes puis 10 minutes dans une solution de stérilisation (javel 0,36%, Triton 0,01%, 1,5mL de solution pour un volume de graines de 10-20µL) à température ambiante sous agitation pour tuer les éventuels spores de champignon. Après sédimentation, les graines sont rincées 5 fois avec 1mL d'eau Milli-Q® autoclavée puis séchées sous hotte stérile pendant 16h. A ce stade, les graines peuvent être conservées ou plantées en terre (5/6 de terreau (Floradur® B Seed FLORAGARD®), 1/6 vermiculite fine (Puteaux Horticulture), 0,02% de produit fongicide (Prestop® WG LALLEMAND). Après semis, les cultures sont incubées à 4°C pendant 48h pour stratification. D'éventuels traitements curatifs au Polysect (Fertiligène) sont réalisés lors de présence de pucerons.

Les plants d'*A. thaliana* sont cultivés en jours longs (16h de lumière à 20°C/8h d'obscurité à 18°C) dans des chambres de culture contrôlées. Les différents paramètres contrôlés sont l'humidité (70%), l'intensité lumineuse (80µmol/m<sup>2</sup>/s) et le spectre lumineux (tubes fluorescents Osram 77).

### 2. Vecteurs et Lignées transgéniques réalisées

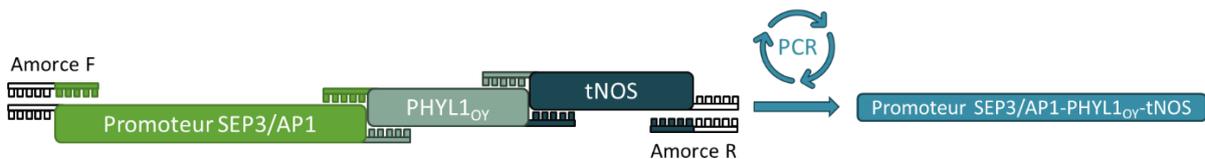
Pour produire les plantes transgéniques, nous avons choisi deux vecteurs permettant une sélection simple des transformants. Nous avons utilisé les vecteurs pFP100 et pFP101 (Bensmihen et al. 2004) qui contiennent la protéine fluorescente verte (Green Fluorescent Protein : GFP) comme marqueur de sélection. Ainsi, nous sélectionnons les plantes transformées en vérifiant la fluorescence des graines.

#### a. Lignée exprimant PHYL1<sub>OR</sub> sous le promoteur fort 35S

Cette lignée exprime PHYL1<sub>OR</sub> sous le promoteur de surexpression 35S. Le vecteur pFP101 (Annexe 4) contient déjà le promoteur 35S et le terminateur nopaline synthase (tNOS). La séquence de PHYL1<sub>OR</sub> est amplifiée (amorces 14, Annexe 3) du vecteur pGEX-4T-1\_PHYL1<sub>OR</sub> fourni par nos collaborateurs (Iwabuchi et al. 2019), purifiée et insérée dans le plasmide pFP101, digéré par BamHI-HF, par Gibson Assembly® comme décrit précédemment.

## b. Lignées exprimant PHYL1<sub>OY</sub> sous promoteurs de gènes MADS

Ces lignées expriment PHYL1<sub>OY</sub> soit sous le contrôle du promoteur de 4,1kb de *SEP3* soit sous le contrôle du promoteur de 3,2kb d'*AP1*. La construction des vecteurs s'est faite comme suit : les trois inserts synthétisés contiennent le promoteur d'intérêt amplifié (amorces 15 pour *SEP3* et 16 pour *AP1*, Annexe 3) des vecteurs publiés (Hugouvieux et al. 2018; Lai et al. 2021), la séquence de *PHYL1<sub>OY</sub>* amplifiée (amorces 17 pour *SEP3* et 18F et 17R pour *AP1*, Annexe 3) du vecteur pGEX-4T-1\_PHYL1<sub>OY</sub> envoyé par nos collaborateurs (Iwabuchi et al. 2019) et le tNOS amplifié (amorces 19, Annexe 3) du vecteur pMM127 (Annexe 5) (Figure 36). Ces trois fragments sont purifiés sur gel (Monarch® DNA Gel Extraction Kit) puis mélangés de façon équimolaire pour permettre d'amplifier par PCR (amorces 15F et 19R pour *SEP3* et 16F et 19R pour *AP1*, Annexe 3) un unique fragment promoteur-PHYL1<sub>OY</sub>-terminateur (Figure 36). Ce fragment est finalement inséré par Gibson Assembly® dans le plasmide pFP100 (Annexe 6), digéré par BamHI-HF comme décrit précédemment.



**Figure 36 : Schéma d'amplification des inserts multiples en fragment unique par PCR.** Les amorces utilisées pour lier les brins sont annotés et les brins complémentaires sont liés aux inserts respectifs.

Le Tableau 4 répertorie l'ensemble des constructions réalisées pour l'expression de plantes transgéniques.

Plantes transgéniques	Fond génétique	Nom du vecteur	Insert total	Sélection
<i>35S::PHYL1<sub>OY</sub></i>	WT	pFP101	<i>PHYL1<sub>OY</sub></i>	GFP
<i>AP1::PHYL1<sub>OY</sub></i>	WT	pFP100	<i>Promoteur AP1/PHYL1<sub>OY</sub>/tNOS</i>	GFP
<i>SEP3::PHYL1<sub>OY</sub></i>	WT	pFP100	<i>Promoteur SEP3/PHYL1<sub>OY</sub>/tNOS</i>	GFP
<i>sep3 SEP3::PHYL1<sub>OY</sub></i>	<i>sep3</i>	pFP100	<i>Promoteur SEP3/PHYL1<sub>OY</sub>/tNOS</i>	GFP
<i>sep1sep2 SEP3::PHYL1<sub>OY</sub></i>	<i>sep1sep2</i>	pFP100	<i>Promoteur SEP3/PHYL1<sub>OY</sub>/tNOS</i>	GFP
<i>sep1sep2sep3+/- SEP3::PHYL1<sub>OY</sub></i>	<i>sep1sep2sep3+/-</i>	pFP100	<i>Promoteur SEP3/PHYL1<sub>OY</sub>/tNOS</i>	GFP
<i>sep1sep2sep3 SEP3::PHYL1<sub>OY</sub></i>	<i>sep1sep2sep3</i>	pFP100	<i>Promoteur SEP3/PHYL1<sub>OY</sub>/tNOS</i>	GFP

**Tableau 4 : Lignées des plantes transgéniques décrites dans cette thèse.**

### 3. Transformation électrique des agrobactéries

1µL de plasmide est ajouté à 100µL d'*Agrobacterium tumefaciens* C58 compétentes. Ce mélange subit un choc électrique instantané à 2,5kV. 900µL de LB liquide (LB 20g/L) sont ajoutés aux bactéries et le mélange est incubé 3h à 28 °C. 100µL de ces agrobactéries sont ensuite étalés sur milieu LB/Agar (LB 20g/L et Agar 15g/L) auquel est ajouté de la spectinomycine (100µg/mL), de la rifampicine (25µg/mL) et de la gentamycine (50µg/mL). La résistance à la spectinomycine est apportée par le plasmide tandis que les résistances à la rifampicine et la gentamycine sont apportées par l'agrobactérie. Ces boîtes sont incubées pendant 3 jours à 28°C.

### 4. Transformation des plantes

La transformation des plantes se fait par la technique classique du trempage floral (« floral dip method », (Clough et Bent 1998)). Pour cela, les colonies isolées d'agrobactéries obtenues sont repiquées dans 10mL de milieu sélectif LB (LB 20g/L) liquide auquel sont ajoutés les antibiotiques précédents et incubées 7h à 28°C à 130rpm. 10mL de la préculture est ajouté à 500mL de LB liquide complétés des antibiotiques précédents. Cette culture est incubée pendant 16h à 28°C à 130rpm puis son absorbance à 600nm est mesurée. La culture est centrifugée pendant 20 minutes à 4500rpm à 4°C. Le culot est homogénéisé dans une solution de saccharose 5% et de Silwet 0,02% pour obtenir une absorbance finale de 0,8. Les fleurs des plantes sont ensuite trempées dans cette solution pendant 15 secondes.

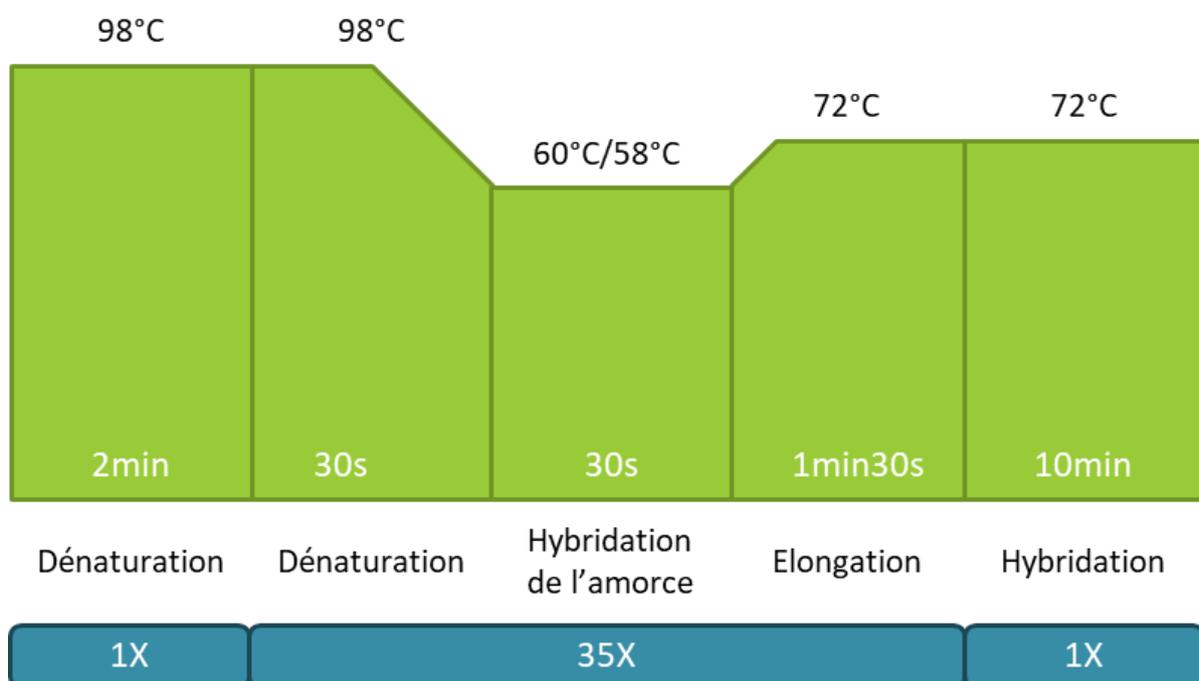
### 5. Génotypage des plantes

Les plantes issues des mutants *sep1sep2sep3+/-* transformées par la construction *SEP3::PHYL1<sub>OR</sub>* sont génotypées pour identifier les plantes *sep1sep2*, *sep1sep2sep3+/-* et *sep1sep2sep3*. L'ADN génomique de ces plantes est extrait. Pour cela, une feuille de chaque plante, au stade végétatif, est prélevée puis broyée à l'aide d'un pilon dans 500µL de tampon d'extraction Edwards (Tris 200mM pH7,5, NaCl 250mM, EDTA 25mM, 0,5% de SDS 20%, Edwards, Johnstone, et Thompson 1991). Lorsque la feuille est totalement broyée, le mélange est homogénéisé, centrifugé 5 minutes à 13000rpm à température ambiante (20°C) puis 400µL du surnageant sont récoltés. 400µL d'isopropanol sont ajoutés, homogénéisés, incubés pendant 2 minutes à température ambiante (20°C) et centrifugés 5 minutes à 13000rpm à température ambiante (20°C). Le surnageant est jeté et 500µL d'éthanol 70% sont ajoutés au

culot puis centrifugé 5 minutes à 13000rpm à température ambiante (20°C). Le surnageant est jeté et le culot est séché à température ambiante (20°C). Le culot contenant l'ADN génomique est resuspendu dans 40µL d'eau Milli-Q®. Cet ADN génomique est ensuite amplifié par PCR :

- 2µL d'ADN génomique
- 0,2µM de l'amorce Forward
- 0,2µM de l'amorce Reverse
- 0,2mM de dNTP
- 0,25µL de Taq DNA Polymerase (Euromedex)
- 2,5µL de tampon Taq DNA Polymerase 10X (Euromedex)
- de l'eau Milli-Q® en quantité suffisante pour (QSP) 25µL

Les amorces utilisées dans ces PCR sont les amorces 20 (Annexe 3) pour amplifier la version sauvage *SEP3* et les amorces 20F et 21R (Annexe 3) pour amplifier la version mutante *sep3*. Ce mélange PCR est ensuite incubé à différentes températures et temps détaillés dans la Figure 37.



**Figure 37 : Détails des températures, temps et nombre de cycles utilisés pour les réactions de PCR de génotypage de plantes.** Les températures d'hybridation 60°C et 58°C correspondent aux PCR pour la version sauvage *SEP3* et la version mutante *sep3* respectivement.

Ce produit PCR est ensuite migré sur gel d'agarose (TBE 1X, agarose 1%).

## 6. Analyse des phénotypes floraux

Les fleurs des différentes lignées sont observées sous la loupe binoculaire. Cette observation est réalisée sur cinq fleurs juste écloses, après les dix premières fleurs. Les photographies sont ensuite réalisées à l'aide d'un microscope numérique Keyens VHX-5000

## E. Production et purification de protéines recombinantes

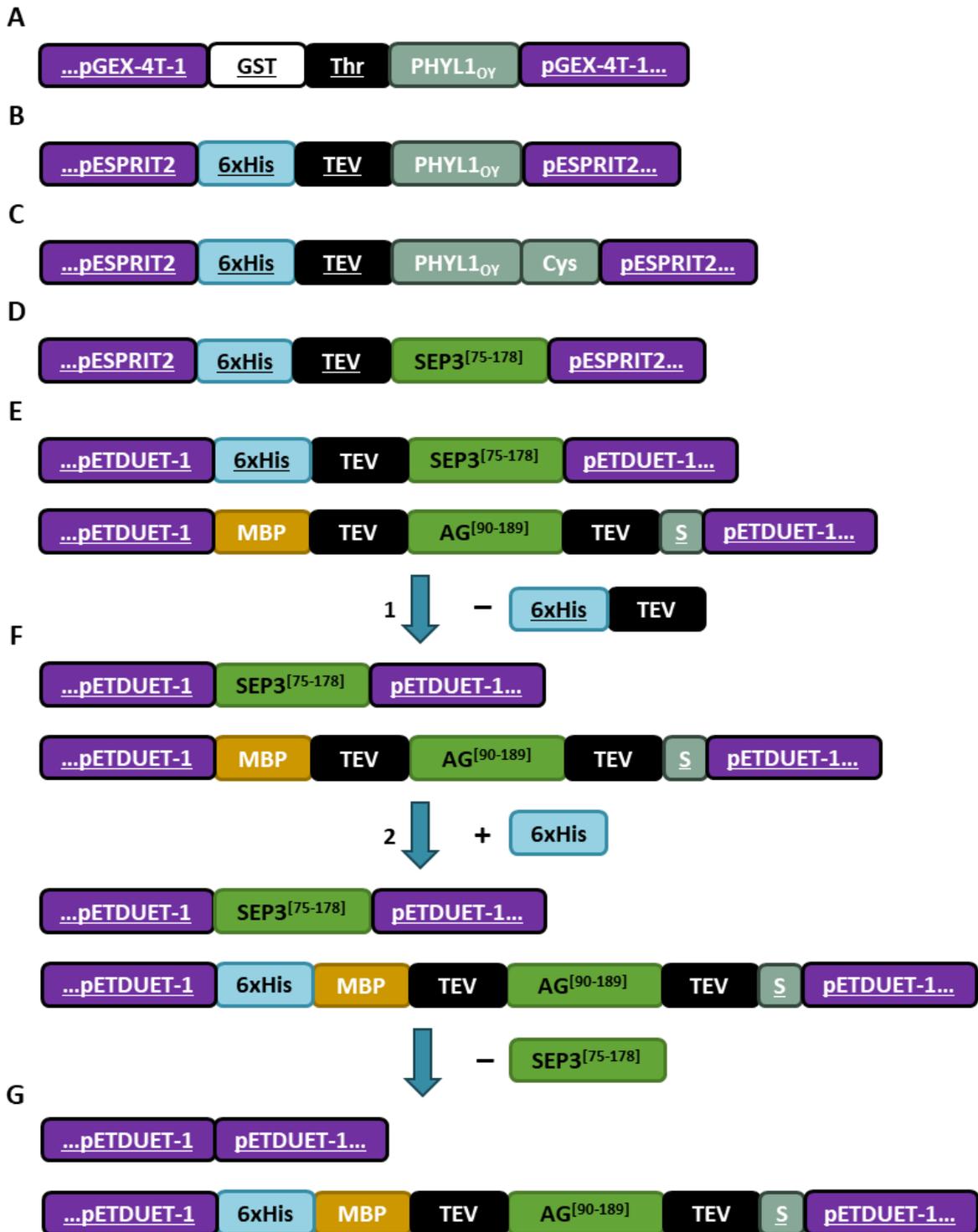
### 1. Constructions réalisées

Dans les différentes constructions réalisées, les protéines comportent un ou plusieurs tags. Ces tags sont tous largement utilisés dans le domaine de la biochimie car ils facilitent les purifications de protéines et sont facilement détectables avec des anticorps.

La construction pGEX-4T-1 GST-PHYL1<sub>0Y</sub> est fournie par notre collaborateur K. Maejima (Université de Tokyo) (Iwabuchi et al. 2019). Le vecteur pGEX-4T-1 (Annexe 7) contient le tag Glutathion S-Transférase (GST) (suivi d'un site de clivage spécifique (LVPRGS) de la protéase thrombine) en N terminal de la protéine PHYL1<sub>0Y</sub>. Cette construction permet la purification de protéines GST-PHYL1<sub>0Y</sub> et PHYL1<sub>0Y</sub> (après clivage du tag GST) (Figure 38.A). Deux constructions supplémentaires permettant la purification de PHYL1<sub>0Y</sub> sont réalisées. Pour la première construction, la séquence de *PHYL1<sub>0Y</sub>* est amplifiée (amorces 22, Annexe 3) et clonée dans le vecteur pESPRIT2 (Annexe 8, Hart et Tarendeau 2006; Guilligay et al. 2008), permettant la production de protéine taggée en N terminal par le tag 6xHis (succession de six histidines (tag 6xHis) suivie d'un site de clivage spécifique (ENLYFQ) à la protéase du virus de la gravure du tabac (TEV)). Pour cela, le vecteur est linéarisé par PCR (amorces 23, Annexe 3). Ces deux fragments sont ensuite purifiés puis liés par Gibson Assembly<sup>®</sup> comme décrit précédemment. Cette première construction est utilisée pour la purification de protéine PHYL1<sub>0Y</sub> (après clivage du tag 6xHis) pour la purification de complexes protéiques en chromatographie d'exclusion stérique, les études en SEC-MALS et les cristallisation de complexes protéiques (Figure 38.B). Une deuxième construction est réalisée en ajoutant sur la construction précédente un résidu cystéine en C-terminal de la protéine PHYL1<sub>0Y</sub> par mutagenèse dirigée (amorces 24, Annexe 3). Le vecteur pESPRIT2 ainsi obtenu permet la purification de protéine PHYL1<sub>0Y</sub>-Cys (après clivage du tag 6xHis) qui est utilisée, après marquage, pour l'anisotropie de fluorescence (Figure 38.C).

Le vecteur utilisé pour la production de SEP3<sup>[75-178]</sup> est pESPRIT2 (Hart et Tarendeau 2006; Guilligay et al. 2008). Cette construction était déjà disponible au laboratoire (Puranik et al. 2014) et contient un tag 6xHis, un site de clivage à la TEV puis la séquence de SEP3<sup>[75-178]</sup> (Figure 38.D).

Le vecteur utilisé pour la production de l'hétérocomplexe SEP3<sup>[75-178]</sup>/AG<sup>[90-189]</sup> (en co-expression) est pETDuet™-1 (Annexe 9, Novagen). Ce vecteur permet la co-expression de deux gènes et donc la production de deux protéines simultanément (sous induction par IPTG comme détaillé précédemment). Cette construction était déjà disponible au laboratoire et contient la protéine SEP3<sup>[75-178]</sup> taggée en N-terminal avec un tag 6xHis et la protéine AG<sup>[90-189]</sup> taggée en N-terminal avec un tag Maltose Binding Protein (MBP) et en C-terminal avec un tag S. Entre chaque tag cité précédemment et la protéine taggée se trouve un site de clivage spécifique (ENLYFQ) à la TEV (Figure 38.E). D'après des analyses préliminaires, le tag MBP d'AG<sup>[90-189]</sup> permet d'obtenir un meilleur rendement en améliorant la solubilité de la protéine. Une seconde construction est réalisée afin d'optimiser la purification d'hétérocomplexe (Figure 38.F). Dans un premier temps, le tag 6xHis ainsi que le site de clivage à la TEV de SEP3<sup>[75-178]</sup> sont retirés par PCR (amorces 25, Annexe 3). Ce produit PCR est digéré par l'enzyme DpnI afin de dégrader le plasmide modèle puis purifié et relié par Gibson Assembly® (Figure 38.F.1). Dans un second temps, un tag 6xHis est ajouté en N-terminal du tag MBP d'AG<sup>[90-189]</sup> par PCR (amorces 26, Annexe 3). Ce produit PCR est digéré par l'enzyme DpnI afin de dégrader le plasmide modèle puis purifié et relié par Gibson Assembly® (Figure 38.F.2). Pour purifier la protéine AG<sup>[90-189]</sup>, une construction est réalisée en retirant la séquence de SEP3<sup>[75-178]</sup> par PCR (amorces 27, Annexe 3). Ce produit PCR est digéré par l'enzyme DpnI afin de dégrader le plasmide modèle puis purifié et relié par Gibson Assembly® (Figure 38.G).



**Figure 38 : Schéma des constructions réalisées.** Les constructions réalisées sont **(A)** pGEX-4T-1\_GST-sitethrombine-PHYL1<sub>0Y</sub> (Iwabuchi et al. 2019), **(B)** pESPRIT2\_siteTEV-PHYL1<sub>0Y</sub>, **(C)** pESPRIT2\_siteTEV-PHYL1<sub>0Y</sub>-Cys, **(D)** pESPRIT2\_siteTEV-SEP3<sup>[75-178]</sup> (Puranik et al. 2014), **(E)** pETDuet-1\_6xHis-siteTEV-SEP3<sup>[75-178]</sup>/MBP-siteTEV-AG<sup>[90-189]</sup>-siteTEV-S, **(F)** pETDuet-1\_SEP3<sup>[75-178]</sup>/MBP-siteTEV-AG<sup>[90-189]</sup>-siteTEV-S puis pETDuet-1\_SEP3<sup>[75-178]</sup>/6xHis-MBP-siteTEV-AG<sup>[90-189]</sup>-siteTEV-S et **(G)** pETDuet-1\_6xHis-MBP-siteTEV-AG<sup>[90-189]</sup>-siteTEV-S. Les flèches, numéros et inserts précédés d'un – ou d'un + montrent les modifications successives permettant de passer de **(E)** à **(F)** et de **(F)** à **(G)**. Les parties soulignées indiquent les séquences déjà présentes dans les vecteurs vides.

## 2. Production de protéines recombinantes

### a. Culture de bactéries et induction des protéines recombinantes

Des bactéries *E. coli* de souche *Rosetta2™* sont transformées par choc thermique comme décrit précédemment pour *E. coli*. Les bactéries sont étalées sur boîtes de LB/Agar (LB 20g/L et Agar 15g/L) après transformation. Ces boîtes contiennent du chloramphénicol 34µg/ml (résistance présente dans les bactéries *Rosetta2™*) ainsi que de la kanamycine 50µg/ml pour les constructions dans pESPRIT2 ou de la carbénicilline 100µg/ml pour les constructions dans pETDuet™-1 et pGEX-4T-1. Les boîtes sont incubées 16h à 37°C. Une préculture est ensuite réalisée en repiquant une colonie dans 15mL de milieu liquide (LB 20g/L, complété par du chloramphénicol 34µg/ml et de la kanamycine 50µg/ml ou de la carbénicilline 100µg/ml selon la construction) sous agitation (130rpm) à 37°C. Après 16h d'incubation, 15mL de préculture sont ajoutés par litre de milieu liquide (LB 20g/L avec chloramphénicol et kanamycine ou carbénicilline). Cette culture est incubée dans une étuve à 37°C sous agitation à 130rpm jusqu'à obtention d'une absorbance suffisante ( $A_{600nm}=0.6$ ). De l'IPTG à une concentration finale de 1mM est ajouté afin d'induire la production de protéine. La culture est ensuite incubée à 20°C sous agitation à 130rpm pendant 16h puis est centrifugée à 5000rpm pendant 30 minutes à 4°C. Les culots peuvent être congelés à -80°C ou utilisés directement pour la purification.

### b. Lyse des bactéries par sonication aux ultrasons

Le culot ainsi obtenu est repris dans le tampon de lyse (50mL/L de culture bactérienne culottée, NaCl 300mM, TRIS 50mM pH7,5, TCEP 1mM) auquel est ajoutée une pastille d'anti-protéase (Complete EDTA Free®, Roche) et 0,1% (m/v) de lysozyme (Q-Bio Gene). Le mélange est soniqué pendant 15 minutes à une fréquence de 50% et une amplitude de 70%. L'extrait obtenu est centrifugé à 11600rpm pendant 30 minutes à 4°C et le surnageant contenant la protéine soluble est collecté. L'ensemble des tampons utilisés pour ces expériences est renseigné dans le Tableau 5.

Protéine purifiée	Tampon utilisé	Etape d'utilisation	Purification
GST-PHYL1 <sub>0Y</sub>	NaCl 300mM, TRIS 50mM, TCEP 1mM, anti-protéase, 0,1% lysozyme	Sonication	Glutathion Sépharose
	NaCl 300mM, TRIS 50mM, TCEP 1mM	Lyse	
	NaCl 300mM, TRIS 50mM, TCEP 1mM	Lavage	
	NaCl 300mM, TRIS 50mM, glutathion réduit 20mM, TCEP 1mM	Elution	
	NaCl 300mM, TRIS 50mM, TCEP 1mM	Dialyse	
	NaCl 300mM, TRIS 50mM, TCEP 1mM	SEC	
PHYL1 <sub>0Y</sub>	NaCl 300mM, TRIS 50mM, TCEP 1mM, anti-protéase, 0,1% lysozyme	Sonication	Glutathion Sépharose
	NaCl 300mM, TRIS 50mM, TCEP 1mM	Lyse	
	NaCl 300mM, TRIS 50mM, TCEP 1mM	Lavage	
	NaCl 300mM, TRIS 50mM, TCEP 1mM, thrombine	Clivage	
	NaCl 300mM, TRIS 50mM, TCEP 1mM	SEC	
PHYL1 <sub>0Y</sub> SEP3 <sup>[75-178]</sup> SEP3 <sup>[75-178]</sup> /AG <sup>[90-189]</sup> AG <sup>[90-189]</sup> PHYL1 <sub>0Y</sub> -Cys	NaCl 300mM, TRIS 50mM, TCEP 1mM, anti-protéase, 0,1% lysozyme	Sonication	Nickel Sépharose
	NaCl 300mM, TRIS 50mM, TCEP 1mM	Lyse	
	NaCl 300mM, TRIS 50mM, imidazole 10mM, TCEP 1mM	Lavage	
	NaCl 300mM, TRIS 50mM, imidazole 250mM, TCEP 1mM	Elution	
	NaCl 300mM, TRIS 50mM, TCEP 1mM, 6xHis-TEV	Dialyse	
	NaCl 300mM, TRIS 50mM, TCEP 1mM	SEC	
SEP3 <sup>[75-178]</sup> /AG <sup>[90-189]</sup>	NaCl 300mM, TRIS 50mM, TCEP 1mM, anti-protéase, 0,1% lysozyme	Sonication	Dextrine Sépharose
	NaCl 300mM, TRIS 50mM, TCEP 1mM	Lyse	
	NaCl 300mM, TRIS 50mM, TCEP 1mM	Lavage	
	NaCl 300mM, TRIS 50mM, maltose 20mM, TCEP 1mM	Elution	
	NaCl 300mM, TRIS 50mM, TCEP 1mM, 6xHis-TEV	Dialyse	
	NaCl 300mM, TRIS 50mM, TCEP 1mM	SEC	

**Tableau 5 : Tampons utilisés lors des sonications et purifications décrites dans ce manuscrit.** Les tampons de sonication, lyse et chromatographie d'exclusion stérique (SEC) sont les mêmes pour toutes les purifications.

### 3. Purification de protéines par colonne d'affinité

Toutes les purifications sont réalisées par gravité à température ambiante (20°C). Le Tableau 6 récapitule l'ensemble des protéines purifiées dans cette thèse.

#### a. Purification des protéines GST-PHYL1<sub>0Y</sub> et PHYL1<sub>0Y</sub> sur résine de glutathion Sépharose

La protéine GST-sitethrombine-PHYL1<sub>0Y</sub> (que nous appellerons GST-PHYL1<sub>0Y</sub> après) est exprimée grâce à la construction dans pGEX-4T-1 (Iwabuchi et al. 2019) (Figure 38.A). Pour cette purification, 1mL de résine de glutathion Sépharose (GE Healthcare) est utilisée afin de lier le tag GST. La résine est équilibrée avec 10 volumes de colonne (soit 10mL) de tampon de purification (300mM NaCl, 50mM TRIS pH7,5, 1mM TCEP). Le surnageant contenant la

protéine soluble est passé sur la colonne afin de lier le tag GST de la protéine à la résine. La colonne est lavée par 30 volumes de colonne (CV) de tampon de purification (NaCl 300mM, TRIS 50mM pH7,5, TCEP 1mM) afin de rompre de nombreuses interactions non spécifiques et d'éliminer les protéines contaminantes pouvant s'être liées à la colonne de façon non spécifique. Enfin 15 CV de tampon d'élution (NaCl 300mM, TRIS 50mM pH7,5, glutathion réduit 20mM, TCEP 1mM) sont passés sur la colonne pour éluer la protéine GST-PHYL1<sub>0Y</sub> ; le glutathion réduit étant mobile et ayant une affinité supérieure à la résine de glutathion, la GST se décroche entraînant avec elle la protéine PHYL1<sub>0Y</sub>. Des fractions de 1mL d'élution sont collectées. Les fractions récoltées durant la purification sont analysées sur gel SDS-PAGE 15% (7,5µL de chaque fraction) afin de vérifier la présence de la protéine dans l'élution et son degré de pureté.

Pour obtenir de la protéine GST-PHYL1<sub>0Y</sub>, les fractions d'élution contenant la protéine sont dialysées pendant 16h à 4°C dans un tampon de dialyse (NaCl 300mM, TRIS 50mM pH7,5, TCEP 1mM). La dialyse permet en une seule étape d'éliminer le glutathion réduit et les petits contaminants. L'élution dialysée est concentrée jusqu'à 5-10mg/mL (mesurée au NanoDrop™ Thermo Scientific) avant d'être purifiée en chromatographie d'exclusion stérique (SEC).

Pour obtenir de la protéine PHYL1<sub>0Y</sub>, les fractions d'élution sont dialysées dans le tampon de dialyse pour produire GST- PHYL1<sub>0Y</sub> (NaCl 300mM, TRIS 50mM pH7,5, TCEP 1mM) auquel est ajoutée de la thrombine (1:1, unité de thrombine:mg de protéine à clivée). De même, la dialyse permet en une seule étape d'éliminer le glutathion réduit et les petits contaminants. L'élution dialysée est passée sur 1mL de résine de glutathion Sépharose (préalablement préparée et équilibrée dans le tampon de dialyse sans thrombine) afin d'éliminer le tag GST puis 1mL de résine de benzamidine Sépharose (GE Healthcare), préalablement préparée et équilibrée dans le tampon de dialyse, afin d'éliminer la thrombine. Cette méthode a montré des problèmes de contamination par le tag GST même après passage sur résine de glutathion et purification en SEC. Une nouvelle purification est réalisée et suit les mêmes étapes que la purification précédente jusqu'à l'élution. Ici l'élution est remplacée par une étape de clivage dans laquelle la résine liée au tag GST de PHYL1<sub>0Y</sub> est incubée à 4°C pendant 16h avec du tampon de clivage (NaCl 300mM, TRIS 50mM pH7,5, TCEP 1mM, thrombine 1:1, unité de thrombine:mg de protéine à clivée). Pendant cette incubation, la thrombine clive le site spécifique présent entre le tag GST et PHYL1<sub>0Y</sub> ce qui libère PHYL1<sub>0Y</sub> de son tag. Après 16h, la

fraction éluée contient PHYL1<sub>0Y</sub> alors que le tag GST reste lié à la résine de glutathion Sépharose. 7,5µL de cette élution sont analysés sur gel SDS-PAGE 15% afin de vérifier la présence de la protéine dans l'élution, son degré de pureté et l'absence de tag GST. Cette fraction est ensuite concentrée jusqu'à 5-10mg/mL (mesurée au NanoDrop™ Thermo Scientific) avant d'être purifiée en SEC.

#### b. Purification des protéines PHYL1<sub>0Y</sub>, PHYL1<sub>0Y</sub>-Cys et SEP3<sup>[75-178]</sup> et AG<sup>[90-189]</sup> du complexe SEP3<sup>[75-178]</sup>/AG<sup>[90-189]</sup> sur résine de nickel Sépharose

Les protéines 6xHis-PHYL1<sub>0Y</sub>, 6xHis-PHYL1<sub>0Y</sub>-Cys, 6xHis-SEP3<sup>[75-178]</sup> et 6xHis-MBP-AG<sup>[90-189]</sup>-S ainsi que le complexe SEP3<sup>[75-178]</sup>/6xHis-MBP-AG<sup>[90-189]</sup>-S sont exprimés grâce aux constructions pESPRIT2\_6xHis-PHYL1<sub>0Y</sub> (Figure 38.B), pESPRIT2\_6xHis-PHYL1<sub>0Y</sub>-Cys (Figure 38.C) pESPRIT2\_6xHis-SEP3<sup>[75-178]</sup> (Puranik et al. 2014) (Figure 38.D), pETDuet-1\_6xHis-MBP-AG<sup>[90-189]</sup>-S (Figure 38.G) et pETDuet-1\_SEP3<sup>[75-178]</sup>/6xHis-MBP-AG<sup>[90-189]</sup>-S (Figure 38.F.2) respectivement. L'hétérocomplexe SEP3<sup>[75-178]</sup>/6xHis-MBP-AG<sup>[90-189]</sup>-S est purifié en liant le tag 6xHis(-MBP) d'AG<sup>[90-189]</sup> (qui interagit avec SEP3<sup>[75-178]</sup> et le retient) à la résine de nickel. Toutes ces protéines (et hétérocomplexe) sont purifiées en suivant le protocole suivant.

Le tag 6xHis permet la liaison entre la protéine d'intérêt et la résine de nickel Sépharose (Ni-NTA résine, Thermo Scientific). 1mL de résine est ajoutée dans la colonne puis équilibrée à l'aide de 10 CV de tampon de lyse (NaCl 300mM, TRIS 50mM pH7,5, TCEP 1mM). Le surnageant contenant la protéine d'intérêt soluble est ensuite passé sur la colonne afin de lier le tag 6xHis de la protéine à la résine puis la colonne est lavée par 30 CV de tampon de lavage (NaCl 300mM, TRIS 50mM pH7,5, imidazole 10mM TCEP 1mM). Enfin 15 CV de tampon d'élution (NaCl 300mM, TRIS 50mM pH7,5, imidazole 250mM TCEP 1mM) sont passés sur la colonne pour éluer la protéine SEP3<sup>[75-178]</sup>; la forte concentration en imidazole de cette solution déstabilise la liaison entre la résine et le tag 6xHis de la protéine. Des fractions de 1mL d'élution sont collectées. Les fractions récoltées durant la purification sont analysées sur gel SDS-PAGE 15% (7,5µL de chaque fraction) afin de vérifier la présence de la protéine dans l'élution et son degré de pureté. Les fractions d'élution contenant la protéine sont dialysées pendant 16h à 4°C dans un tampon de dialyse (NaCl 300mM, TRIS 50mM pH7,5, TCEP 1mM) auquel est ajoutée de la protéase TEV (1:100, mg de TEV:mg de protéine à clivée) portant un tag 6xHis non clivable (6xHis-TEV). Cette dialyse permet en une seule étape d'éliminer l'imidazole et les petits contaminants et de couper le tag 6xHis de la protéine. L'élution

dialysée est passée sur 1mL de résine de nickel Sépharose (préalablement préparée et équilibrée dans le tampon de dialyse sans TEV) afin d'éliminer la protéase 6xHis-TEV (liée par son tag à la colonne) et les tag 6xHis clivés de PHYL1<sub>0Y</sub>, PHYL1<sub>0Y</sub>-Cys et SEP3<sup>[75-178]</sup> et le tag 6xHis-MBP clivé d'AG<sup>[90-189]</sup>. 7,5µL de la fraction collectée sont analysées sur gel SDS-PAGE 15% afin de vérifier l'efficacité du clivage et l'absence de protéase. La fraction est concentrée jusqu'à 5-10mg/mL (mesurée au NanoDrop™ Thermo Scientific) avant d'être purifiée en SEC.

### c. Purification du complexe SEP3<sup>[75-178]</sup>/AG<sup>[90-189]</sup> sur résine de dextrine Sépharose

Le complexe 6xHis-siteTEV-SEP3<sup>[75-178]</sup>/MBP-siteTEV-AG<sup>[90-189]</sup>-siteTEV-S est exprimé grâce à la construction pETDuet-1\_6xHis-siteTEV-SEP3<sup>[75-178]</sup>/MBP-siteTEV-AG<sup>[90-189]</sup>-siteTEV-S (Figure 38.E). Pour cette purification, 1 mL de résine de dextrine Sépharose (GE Healthcare) est utilisée afin de lier le tag MBP d'AG<sup>[90-189]</sup> (qui interagit avec SEP3<sup>[75-178]</sup> et le retient). La résine est équilibrée avec 10 CV de tampon de purification (NaCl 300mM, TRIS 50mM pH7,5, TCEP 1mM). Le surnageant contenant l'hétérocomplexe soluble est passé sur la colonne afin de lier le tag MBP d'AG<sup>[90-189]</sup> à la résine puis le lavage de 30 CV se fait avec le tampon de purification. Enfin 15 CV de tampon d'élution (NaCl 300mM, TRIS 50mM pH7,5, maltose 20mM, TCEP 1mM) sont passés dans la colonne pour éluer la protéine GST-PHYL1<sub>0Y</sub> ; le maltose ayant une affinité supérieure à la résine de dextrine, la MBP se décroche entraînant avec elle l'hétérocomplexe. Des fractions de 1mL d'élution sont collectées. Les fractions récoltées durant la purification sont analysées sur gel SDS-PAGE 15% (7,5µL de chaque fraction) afin de vérifier la présence de l'hétérocomplexe dans l'élution et son degré de pureté. Les fractions d'élution contenant l'hétérocomplexe sont dialysées pendant 16h à 4°C dans un tampon de dialyse (NaCl 300mM, TRIS 50mM pH7,5, TCEP 1mM) auquel est ajoutée de la protéase TEV (1:100, mg de TEV:mg de protéine à clivée). La dialyse permet en une seule étape d'éliminer le maltose et les petits contaminants. L'élution dialysée est passée sur 1mL de résine de dextrine (préalablement préparée et équilibrée dans le tampon de dialyse sans TEV) afin d'éliminer le tag MBP clivé d'AG<sup>[90-189]</sup>. 7,5µL de la fraction collectée sont analysées sur gel SDS-PAGE 15% afin de vérifier l'efficacité du clivage. La fraction est concentrée jusqu'à 5-10mg/mL (mesurée au NanoDrop™ Thermo Scientific) avant d'être purifiée par SEC.

Protéines recombinantes	Nom du vecteur	Purification	Tag	Protéase utilisée	Expériences réalisées
GST-PHYL1 <sub>OY</sub>	pGEX-4T-1	Glutathion-Sépharose	GST en N-terminal	Aucune	EMSA
PHYL1 <sub>OY</sub>				Thrombine	Caractérisations biochimique et structurale de complexes
PHYL1 <sub>OY</sub>	pESPRIT2	Nickel-Sépharose	6xHis en N-terminal	TEV	
SEP3 <sup>[75-178]</sup>	pESPRIT2		6xHis en N-terminal		
SEP3 <sup>[75-178]</sup> /AG <sup>[90-189]</sup>	pETDuet™-1		6xHis-MBP en N-terminal et S en C-terminal pour AG <sup>[90-189]</sup> Aucun pour SEP3 <sup>[75-178]</sup>		
AG <sup>[90-189]</sup>	pETDuet™-1		6xHis-MBP en N-terminal et S en C-terminal		
PHYL1 <sub>OY</sub> -Cys	pESPRIT2		6xHis en N-terminal		
SEP3 <sup>[75-178]</sup> /AG <sup>[90-189]</sup>	pETDuet™-1		Dextrine-Sépharose		MBP en N-terminal et S en C-terminal pour AG <sup>[90-189]</sup> 6xHis en N-terminal pour SEP3 <sup>[75-178]</sup>

**Tableau 6 : Protéines recombinantes produites et purifiées dans cette thèse.**

#### 4. Purification de protéines et complexes par chromatographie d'exclusion stérique ou SEC

Toutes les protéines (ou hétérocomplexe) sont purifiées de la même manière en SEC à température ambiante (20°C). Une fois débarrassées de leurs tags et concentrées, les protéines obtenues sont purifiées en SEC (Biorad) afin d'éliminer les agrégats, les tags et éventuels contaminants restants et ainsi d'assurer la pureté des protéines d'intérêt. Les protéines à 5-10mg/mL sont injectées dans le tampon de SEC (NaCl 300mM, TRIS 50mM pH7,5, TCEP 1mM) filtré dans une maille de 0,2µM. En traversant la colonne (Superdex® 200 Increase 10/300 GL, GE Healthcare) à un débit de 0,5mL/min, les différents composés présents dans l'injection sont séparés par leur rayon hydrodynamique : plus ils sont volumineux, plus ils sortent tôt. Les fractions de 1mL sont récoltées et 7,5µL de chacune est chargée sur gel SDS-PAGE 15% pour identifier le pic correspondant aux protéines d'intérêt et vérifier leur pureté. Les fractions contenant uniquement les protéines d'intérêt sont concentrées jusqu'à 5-10mg/mL et conservées à 4°C ou -80°C en fonction de l'utilisation qui en sera faite.

## F. Détermination de la stœchiométrie des complexes SEP3<sup>[75-178]</sup>/AG<sup>[90-189]</sup>/PHYL1<sub>OY</sub> et SEP3<sup>[75-178]</sup>/PHYL1<sub>OY</sub> par SEC-MALS

### 1. Formation des complexes SEP3<sup>[75-178]</sup>/AG<sup>[90-189]</sup>/PHYL1<sub>OY</sub> et SEP3<sup>[75-178]</sup>/PHYL1<sub>OY</sub>

Différents tests de formation du complexe SEP3<sup>[75-178]</sup>/PHYL1<sub>OY</sub> sont réalisés en mélangeant les protéines SEP3<sup>[75-178]</sup> et PHYL1<sub>OY</sub> selon différents ratios (4/1, 2/1, 1/1, 1/2 et 1/4). Ces différents mélanges sont purifiés en SEC comme décrit ci-dessus. Comme précédemment, les fractions correspondant aux pics du chromatogramme sont analysées en gels SDS-PAGE 15%. Les fractions, issues du mélange 2/1, suggèrent que la stœchiométrie du complexe est de 2/1. Les fractions contenant le complexe sont concentrées et conservées à -80°C pour une utilisation ultérieure ou à 4°C pour une utilisation immédiate. De la même manière, le complexe SEP3<sup>[75-178]</sup>/AG<sup>[90-189]</sup>/PHYL1<sub>OY</sub> est formé en suivant la stœchiométrie 1/1/1 (deux MADS pour un PHYL1<sub>OY</sub>) puis purifié en SEC. Les fractions sont analysées en gels SDS-PAGE 15% et celles contenant le complexe sont concentrées et conservées à -80°C pour une utilisation ultérieure ou à 4°C pour une utilisation immédiate.

### 2. Détermination de la stœchiométrie par chromatographie d'exclusion stérique couplée avec la mesure de la diffusion de la lumière sous multiples angles : SEC-MALS

Le SEC-MALS permet la séparation de molécules par leur taille (par la SEC) puis la détermination précise de la masse molaire des espèces présentes en solution dans chaque pic du chromatographe (par le MALS) (Some et al. 2019). Les deux expériences de SEC-MALS sont réalisées par la plateforme biophysique AUC-PAOL de l'IBS à Grenoble (<https://www.isbg.fr/caracterisations-biophysiques/paol/>). Les protéines sont injectées dans une colonne Superdex<sup>®</sup> 75 10/300 GL, équilibrée à 4°C dans le tampon de SEC utilisé lors des purifications (NaCl 300mM, TRIS 50mM pH7,5, TCEP 1mM) à un débit de 0,5mL/min puis analysés par MALS. Pour l'expérience sur le complexe SEP3<sup>[75-178]</sup>/AG<sup>[90-189]</sup>/PHYL1<sub>OY</sub>, trois injections de 40µL sont réalisées : les protéines SEP3<sup>[75-178]</sup>/AG<sup>[90-189]</sup> (5,9mg/mL) et PHYL1<sub>OY</sub> (5,8mg/mL) et le complexe SEP3<sup>[75-178]</sup>/AG<sup>[90-189]</sup>/PHYL1<sub>OY</sub> (6mg/mL, formé en suivant la stœchiométrie 1/1/1,1). Dans cette expérience un léger excès de PHYL1<sub>OY</sub> est ajouté afin de repérer l'apparition d'un pic au volume d'élution de PHYL1<sub>OY</sub> et de valider la stœchiométrie

supposée du complexe. Pour l'expérience en SEC-MALS du complexe SEP3<sup>[75-178]</sup>/PHYL1<sub>0Y</sub>, trois injections de 20µL sont réalisées : les protéines SEP3<sup>[75-178]</sup> (10mg/mL) et PHYL1<sub>0Y</sub> (4mg/mL) et le complexe SEP3<sup>[75-178]</sup>/PHYL1<sub>0Y</sub> (9mg/mL, formé en suivant la stœchiométrie 2/1).

## G. Détermination des constantes d'affinité par anisotropie de fluorescence : FA

L'hétérocomplexe SEP3<sup>[75-178]</sup>/AG<sup>[90-189]</sup> et les protéines SEP3<sup>[75-178]</sup> et PHYL1<sub>0Y</sub>-Cys sont purifiés comme décrit précédemment. PHYL1<sub>0Y</sub>-Cys est liée à la fluorescéine (Fluorescein-5-Maleimide, Thermo Scientific) par une liaison thioester entre les groupements thiols du résidu cystéine et le composé chimique maleimide (acide maléique et imide) lié à la fluorescéine. Pour réaliser ce marquage, la fluorescéine est homogénéisée dans du DMSO et ajoutée en excès (calculé pour avoir cinq fois plus de moles de fluorescéine que de protéine) à de la protéine PHYL1<sub>0Y</sub>-Cys à 10mg/mL dans le tampon utilisé pour la purification en SEC (NaCl 300mM, TRIS 50mM pH7,5, TCEP 1mM). Ce mélange est incubé 3h à température ambiante (20°C) à l'obscurité puis le complexe PHYL1<sub>0Y</sub>-Cys-fluorescéine est purifié par passage sur une colonne de dessalage (PD MiniTrap G-10, Cytiva). Les différentes fractions éluées sont analysées sur gel SDS-PAGE 15% et leur absorbance est mesurée au Nanodrop puis les fractions contenant la protéine marquée sont conservées. La fluorescence du complexe PHYL1<sub>0Y</sub>-Cys-fluorescéine à 50nM dans le tampon précédent (NaCl 300mM, TRIS 50mM pH7,5, TCEP 1mM) est mesurée à 510nm après émission d'une lumière monochromatique d'excitation à 470nm à l'aide d'un scanneur TECAN infinite M1000 PRO. Les complexes SEP3<sup>[75-178]</sup>/AG<sup>[90-189]</sup> et SEP3<sup>[75-178]</sup> sont ajoutés au complexe PHYL1<sub>0Y</sub>-Cys-fluorescéine à des concentrations croissantes (50nM, 75nM, 100nM, 125nM, 150nM, 175nM, 200nM, 400nM, 800nM, 1600nM, 2500nM et 3200nM) et la fluorescence est mesurée. La FA, notée A, est calculée d'après l'équation :

$$A = \frac{I_v - I_h}{I_v + 2I_h}$$

Dans cette équation,  $I_v$  et  $I_h$  sont les composants parallèle et perpendiculaire de la fluorescence polarisée émise. Les changements d'anisotropie suivent la fonction linéaire :

$$A = A_f + (A_b - A_f) \frac{[P_b]}{[P_t]}$$

Dans cette équation,  $A_f$  est l'anisotropie de PHYL1<sub>0Y</sub>-Cys-fluorescéine libre,  $A_b$  est l'anisotropie du complexe PHYL1<sub>0Y</sub>-Cys-fluorescéine/MADS,  $[P_b]$  est la concentration de PHYL1<sub>0Y</sub>-Cys-fluorescéine liée et  $[P_t]$  est la concentration totale de PHYL1<sub>0Y</sub>-Cys-fluorescéine. L'anisotropie dépend de la concentration de MADS et du  $K_D$  du complexe comme décrit par l'équation :

$$A = A_f + (A_b - A_f) \frac{\alpha - (\alpha^2 - 4 \cdot [M_t] \cdot [P_t])^{1/2}}{2 \cdot [P_t]}$$

Dans cette équation,  $\alpha = [M_t] + [P_t] + K_D$  et  $[M_t]$  est la concentration de MADS. L'utilisation des données d'anisotropie et de l'équation permet l'obtention d'un  $K_D$  pour chaque complexe.

Le marquage à la fluorescéine du résidu cystéine de PHYL1<sub>0Y</sub> est réalisé par Dr Chloé Zubieta, directrice de recherche et cheffe de notre équipe et j'ai réalisé les expériences d'anisotropie de fluorescence avec l'aide de Dr Sarah Le Hir, chercheuse permanente dans notre équipe.

## H. Analyse de la liaison à l'ADN par gel retard (EMSA)

### 1. Choix des vecteurs

Les vecteurs utilisés sont les plasmides pSP64 PolyA (Promega, Annexe 10) et pTNT PolyA (Promega, Annexe 11) qui permettent la production de protéine en utilisant le système de transcription et traduction *in vitro* (TnT® Promega SP6 High Yield Expression System, K. Q. Zhao et al. 2007; L. Zhao et al. 2010). A la suite du site multiple de clonage (MCS) où la séquence d'intérêt est insérée, se trouve une succession de 30 adénines. Cette séquence appelée queue polyA limite la dégradation de l'ARN messager (ARNm) issu de la transcription de l'ADN et permet un meilleur rendement de production de protéine *in fine*. Ainsi, ce système permet de produire des protéines très rapidement et efficacement sans en connaître toutefois la concentration finale.

### 2. Constructions réalisées et utilisées

Le Tableau 7 répertorie l'ensemble des constructions réalisées pour ces expérimentations. La plupart des constructions étaient disponibles à mon arrivée au laboratoire (Silva et al. 2016; Hugouvieux et al. 2018) sauf les constructions pSP64\_SEP3<sup>L154A+L164A</sup> et pSP64\_SEP3<sup>L157A+L171A</sup>

que j'ai réalisées. Pour cela, les séquences de SEP3 contenant les doubles mutations des vecteurs de Y2H sont amplifiées (amorces 28, Annexe 3), le plasmide pSP64 est linéarisé par digestion par l'enzyme BamHI-HF et les fragments sont purifiés et liés par Gibson Assembly® comme décrit précédemment.

Nom du vecteur	Insert total
pSP64	SEP3
pSP64	SEP3 <sup>L164A</sup>
pSP64	SEP3 <sup>L154A+L164A</sup>
pSP64	SEP3 <sup>L157A+L171A</sup>
pSP64	SEP3 <sup>Δ161-174</sup>
pSP64	SEP3 <sup>M150A+L154A+L164A</sup>
pSP64	SEP3 <sup>Δ161-174+M150A+L154A+L157A</sup>
pSP64	AG
pSP64	AG <sup>Δ159-172</sup>
pSP64	PHYL1 <sub>0Y</sub>
pTNT	SEP3 <sup>[1-90]</sup> -3xFLAG
pTNT	AG <sup>[1-102]</sup> -5xMyc

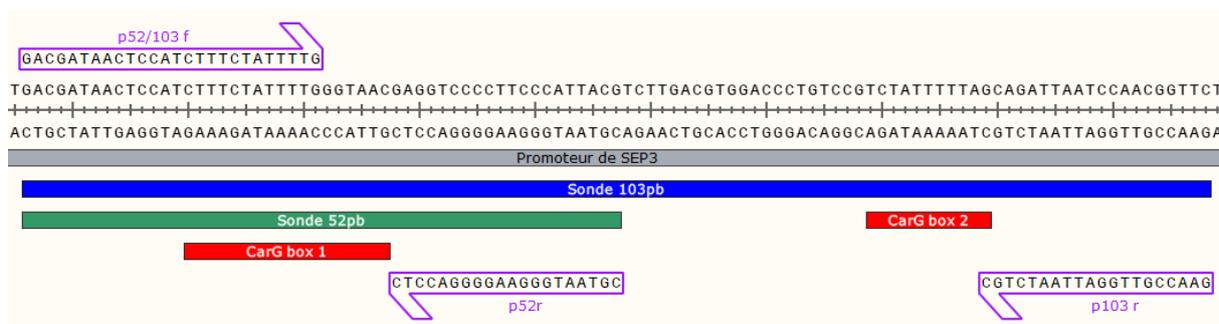
**Tableau 7 : Constructions réalisées et utilisées en EMSA dans cette thèse.**

### 3. Production des protéines MADS par transcription et traduction *in vitro*

Les protéines MADS sont produites par TnT®. Pour obtenir des intensités de bandes comparables entre les hétérocomplexes et les homocomplexes de MADS, les quantités de plasmides sont ajustées dans le mélange TnT®. Les homocomplexes de protéines MADS sont produits avec 6µL de produit TnT® (Promega SP6 High Yield Expression System), 2µg de plasmide et de l'eau Milli-Q® en QSP 10µL. Les hétérocomplexes de protéines MADS sont produits avec 6µL de produit TnT® (Promega SP6 High Yield Expression System), 0,5µg de chaque plasmide et de l'eau Milli-Q® en QSP 10µL. Ces mélanges sont réalisés à 4°C puis incubés 2h à 25°C.

#### 4. Liaison des protéines à la sonde ADN

Les protéines MADS produites en TnT<sup>®</sup> sont incubées avec une sonde d'ADN marqué. Deux sondes amplifiées à partir du promoteur de *SEP3* sont utilisées dans cette thèse : une sonde marquée Cys5 en 5' et 3' de 52 paires de bases (pb) contenant une CARG box (amplifiée par les amorces 29, Annexe 3) ainsi qu'une sonde marquée Cys5 en 5' et 3' de 103pb contenant deux CARG box (amplifiée par les amorces 29F et 30R, Annexe 3) (Figure 39).



**Figure 39 : Amorces utilisées pour amplifier les sondes ADN d'EMSA.**

Les différentes protéines MADS sont ajoutées à un tampon contenant 10nM de la sonde d'intérêt, 7mM d'HEPES pH7, 0,1mM de BSA, 1mM d'EDTA, 1mM de DTT, 2,5% de CHAPS, 6% de glycérol, 0,06mg/ml d'ADN compétiteur et 1,3mM spermidine (Smaczniak, Immink, Muiño, et al. 2012; Silva et al. 2016). Les protéines sont ajoutées selon différentes quantités : 4μL pour les homocomplexes de MADS formés par TnT<sup>®</sup>, 0,5μL pour les hétérocomplexes de MADS formés par TnT<sup>®</sup> et 1μL pour les protéines GST-PHYL1<sub>0Y</sub> et GST purifiées comme décrit précédemment. Les protéines GST-PHYL1<sub>0Y</sub> et GST sont ajoutées à différentes concentrations selon les expériences réalisées (voir Figure 65, Figure 66, Figure 67, Figure 68 et Figure 74). Le mélange est complété avec de l'eau en QSP 15μL et incubé 1h à 4°C à l'obscurité.

#### 5. Migration et numérisation du gel retard

Deux gels d'acrylamide non dénaturants à 5 % migrent d'abord à vide pendant 1h30 à 30V dans un tampon de TBE1X. 7μL du milieu réactionnel sont ensuite déposés sur chaque gel. Les gels migrent dans du TBE1X 5 minutes à 100V puis 1h15 et 1h30 à 75V pour les sondes 52pb et 103pb respectivement. La migration à vide des gels et lorsqu'ils contiennent le mélange réactionnel est réalisée à 4°C et à l'obscurité. Chaque gel est ensuite exposé à une longueur d'onde de 635nm et numérisé à l'aide d'un scanner Amersham ImageQuant 800.

## I. Cristallisation de SEP3<sup>[75-178]</sup>/AG<sup>[90-189]</sup> et SEP3<sup>[75-178]</sup>/PHYL1<sub>0Y</sub> par la méthode de la goutte suspendue

### 1. Essais de cristallisation par une plateforme automatisée et choix des conditions prometteuses

Les complexes SEP3<sup>[75-178]</sup>/PHYL1<sub>0Y</sub> et SEP3<sup>[75-178]</sup>/AG<sup>[90-189]</sup>/PHYL1<sub>0Y</sub> sont formés au ratio 2/1 et 1/1/1 respectivement et le complexe SEP3<sup>[75-178]</sup>/AG<sup>[90-189]</sup> purifié sont purifiés par SEC comme décrit précédemment. Des essais préliminaires de cristallisation dans de 576 tampons différents (kits PEGs-1\_qiagen, Classics-Suite\_qiagen, PACT\_MD, JCSG\_MD, Salt-Grid\_hampton et Wizard\_I+II\_rizaku) avec trois concentrations de précipitant (volume de protéines/volume de tampon : 1/3, 1/1 et 3/1) sont réalisés par la plateforme de cristallisation à haut débit CRIMS de l'EMBL et l'IBS à Grenoble.

Pour le complexe SEP3<sup>[75-178]</sup>/AG<sup>[90-189]</sup>/PHYL1<sub>0Y</sub> (5mg/mL), aucune condition n'a permis l'obtention de cristaux.

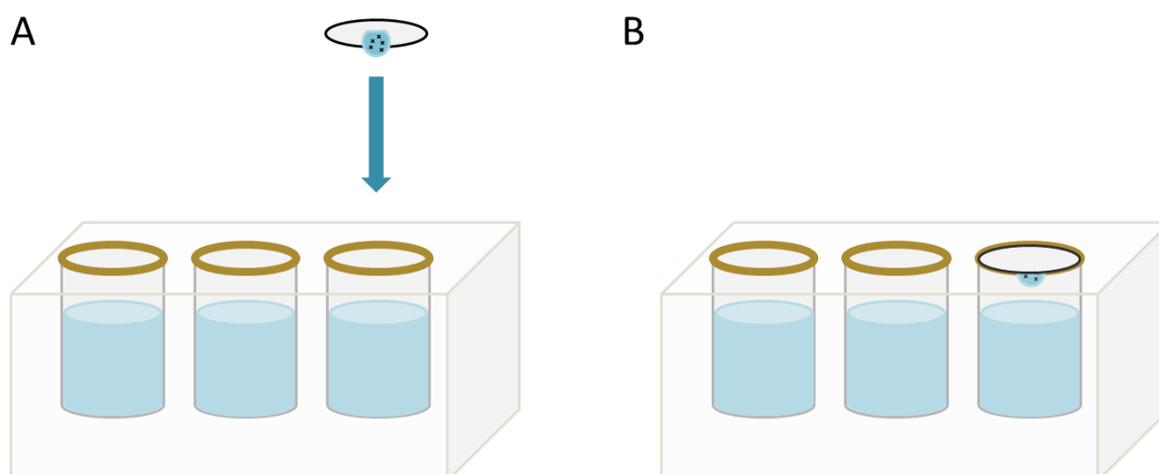
Pour le complexe SEP3<sup>[75-178]</sup>/AG<sup>[90-189]</sup> (6mg/mL), les quatre conditions montrant des cristaux polyédriques sont les tampons de thiocyanate de potassium 0,2M, Bis Tris propane 0,1M pH7,5, PEG3350 20% (après 60 jours), de cacodylate de sodium 0,1M pH6,5, MPD 40%, PEG8000 5% (après 30 jours), de Tris 0,1M pH8, formate de sodium 2,4M pH8 (après 30 jours) et de sulfate de lithium 0,2M, imidazole 0,1M pH8, PEG3000 10% (après 4 jours). Les cristaux obtenus sont testés en diffraction aux rayons X sur la ligne de lumière ID23-2 de l'ESRF par Dr. Chloé Zubieta.

Pour le complexe SEP3<sup>[75-178]</sup>/PHYL1<sub>0Y</sub> (9mg/mL), les deux conditions montrant des cristaux polyédriques sont des tampons d'acétate de sodium 0,1M pH4,6, chlorure de sodium 2M (après 14 jours) et d'acétate de sodium 0,1M pH4,6, formate de sodium 2M (après 90 jours).

Pour le complexe SEP3<sup>[75-178]</sup>/AG<sup>[90-189]</sup>, les seuls cristaux diffractant sont ceux ayant poussés dans le tampon de Tris 0,1M pH8, formate de sodium 2,4M pH8 alors que pour le complexe SEP3<sup>[75-178]</sup>/PHYL1<sub>0Y</sub>, les cristaux ayant poussé sur les deux tampons diffractent (très faiblement).

## 2. Optimisation des conditions de cristallisation au laboratoire

Les trois conditions précédentes (Tris 0,1M pH8, formate de sodium 2,4M pH8, acétate de sodium 0,1M pH4,6, chlorure de sodium 2M et d'acétate de sodium 0,1M pH4,6, formate de sodium 2M) sont ensuite retestées manuellement au laboratoire. Pour cela, les essais de cristallisation sont réalisés à température ambiante (20°C) sur des plaques 24 et 48 puits (plaque VDX™ avec mastic HR3-171 et plaque VDX48 avec mastic HR3-275 respectivement, Hampton Research). Pour cela, 500µL et 125µL de tampons sont déposés dans les puits de plaques 24 et 48 puits respectivement et constituent le réservoir. Différentes concentrations de précipitant sont ensuite déposées en forme de goutte sur des lamelles rondes (22mm HR3-231 et 12mm HR3-278T pour les plaques 24 et 48 puits respectivement, Hampton Research) (Figure 40.A). Les lamelles sont ensuite déposées sur les joints de mastic en orientant les gouttes de protéine/tampon face au puit ce qui permet de sceller l'environnement puit/lamelle (Figure 40.B). Les plaques ainsi scellées sont incubées à 4°C à l'obscurité.



**Figure 40 : Schéma du protocole de cristallisation de complexe protéique.** Les plaques de cristallisation et puits sont représentés par les pavés et cylindres gris respectivement. Les cercles marrons et noirs représentent le mastic servant à sceller les lamelles et les lamelles respectivement. **(A)** Un mélange de protéines (croix noires) et de tampon est déposé sous forme de goutte d'un côté de la lamelle. Cette lamelle est ensuite déposée sur le mastic en orientant les gouttes de protéine/tampon face au réservoir (bleu) du puit. **(B)** La lamelle déposée sur le mastic crée un microenvironnement dans le puit permettant à la goutte de protéines/tampon d'être exposée indirectement au tampon.

Pour le complexe SEP3<sup>[75-178]</sup>/AG<sup>[90-189]</sup>, des gammes sont réalisées sur deux conditions : la concentration de formate de sodium (1,8M, 2M, 2,1M, 2,2M, 2,3M et 2,4M) ainsi que le ratio de protéine/tampon dans la goutte (2/1, 1/1 et 1/2). Des cristaux sont obtenus pour les concentrations de formate de sodium 1,8M, 2M, 2,1M et 2,2M à pH8 et pour toutes les

concentrations de précipitant. Pour le complexe SEP3<sup>[75-178]</sup>/PHYL1<sub>0Y</sub>, des gammes sont réalisées sur trois conditions : la concentration (1,6M, 1,8M, 2M, 2,2M, 2,4M et 2,6M) et le pH (4,2, 4,4, 4,6 et 4,8) du chlorure de sodium et du formate de sodium ainsi que la concentration de précipitant (volume de protéines/volume de tampon : 2/1, 1/1 et 1/2). Après différents essais, 96 composés provenant d'un kit (Additive screen HR-428, Hampton Research) sont testés sur une condition unique (acétate de sodium 0,1M pH4,6, chlorure de sodium 2,04M). Une condition donne de nombreux cristaux polyédriques : le (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol (MPD) 5%. L'ajout d'une gamme de MPD (1%, 2,5%, 5%, 7,5%, 10% et 12,5%) est réalisée sur cette même condition unique et permet l'obtention de nombreux cristaux avec 5% de MPD.

À l'aide d'une boucle, les différents cristaux obtenus sont collectés, déposés dans un tampon de cryo-protection (tampon utilisé pour faire croître les cristaux auquel est ajouté du glycérol 20%) puis congelés dans de l'azote liquide. Ces cristaux sont ensuite testés en diffraction aux rayons X sur la ligne de lumière ID23-2 de l'ESRF. Les données de diffraction collectées à 100K (-173,15°C) montrent des résolutions minimales de 2,4Å et 3,6Å pour les cristaux de SEP3<sup>[75-178]</sup>/AG<sup>[90-189]</sup> et de SEP3<sup>[75-178]</sup>/PHYL1<sub>0Y</sub> qui appartiennent aux groupes d'espace C222<sub>1</sub> et P6<sub>1</sub>22 respectivement. L'indexation des données a été réalisée grâce au programme *MxCuBE* (Gabadinho et al. 2010) et les données ont été intégrées et mises à l'échelle grâce aux programmes *XDS* et *XSCALE* (Kabsch 2010). Les structures n'ont pas pu être caractérisées même par remplacement moléculaire avec les structures connues de SEP3<sup>[75-178]</sup> (4OX0, Puranik et al. 2014) et de PHYL1<sub>0Y</sub> (6JQA, Iwabuchi et al. 2019). La collection et l'étude des données de diffraction ont été réalisées par Dr Chloé Zubieta.



## Chapitre III : Résultats et discussions

## I. Identification des MADS-TFs du FQM ciblés par PHYL1<sub>0Y</sub> et analyse de son expression dans la plante

### A. Identification des MADS-TFs du FQM ciblés par PHYL1<sub>0Y</sub> par Y2H

Des études précédentes ont montré que les phyllogènes sont capables d'interagir avec certains MADS-TFs du FQM et de causer leur dégradation, via le protéasome 26S, en recrutant les protéines RAD23. La dégradation de ces MADS-TFs entraîne de forts phénotypes floraux notamment la stérilité des plantes (MacLean et al. 2011; 2014; Maejima et al. 2014; 2015; Iwabuchi et al. 2019; 2020).

Dans la littérature, les TFs testés par Y2H pour leur interaction avec PHYL1<sub>0Y</sub> sont WUSCHEL, SEP3, AP1 et CAL et seuls SEP3, AP1 et CAL interagissent avec lui (Maejima et al. 2014). Il a été observé que PHYL1<sub>0Y</sub> cause la dégradation *in vivo* de SEP3 et AP1 mais aussi de SEP1, SEP2 et SEP4, suggérant qu'il interagit aussi avec ceux-ci (Iwabuchi et al. 2020). Pour déterminer les MADS-TFs du FQM (SEP1-4, AG, AP1, AP3 et PI) ciblés par PHYL1<sub>0Y</sub>, une expérience de Y2H est réalisée ici. PHYL1<sub>0Y</sub> (et SEP3 en contrôle positif) sont clonés dans le vecteur pGBK-T7 (appât) et les différents MADS testés sont clonés dans le vecteur pGAD-T7 (proie). Les souches Y187 et AH109 sont transformées avec les constructions pGBK-T7 et pGAD-T7 contenant les gènes d'intérêt respectivement. Après croisement de ces souches, les croisements sont déposés sur milieu sélectif et seuls les croisements contenant des protéines qui interagissent poussent (Figure 41).

On remarque que SEP1-4, AG et AP1 interagissent comme attendu avec SEP3 (colonne 2, Fan et al. 1997; Honma et Goto 2001; de Folter et al. 2005; Immink et al. 2009) et aussi avec PHYL1<sub>0Y</sub> (colonne 3, Maejima et al. 2014; 2015). Les versions MIKC des TFs AP3 et PI n'interagissent pas avec SEP3 (lignes 8 et 9). Il a déjà été observé dans la littérature (Y. Yang, Fanning, et Jack 2003) et dans notre laboratoire que les versions MIKC d'AP3 et PI n'interagissent pas en levures, même entre elles. AP3 et PI étant des dimères obligatoires, les versions MIKC de ces protéines montrent donc des faux négatifs en levures c'est pourquoi les versions tronquées de ces protéines (IKC, sans le domaine M) sont testées également. Dans ce cas, les versions tronquées d'AP3 (AP3<sup>[59-233]</sup>) et PI (PI<sup>[59-209]</sup>) interagissent bien avec SEP3 (Honma et Goto 2001) mais n'interagissent toujours pas avec PHYL1<sub>0Y</sub> (lignes 10 et 11). Ces analyses ont permis d'identifier les MADS-TFs des classes A, C et E du FQM

comme cibles de *PHYL1<sub>oy</sub>*. Comme dit précédemment, les interactions avec SEP1-4 et AP1 étaient attendues d'après la littérature (Maejima et al. 2014). L'interaction avec AG est bien plus surprenante car SAP54, un homologue de *PHYL1<sub>oy</sub>*, interagit avec SEP1-4 et AP1 mais pas avec AG (MacLean et al. 2014). Ceci suggère fortement que les différents homologues de *PHYL1<sub>oy</sub>* présentent des différences d'affinité avec les MADS.

		1	2	3
	pGAD\pGBK	pGBK	SEP3 MIKC	PHYL1 <sub>oy</sub>
1	pGAD			
2	SEP1 MIKC			
3	SEP2 MIKC			
4	SEP3 MIKC			
5	SEP4_2 MIKC			
6	AG MIKC			
7	AP1 MIKC			
8	AP3 MIKC			
9	PI MIKC			
10	AP3 IKC			
11	PI IKC			

**Figure 41 : Etude de l'interaction des différents MADS-TFs du FQM avec SEP3 MIKC et PHYL1<sub>oy</sub> par Yeast-Two-Hybrid.** Les domaines IKC d'AP3 et PI (AP3<sup>[59-233]</sup> et PI<sup>[59-209]</sup>) ont été utilisés car les versions MIKC n'interagissent pas en Y2H. La photographie est prise après 4 jours d'incubation.

Afin d'observer l'impact de l'expression de *PHYL1<sub>oy</sub>* sur le développement floral et de valider son interaction avec les MADS-TFs des classes A, C et E du FQM, des plantes transgéniques sont générées exprimant *PHYL1<sub>oy</sub>* sous le contrôle de différents promoteurs.

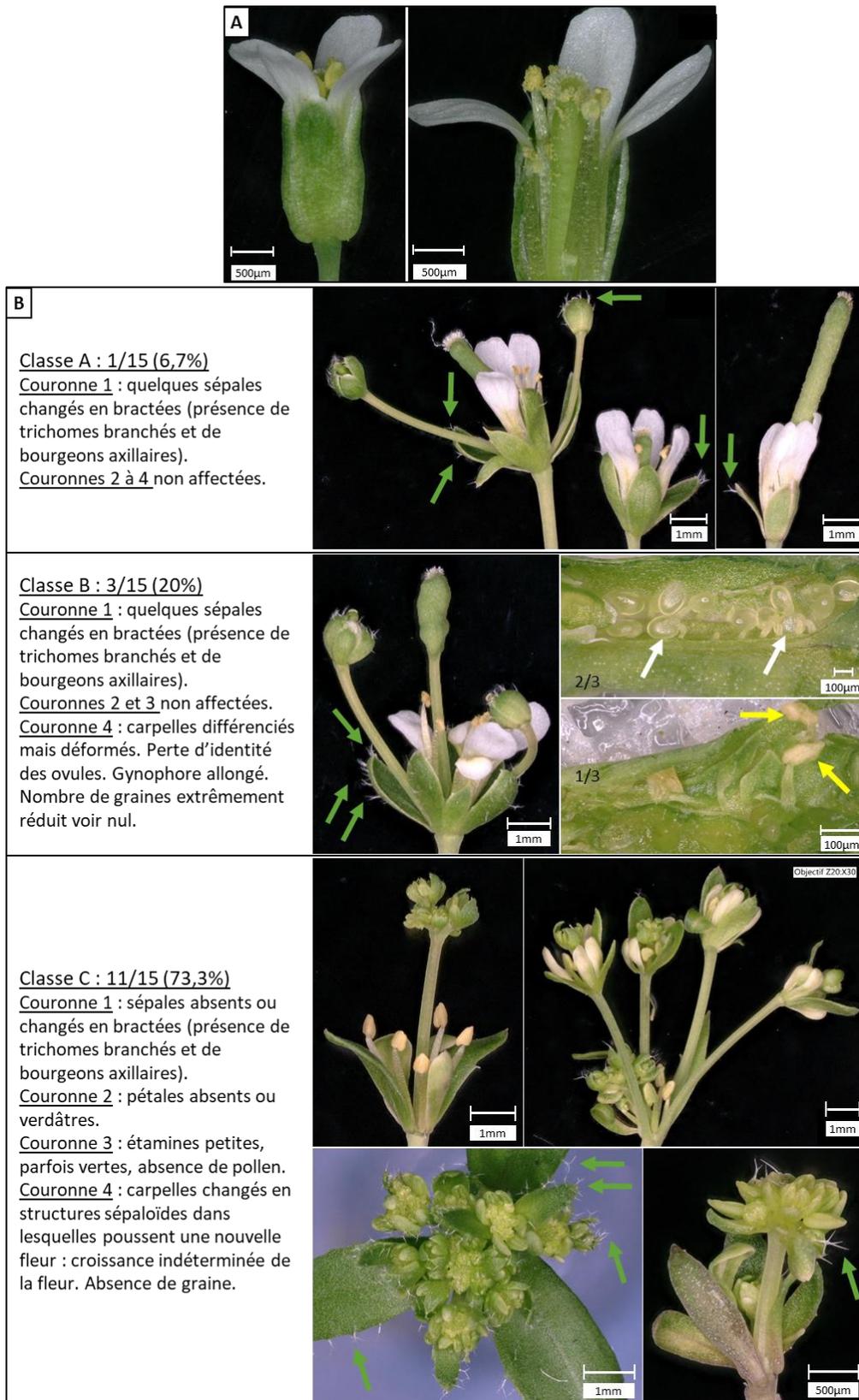
## B. Analyse de l'expression de *PHYL1<sub>oy</sub>* sur le développement de la fleur

Toutes les observations que nous détaillerons par la suite sont réalisées sur les premières générations de plantes transformées, ou T1.

## 1. Plantes transgéniques exprimant *PHYL1<sub>OR</sub>* sous le promoteur 35S

Dans le cas de plantes Col-0 exprimant *PHYL1<sub>OR</sub>* sous le contrôle du promoteur constitutif fort 35S, de forts phénotypes sont attendus sur l'ensemble des couronnes ainsi que des phénotypes de perte d'identité du méristème floral (Maejima et al. 2014).

La totalité des plantes transformées observées dans cette expérience montre que le développement floral est affecté (15/15 soit 100%) comparé à des fleurs sauvages (Figure 42.A). Les différentes lignées ont été regroupées en trois classes : les classes A, B et C regroupant les phénotypes faibles, intermédiaires et forts respectivement (Figure 42.B). Bien que nous n'ayons pas analysé le niveau d'expression de *PHYL1<sub>OR</sub>* dans les différentes lignées, il est fort probable que les classes A, B et C se différencient par leur niveau d'expression de *PHYL1<sub>OR</sub>* dans la fleur. La classe A ne contient qu'une plante (1/15 soit 6,7%) montrant des organes floraux normalement formés dans les couronnes 2 à 4 (Figure 42, classe A) et quelques sépales changés en bractées. Les bractées sont des pièces végétales hybrides entre une pièce florale et une pièce foliaire présentant des trichomes branchés, caractéristiques d'organes foliaires (Figure 42, classe A, flèches vertes), et à leur base des bourgeons axillaires donnant eux-mêmes des fleurs (Figure 42, classe A). Ce phénotype rappelle celui d'un mutant faible *ap1* (Bowman, Smyth, et Meyerowitz 1989; Gustafson-Brown, Savidge, et Yanofsky 1994) et suggère une dégradation du tétramère SEP/AP1. Cette plante est la seule des quinze plantes analysées à produire des graines. La classe B contient trois plantes (3/15 soit 20%) montrant des couronnes 1 et 4 affectées. A la place des sépales, des bractées sont observées présentant des bourgeons axillaires (Figure 42, classe B, flèches vertes). Les carpelles sont différenciés (présence de stigmates) mais déformés et leur gynophore (pédoncule au milieu de la fleur qui permet une légère surélévation des carpelles) est anormalement allongé (Figure 42, classe B gauche). La croissance du gynophore est normalement réprimée par le gène *KNUCKLES* (*KNU*) (Payne, Johnson, et Koltunow 2004) et ce gène est activé par AG et très probablement par le tétramère SEP3/AG (Sun et al. 2009; Hugouvieux et al. 2018).

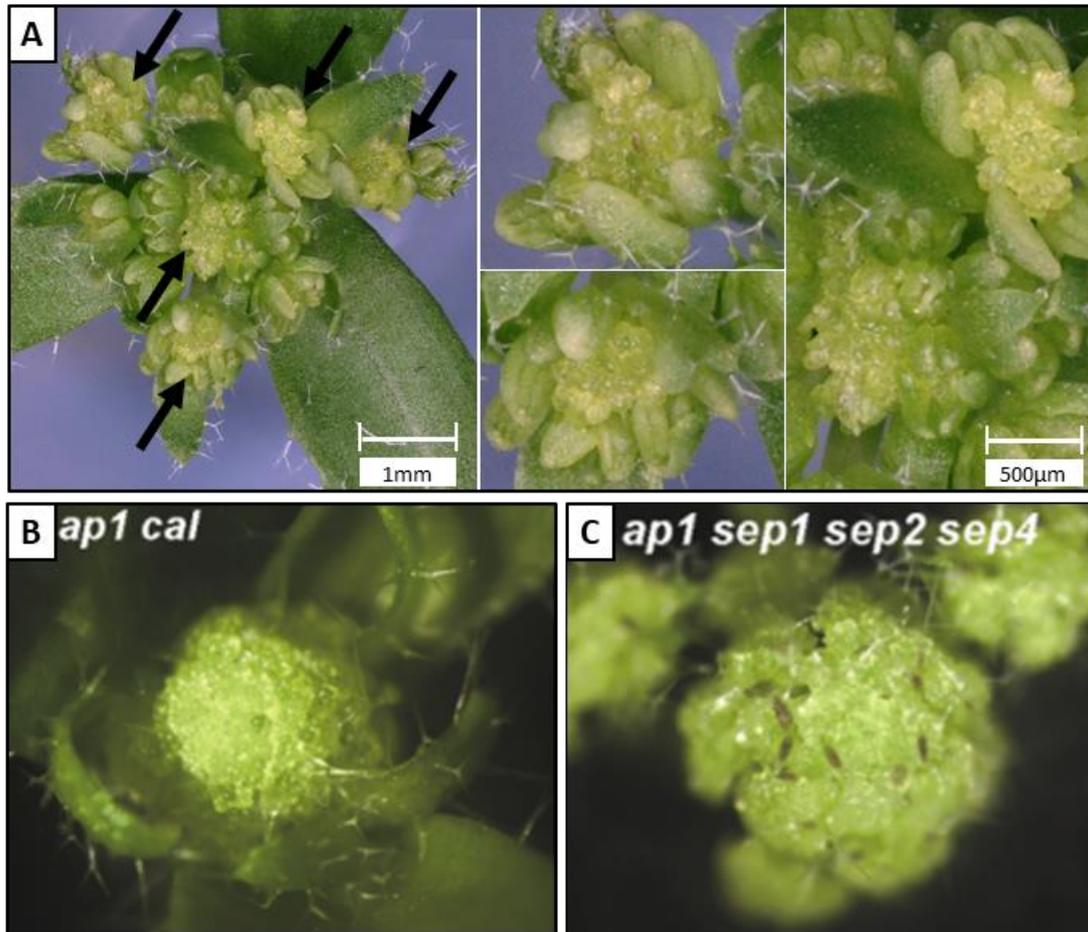


**Figure 42 : Phénotypes des plantes d'*A. thaliana* Col-0 (A) sauvages et (B) sauvages exprimant *PHYL1<sub>OR</sub>* sous le contrôle du promoteur constitutif fort 35S. Les différentes classes sont annotées avec le pourcentage qu'elles représentent sur la totalité des plantes analysées. Les échelles sont annotées sur chaque image. Les flèches vertes, blanches et jaunes montrent des trichomes branchés, des ovules et des structures semblables à des étamines respectivement.**

En ouvrant les carpelles des plantes de la classe B, on observe des ovules normalement formés sur deux plantes (Figure 42, classe B droite, flèches blanches) et une perte d'identité des ovules qui sont remplacés par des tissus verts et des structures semblables à des étamines sur la troisième plante (Figure 42, classe B droite, flèches jaunes). Le nombre de graines de ces plantes est extrêmement réduit, probablement du fait de la croissance affectée du gynophore qui empêche la pollinisation en désynchronisant la croissance du pistil et des étamines. Ces phénotypes de la couronne 4 et de la perte d'identité des ovules suggèrent une dégradation du tétramère SEP/AG pouvant intervenir dans l'activation de *KNU* et aussi une dégradation du tétramère SEP/AG/STK/SHP, nécessaire pour la formation des ovules. La classe C regroupe la majorité des plantes avec onze plantes (11/15 soit 73,3%) et montre des organes floraux très affectés dans les 4 couronnes, avec des phénotypes plus prononcés que ceux de la classe B dans les couronnes 1 et 4, et des couronnes 2 et 3 affectées à leurs tours (Figure 42, classe C). Les sépales sont absents ou changés en bractées avec des bourgeons axillaires et présentent souvent des trichomes branchés, observés chez un mutant *ap1* (Figure 42, classe C, flèches vertes). Les bourgeons axillaires sont beaucoup plus nombreux et forment des sortes de bouquets (Bowman, Smyth, et Meyerowitz 1989; Gustafson-Brown, Savidge, et Yanofsky 1994) (Figure 42, classe C, haut droite). Les pétales sont le plus souvent absents (rappelant le phénotype de mutant *ap1*) ou verdâtres (Figure 42, classe C, haut). Les étamines sont petites, parfois vertes et ne produisent pas de pollen (Figure 42, classe C, haut droite et bas). Les carpelles ne se différencient pas et sont remplacés par des structures sépaloïdes dans lesquelles poussent une nouvelle fleur indiquant que la croissance de la fleur est indéterminée (Figure 42, classe C). Les défauts observés dans les couronnes 2 et 3 suggèrent une dégradation des complexes SEP/AP1/AP3/PI et SEP/AG/AP3/PI.

La formation de nombreuses fleurs en bouquet rappelle des phénotypes appelés « chou-fleur » observées chez les mutants *ap1cal* et *ap1sep1sep2sep4* (Bowman et al. 1993; Ditta et al. 2004) et chez les plantes exprimant *PHYL1<sub>OR</sub>* sous le contrôle du promoteur 35S (Maejima et al. 2014). Ces phénotypes suggèrent une perte d'identité du méristème floral (Figure 43) liée à la dégradation de CAL et d'AP1 ou des SEPs et d'AP1 (Figure 43.B et C) (Bowman et al. 1993; Ditta et al. 2004). Dans l'ensemble, même si toutes les couronnes sont affectées, les plus sensibles semblent être les sépales (affectés dès les phénotypes faibles, classe A) et les carpelles (affectés dès les phénotypes intermédiaires, classe B). L'ensemble de ces

phénotypes suggèrent une atteinte de l'ensemble des complexes du FQM et sont très similaires aux phénotypes décrits dans la littérature chez les plantes exprimant *SAP54* ou *PHYL1<sub>0Y</sub>* sous le promoteur 35S (MacLean et al. 2011; Maejima et al. 2014).



**Figure 43 : Phénotypes des plantes d'*A. thaliana* Col-0 exprimant *PHYL1<sub>0Y</sub>* sous le contrôle du promoteur constitutif fort 35S montrant une perte d'identité du méristème floral. (A) Plante de la classe C (voir Figure 42). Les flèches noires montrent les zones méristématiques affectées zoomées à droite. Les échelles sont annotées. Plantes (B) double mutant *ap1cal* (Bowman et al. 1993) et (C) quadruple mutante *ap1sep1sep2sep4* (Ditta et al. 2004) montrant des zones méristématiques affectées en forme de chou-fleur d'après Ditta et al. 2004.**

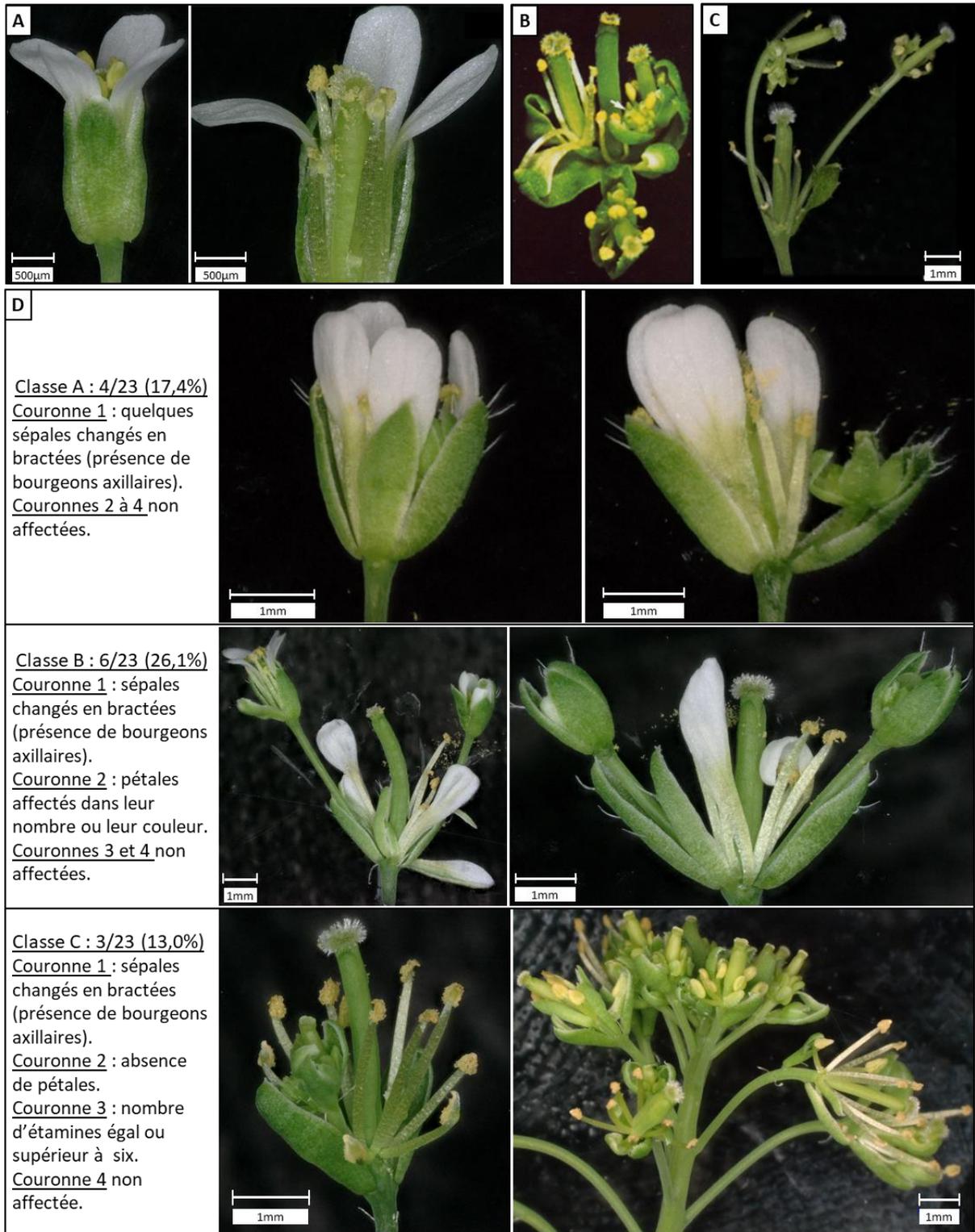
## 2. Plantes transgéniques exprimant *PHYL1<sub>0Y</sub>* sous le contrôle des promoteurs d'*AP1* et de *SEP3*

Dans un deuxième temps des plantes exprimant *PHYL1<sub>0Y</sub>* dans des couronnes spécifiques ont été générées. Des plantes exprimant *PHYL1<sub>0Y</sub>* sous le promoteur d'*AP1* (exprimé dans la première et deuxième couronne dans la morphogénèse florale, Mandel et al. 1992) et sous le promoteur de *SEP3* (exprimé surtout dans les deux dernières couronnes, Mandel et Yanofsky

1998) ont été générées et analysées. L'hypothèse de cette expérience est de retrouver des phénotypes spécifiques des mutants *ap1* et *sep*.

#### a. Plantes transgéniques exprimant *PHYL1<sub>oy</sub>* sous le promoteur d'*AP1*

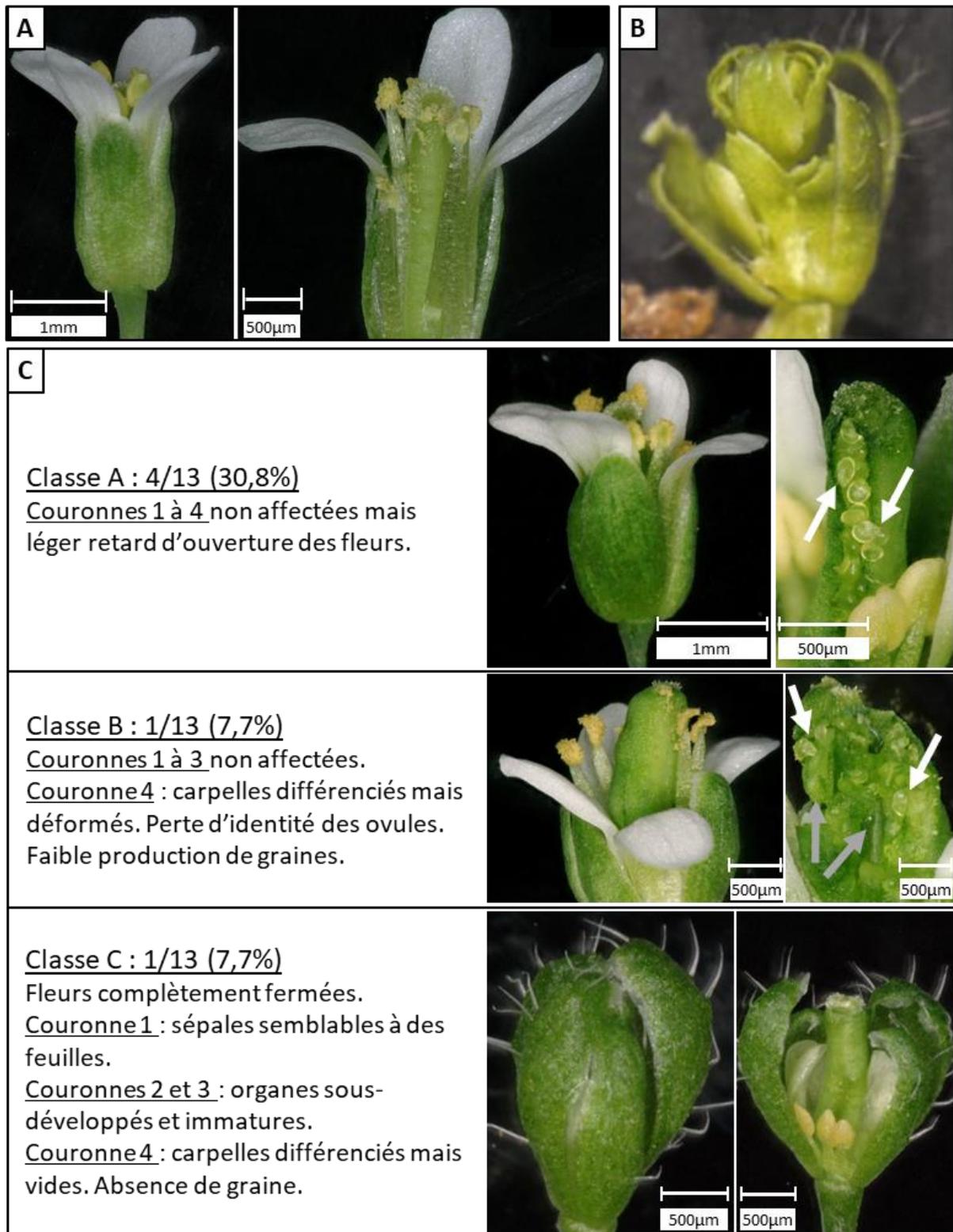
Dix plantes exprimant *AP1::PHYL1<sub>oy</sub>* sur les vingt-trois analysées (10/23 soit 43,5%) montrent des phénotypes semblables aux plantes sauvages (Figure 44.A) et les treize autres plantes (13/23 soit 56,5%) montrent un phénotype floral rappelant les phénotypes *ap1* (Figure 44.B et C). Les différentes lignées sont regroupées en quatre classes O, A, B et C regroupant les plantes sans phénotype et avec des phénotypes faibles, intermédiaires et forts respectivement. La classe A contient quatre plantes (4/23 soit 17,4%) montrant des organes floraux normalement formés à l'exception de quelques sépales changés en bractées (Figure 44.D, classe A). La classe B contient six plantes (6/23 soit 26,1%) montrant tous les sépales changés en bractées et des pétales affectés dans leur nombre (<4) et/ou dans leur couleur (verdissement) (Figure 44.D, classe B). Les couronnes 3 et 4 ne sont pas affectées. La classe C regroupe trois plantes (3/23 soit 13,0%) montrant des sépales affectés semblables à des bractées avec des bourgeons axillaires, une absence de pétales et un nombre d'étamines normal ou accru (Figure 44.D, classe C). La couronne 4 n'est pas affectée. Cette dernière classe ressemble fortement aux plantes mutantes *ap1-1* (allèle intermédiaire, Figure 44.A) et *ap1-7* (allèle fort, Figure 44.B). Bien que nous n'ayons pas analysé le niveau d'expression de *PHYL1<sub>oy</sub>* dans les différentes lignées, il est fort probable que les différentes classes se différencient par leur niveau d'expression de *PHYL1<sub>oy</sub>* dans les couronnes 1 et 2. Les phénotypes observés sont semblables aux mutants *ap1*, indiquant que les complexes contenant AP1 semblent ciblés par *PHYL1<sub>oy</sub>*. Ces plantes montrent aussi que *PHYL1<sub>oy</sub>* ne semble pas se déplacer d'une couronne à une autre puisque les couronnes 3 et 4 ne sont pas touchées. Ces plantes, non affectées dans les couronnes 3 et 4, produisent des graines, comme les mutants *ap1*.



**Figure 44 : Phénotypes des plantes d'*A. thaliana* Col-0 exprimant *PHYL1<sub>ox</sub>* sous le contrôle du promoteur d'*AP1*. (A) Plante sauvage entière (gauche) et à laquelle on a ôté un sépale et un pétale (droite). (B) Plante mutante *ap1-1* d'après Gustafson-Brown, Savidge, et Yanofsky 1994. (C) Plante mutante *ap1-7* d'après Lai et al. 2021. (D) Phénotypes de plantes d'*A. thaliana* Col-0 exprimant *PHYL1<sub>ox</sub>* sous le promoteur d'*AP1*. Les différentes classes sont annotées avec le pourcentage qu'elles représentent sur la totalité des plantes analysées. Les échelles sont annotées sur chaque image.**

#### b. Plantes transgéniques exprimant *PHYL1<sub>OR</sub>* sous le promoteur de *SEP3*

Lorsque Col-0 expriment *SEP3::PHYL1<sub>OR</sub>*, sept plantes sur les treize plantes transformées et analysées (7/13 soit 53,8%) montrent des fleurs similaires aux plantes sauvages (Figure 45.A) et six plantes (6/13 soit 46,2%) montrent des fleurs différentes des plantes sauvages (Figure 45.B). Les différentes lignées sont regroupées en quatre classes O, A, B et C regroupant les plantes sans phénotype et avec des phénotypes faibles, intermédiaires et forts respectivement. Les quatre plantes de la classe A (4/13 soit 30,8%) montrent un léger retard d'ouverture de leurs fleurs (Figure 45.C, classe A) mais les organes de ces fleurs sont semblables à ceux des fleurs sauvages et les siliques donnent des graines. En ouvrant les carpelles, de nombreux ovules normalement formés sont observés et expliquent la présence de graines. La plante de la classe B (1/13 soit 7,7%) montre des couronnes 1 à 3 non affectées et des carpelles différenciés (présence de stigmates) mais déformés (Figure 45.C, classe B). Lorsque ces carpelles sont ouverts, on observe la présence de rares ovules (Figure 45.C, classe B, flèches blanches) et de structures indifférenciées (Figure 45.C, classe B, flèches grises) pouvant expliquer la déformation des carpelles et suggérant une perte d'identité des ovules. La présence d'ovules peut expliquer la production de graines en très faible quantité. La plante de la classe C (1/13 soit 7,7%) montre des fleurs complètement fermées (Figure 45.C, classe C). Lorsque ces fleurs sont ouvertes, les sépales ressemblent à des feuilles, les pétales et étamines sont sous-développés et le carpelle semble très petit, vide et ne donne pas de graines. Le phénotype du triple mutants *sep1sep2sep3* (Figure 45.B, tous les organes floraux sont changés en sépales) n'est donc pas observé et la couronne 4 est la plus affectée et ce sur deux plantes seulement.

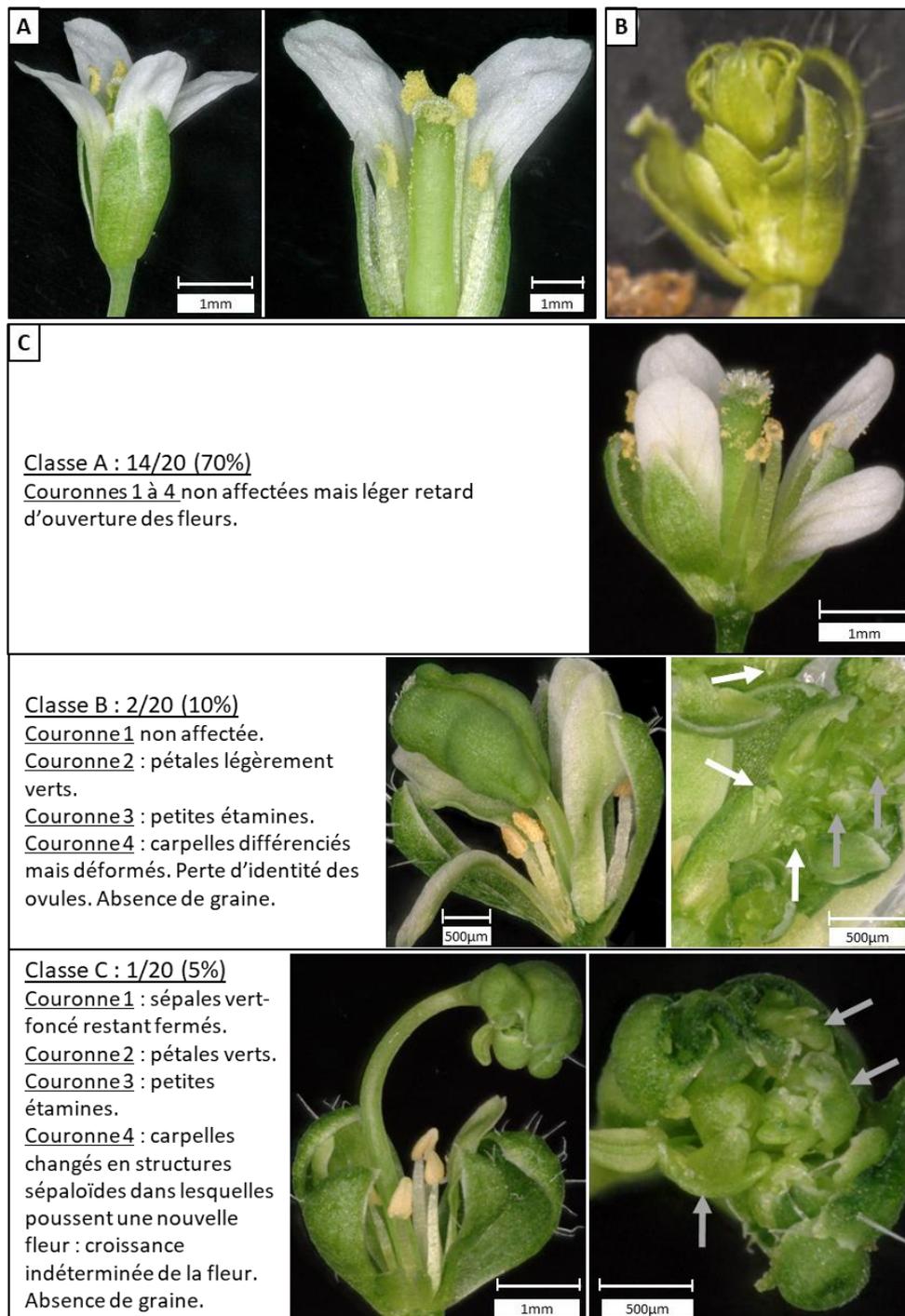


**Figure 45 : Phénotypes des plantes d'*A. thaliana* Col-0 exprimant *PHYL1<sup>OY</sup>* sous le contrôle du promoteur de *SEP3*. (A) Plante sauvage entière (gauche) et à laquelle on a ôté un sépale et un pétale (droite). (B) Plante triple mutante *sep1sep2sep3* (Pelaz et al. 2000). (C) Phénotypes de plantes d'*A. thaliana* Col-0 exprimant *PHYL1<sup>OY</sup>* sous le promoteur de *SEP3*. Les différentes classes sont annotées avec le pourcentage qu'elles représentent sur la totalité des plantes analysées. Les échelles sont annotées sur chaque image. Les flèches blanches et grises montrent des ovules et une perte d'identité des ovules respectivement.**

La famille SEP étant une famille multigénique et comme *PHYL1<sub>OR</sub>* interagit avec tous les SEP (Figure 41), le niveau d'expression de *PHYL1<sub>OR</sub>* chez les plantes Col-0 *SEP3::PHYL1<sub>OR</sub>* peut être limitant dans la plante pour conduire à la dégradation totale des complexes SEP/MADS-TFs. Ainsi, la construction *SEP3::PHYL1<sub>OR</sub>* est introduite chez différents mutants *sep* : *sep3*, *sep1sep2*, *sep1sep2sep3+/-* et *sep1sep2sep3*. L'hypothèse est qu'en diminuant la quantité de SEP dans les plantes, les phénotypes devraient s'amplifier.

Les plantes mutantes *sep3* ne présentent pas de phénotypes apparents différents d'une plante sauvage (Figure 46.A). Sur les vingt plantes *sep3* transformées et analysées, trois plantes (3/20 soit 15%) ne montrent aucun phénotype et dix-sept plantes (17/20 soit 85%) présentent un phénotype floral mais toujours éloigné du triple mutant *sep1sep2sep3* (Figure 46.B). Les différentes lignées sont regroupées en quatre classes O, A, B et C regroupant les plantes sans phénotype et avec des phénotypes faibles, intermédiaires et forts respectivement. Les phénotypes des lignées A sont similaires à ceux observés chez les plantes sauvages exprimant *SEP3::PHYL1<sub>OR</sub>* de la classe A précédentes. Les quatorze plantes de la classe A (14/20 soit 70%) comportent des organes floraux normalement formés et produisent des graines mais montrent un léger retard d'ouverture de leurs fleurs (Figure 46.C, classe A). Les deux plantes de la classe B (2/20 soit 10%) montrent des sépales sauvages, des pétales verdâtres, des petites étamines et un carpelle différencié (présence de stigmates) mais déformé qui ne produit pas de graine (Figure 46.C, classe B gauche). Lorsque ce carpelle est ouvert, on observe, comme dans la classe B précédente, la présence de très rares ovules (Figure 46.C, classe B, flèches blanches) et de structures vertes suggérant une perte d'identité des ovules (Figure 46.C, classe B, flèches grises). Le phénotype de cette classe B, semblable à la classe B précédente, s'est renforcé puisque les pétales et étamines semblent légèrement affectés et aucune graine n'est produite. La plante de la classe C présente des sépales qui restent fermés, des pétales verts, des petites étamines et des carpelles changés en structures sépaloïdes dans lesquelles pousse une nouvelle fleur (Figure 46.C, classe C). Cette fleur ne produit pas de graine. Les phénotypes ne ressemblent pas au triple mutant *sep1sep2sep3* mais montrent une augmentation des plantes affectées (46,2 => 85%) et les différentes classes augmentent soit en nombre (A : 30,8 => 70% et B : 7,7 => 10%), soit en intensité de phénotype (la classe B est affectée dans les pétales et les étamines et ne produit plus de graines et la classe C est affectée dans les pétales et les étamines et montre des fleurs poussant à la place

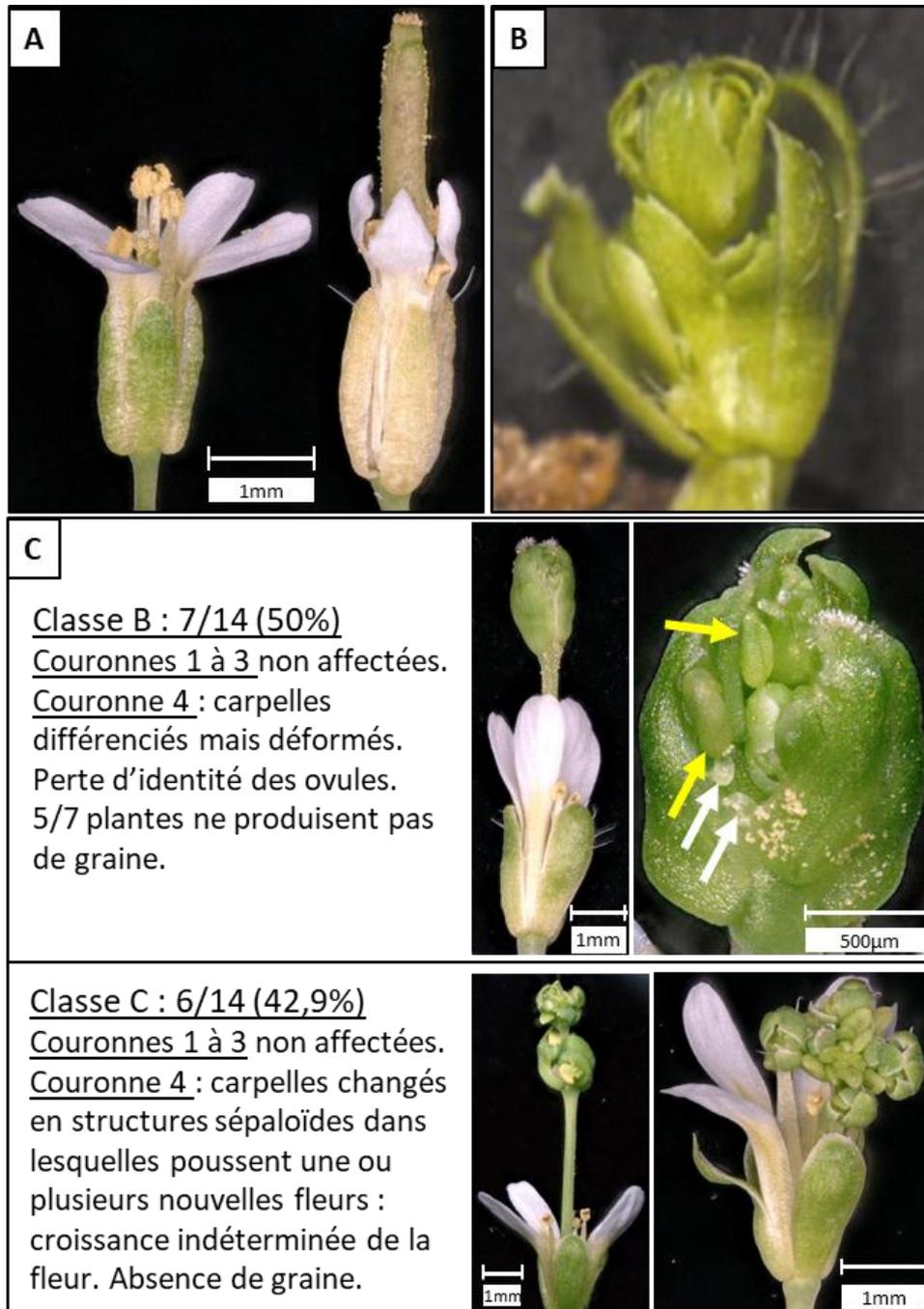
des carpelles) par rapport aux plantes sauvages exprimant *PHYL1<sub>OV</sub>* sous le promoteur de *SEP3*.



**Figure 46 : Phénotypes des plantes d'*A. thaliana sep3* exprimant *PHYL1<sub>OV</sub>* sous le contrôle du promoteur de *SEP3*. (A) Plante *sep3* entière (gauche) et à laquelle on a ôté un sépale et un pétale (droite). (B) Plante triple mutante *sep1sep2sep3* (Pelaz et al. 2000). (C) Phénotypes des plantes d'*A. thaliana sep3* exprimant *PHYL1<sub>OV</sub>* sous le promoteur de *SEP3*. Les différentes classes sont annotées avec le pourcentage qu'elles représentent sur la totalité des plantes analysées. Les échelles sont annotées sur chaque image. Les flèches blanches et grises montrent des ovules et une perte d'identité des ovules respectivement.**

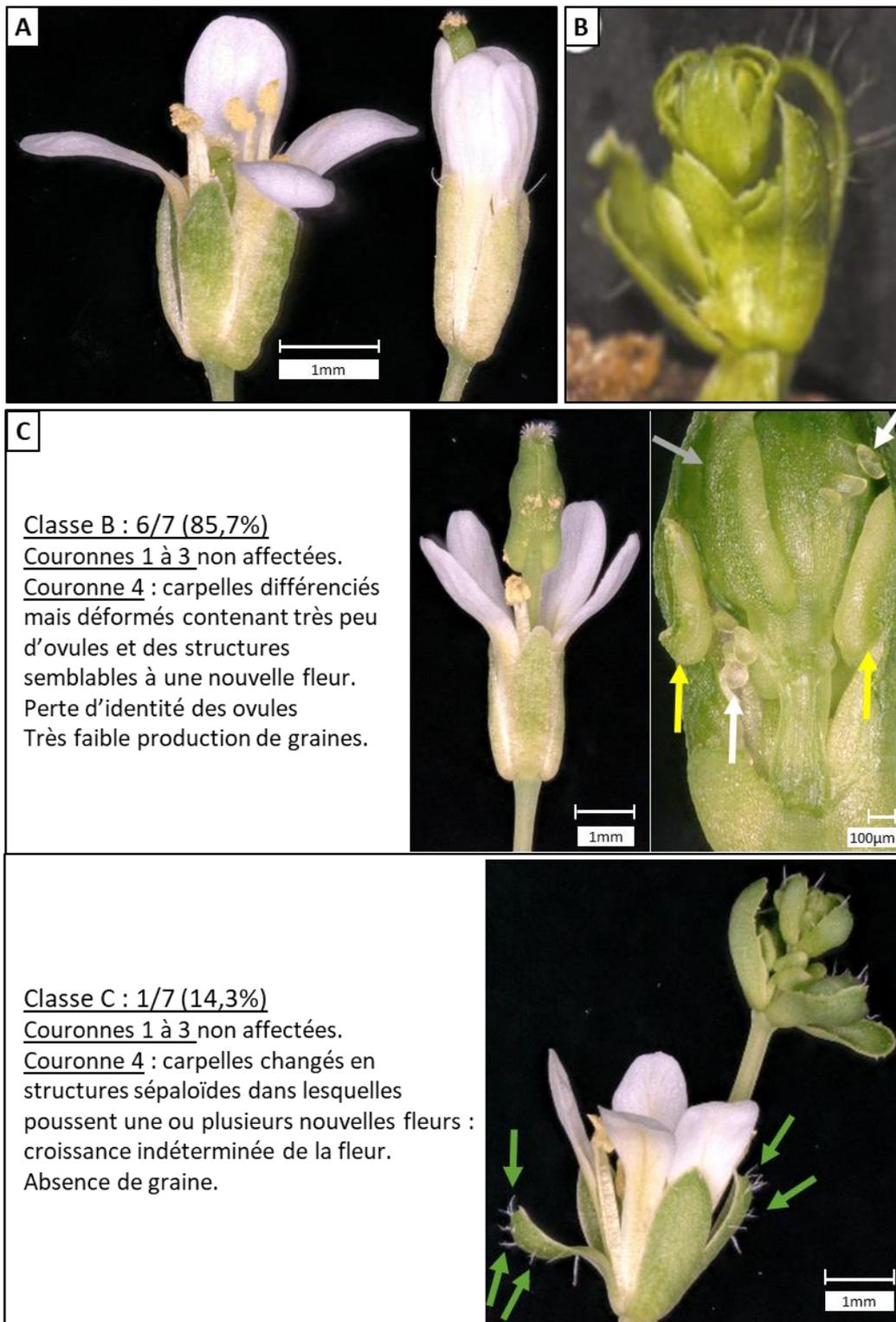
Les plantes double mutantes *sep1sep2* ne montrent pas de phénotypes différents des plantes sauvages (Figure 47.A). Une seule plante *sep1sep2* exprimant *SEP3::PHYL1<sub>OR</sub>* sur les quatorze analysées (1/14 soit 7,1%) ne montre aucun phénotype et treize plantes (13/14 soit 92,9%) montrent un phénotype floral comparé au double mutant (Figure 47.C). Les différentes lignées sont regroupées en quatre classes O, B et C regroupant les plantes sans phénotype et avec des phénotypes intermédiaires et forts respectivement. Les phénotypes des lignées B et C sont très similaires, au niveau de la couronne 4, à ceux observés avec les plantes *sep3* exprimant *SEP3::PHYL1<sub>OR</sub>* précédentes. Les sept plantes de la classe B (7/14 soit 50%) montrent des sépales, pétales et étamines sauvages ainsi que des carpelles plutôt différenciés (conservation de l'architecture globale des carpelles et présence de stigmates) mais déformés dont le gynophore croît de manière anormale (Figure 47.C, classe B gauche). Lorsque les carpelles sont ouverts, de rares ovules (Figure 47.C, classe B gauche, flèches blanches) ainsi que de nouveaux organes floraux immatures comme des étamines sont observés (Figure 47.C, classe B gauche, flèches jaunes). Sur ces sept plantes, seules deux d'entre elles produisent des graines en faible quantité. Les six plantes de la classe C (6/14 soit 42,9%) présentent des sépales, pétales et étamines sauvages ainsi que des carpelles changés en structures sépaloïdes qui laissent apparaître une ou plusieurs nouvelles fleurs montrant la croissance indéterminée de la fleur (Figure 47.C, classe C). Ces plantes ne produisent pas de graines. Les phénotypes des classes B et C observés ici sont moins forts sur les couronnes 1 à 3 que ceux des plantes *sep3* exprimant *SEP3::PHYL1<sub>OR</sub>* analysées précédemment. Il est donc possible que *SEP3* soit plus important, qualitativement et/ou quantitativement, que *SEP1* et *SEP2* pour le développement de ces couronnes ce qui a déjà été suggéré dans la littérature (Pelaz et al. 2001; Ditta et al. 2004). En ce qui concerne la couronne 4, les phénotypes observés ici semblent plus forts que les phénotypes observés chez les plantes analysées *sep3* puisque les résultats montrent une augmentation des plantes affectées (85 => 92,9%) et une répartition des phénotypes allant vers les phénotypes forts (disparition de la classe A au profit de la classe B : 10 => 50% et de la classe C : 5 => 42,9%). Même si les phénotypes sont plus forts, aucun phénotype semblable au triple mutant *sep1sep2sep3* (Figure 47.B) n'est observé et ces phénotypes touchent principalement la couronne 4. Il est important de noter que l'expression de *SEP1* et *SEP2* chez le mutant *sep3*, l'expression de *SEP3* chez le mutant *sep1sep2* et l'expression de *PHYL1<sub>OR</sub>* chez les différentes plantes analysées n'ont pas été mesurées. Cependant nous pouvons dire que l'action de *PHYL1<sub>OR</sub>* est moins délétère pour la couronne 4

dans le fond génétique *sep3* que dans le fond génétique *sep1sep2*. Ceci tend à valider que la quantité de SEP versus la quantité de PHYL1<sub>ov</sub> est responsable des faibles phénotypes observé chez les plantes exprimant *SEP3::PHYL1<sub>ov</sub>*.



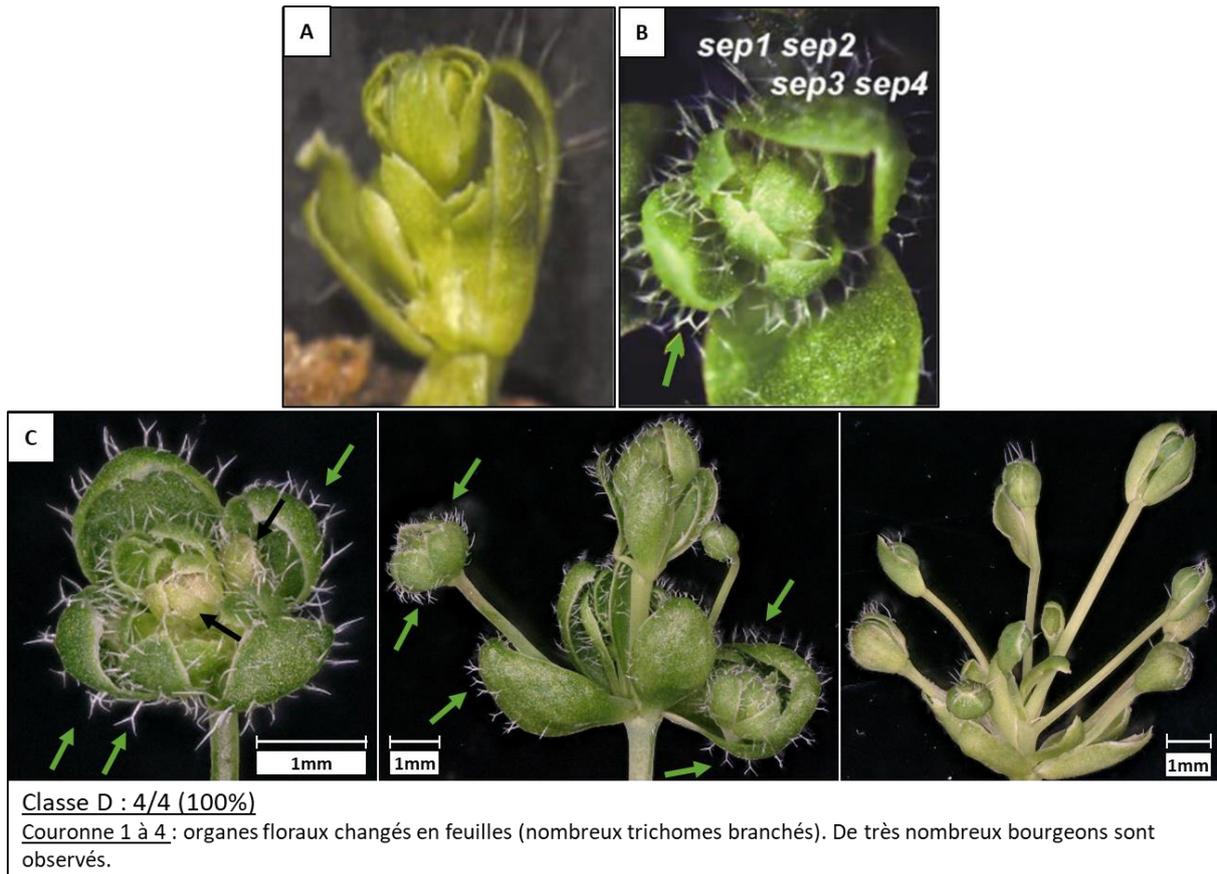
**Figure 47 : Phénotypes des plantes d'*A. thaliana sep1sep2* exprimant *PHYL1<sub>ov</sub>* sous le contrôle du promoteur de *SEP3*.** (A) Plante *sep1sep2* (gauche) et plante *sep1sep2* dont le carpelle se transforme en silique qui donne des graines (droite). (B) Plante triple mutante *sep1sep2sep3* (Pelaz et al. 2000). (C) Phénotypes des plantes d'*A. thaliana sep1sep2* exprimant *PHYL1<sub>ov</sub>* sous le promoteur de *SEP3*. Les différentes classes sont annotées avec le pourcentage qu'elles représentent sur la totalité des plantes analysées. Les échelles sont annotées sur chaque image. Les flèches blanches et jaunes montrent des ovules et des structures semblables à des étamines respectivement.

Pour étudier les plantes *sep1sep2sep3+/-* et *sep1sep2sep3*, des plantes *sep1sep2sep3+/-* ont été transformées avec la construction de *PHYL1<sub>OR</sub>* sous le promoteur de *SEP3*. Après récolte des graines, les graines fluorescentes sont semées et donnent  $\frac{1}{4}$  de plantes *sep1sep2*,  $\frac{1}{4}$  de plantes *sep1sep2sep3* et  $\frac{1}{2}$  de plantes *sep1sep2sep3+/-* exprimant *PHYL1<sub>OR</sub>*. Les sept plantes *sep1sep2* obtenues montrent des phénotypes semblables à ceux déjà observés et ne seront pas détaillées ici. Les plantes mutantes *sep1sep2sep3+/-* non transformées présentent des fleurs très semblables à des plantes sauvages (Figure 48.A) avec seulement les premières fleurs affectées dans la couronne 4 (non montré). Les résultats montrent que la totalité des plantes transformées (7/7 soit 100%) montrent un phénotype floral mais sont très similaires aux plantes double mutantes *sep1sep2* exprimant *PHYL1<sub>OR</sub>* sous le promoteur de *SEP3* avec seulement la couronne 4 clairement affectée (Figure 48.C). La classe B regroupe six plantes (6/7 soit 85,7%) montrant des sépales, pétales et étamines semblables aux plantes *sep1sep2sep3+/-* ainsi que des carpelles différenciés (conservation de l'architecture globale des carpelles et présence de stigmates) mais déformés (Figure 48.C, classe B gauche). Lorsque ces carpelles sont ouverts, sont observés quelques ovules (Figure 48.C, classe B droite, flèches blanches) et une nouvelle structure florale avec des étamines (Figure 48.C, classe B droite, flèches jaunes) et un futur carpelle déformé (Figure 48.C, classe B droite, flèche grise). La seule plante (1/7 soit 14,3%) de la classe C montre des sépales présentant des trichomes branchés (Figure 48.C, classe C, flèches vertes), des pétales et des étamines sauvages ainsi que des carpelles changés en structures sépaloïdes dans lesquelles poussent une ou plusieurs nouvelles fleurs (Figure 48.C, classe C). A nouveau, la fleur a une croissance indéterminée. Les fleurs issues de cette couronne sont très affectées et complètement vertes (Figure 48.C, classe C). Cette plante est la seule à ne pas produire de graines même si les autres plantes en produisent très peu. Ici encore le phénotype du triple mutant *sep1sep2sep3* attendu n'est pas obtenu (Figure 48.B).



**Figure 48 : Phénotypes des plantes d'*A. thaliana sep1sep2sep3+/-* exprimant *PHYL1<sub>ov</sub>* sous le contrôle du promoteur de *SEP3*. (A) Plante *sep1sep2sep3+/-* (gauche) et plante *sep1sep2sep3+/-* dont le carpelle croît en silique qui donne des graines (droite). (B) Plante triple mutante *sep1sep2sep3* (Pelaz et al. 2000). (C) Phénotypes de plantes *sep1sep2sep3+/-* exprimant *PHYL1<sub>ov</sub>* sous le promoteur de *SEP3*. Les différentes classes sont annotées avec le pourcentage qu'elles représentent sur la totalité des plantes analysées. Les échelles sont annotées sur chaque image. Les flèches grise, blanches, jaunes et vertes montrent des structures indifférenciées, des ovules, des structures semblables à des étamines et des trichomes branchés respectivement.**

Les plantes triple mutantes *sep1sep2sep3* montrent une malformation de l'ensemble des organes floraux changés en sépales (Pelaz et al. 2000, Figure 49.A) alors que les organes floraux des plantes quadruple mutantes *sep1sep2sep3sep4* sont changés en feuilles (Ditta et al. 2004, Figure 49.B). Ces deux mutants ne produisent évidemment aucune graine. La totalité des plantes triple mutantes *sep1sep2sep3* obtenues et exprimant *PHYL1<sub>OR</sub>* (4/4 soit 100%) montre des phénotypes floraux similaires aux quadruple mutant et constitue une unique classe D. En effet, la présence de nombreux trichomes branchés sur les différents organes de ces plantes montre que les organes ressemblent davantage à des feuilles qu'à des sépales (Figure 49.C, flèches vertes). De plus, de nombreux bourgeons sont présents au niveau de chaque inflorescence, comme chez le quadruple mutant (Ditta et al., 2004) indiquant la perte d'identité du méristème floral. Chez les plantes triple mutantes sauvages, on trouve rarement des bourgeons, et pas plus de deux bourgeons par fleur alors que les triples mutants transformées en comportent au moins quatre par inflorescence (Figure 49.C, milieu et droite). Sur une plante, il est même observé des zones méristématiques affectées rappelant les phénotypes « chou-fleur » décrits dans les plantes 35S (Figure 49.C, flèches noires). Pour la première fois avec ce promoteur, les résultats attendus sont obtenus, ce qui pourrait suggérer que la quantité de SEPs versus la quantité de *PHYL1<sub>OR</sub>* était un des facteurs limitants les forts phénotypes chez les plantes précédemment observées. Dans une étude publiée par notre équipe, les niveaux d'expression de *SEP4* et *AP1* ont été mesurés et sont quatre fois plus importants chez le triple mutant *sep1sep2sep3* que chez la plante sauvage (Hugouvieux et al. 2018). Il est donc possible que l'expression accrue de ces gènes ainsi que d'autres gènes *SEPs* soit également présente dans les mutants utilisés ici (*sep3*, *sep1sep2* et *sep1sep2sep3+/-*). Cette expression accrue pourrait également expliquer les faibles phénotypes observés précédemment.



**Figure 49 : Phénotypes de plantes *sep1sep2sep3* exprimant *PHYL1<sub>oy</sub>* sous le contrôle du promoteur de *SEP3*.** (A) Plante triple mutante *sep1sep2sep3* (Pelaz et al. 2000). (B) Plante quadruple mutante *sep1sep2sep3sep4* (Ditta et al. 2004). (C) Phénotypes de plantes *sep1sep2sep3+/-* exprimant *PHYL1<sub>oy</sub>* sous le promoteur de *SEP3*. Les flèches vertes montrent des trichomes branchés caractéristiques des organes foliaires. La classe unique est annotée avec le pourcentage qu'elle représente sur la totalité des plantes transformées. Les échelles sont annotées en bas à droite ou à gauche de chaque image.

---

### En résumé

---

En Y2H, les MADS-TFs du FQM AP1, SEP1-4 et AG interagissent avec PHYL1<sub>0Y</sub> et les complexes dans lesquels ils sont présents sont donc susceptibles d'être dégradés dans la plante. En exprimant *PHYL1<sub>0Y</sub>* sous le contrôle de promoteurs spécifiques des MADS *AP1* et *SEP3*, nous avons pu reproduire des phénotypes caractéristiques des mutants *ap1* et *sep* indiquant la dégradation de ces complexes *in vivo* par l'interaction de PHYL1<sub>0Y</sub> avec AP1 et la famille des SEPs. Le niveau d'expression de *PHYL1<sub>0Y</sub>*, dû au promoteur choisi, et la redondance des SEPs peuvent être à l'origine des faibles phénotypes observés chez les simples et doubles mutants *sep*. Ces données montrent aussi que la première et la quatrième couronnes sont les plus sensibles à l'expression de *PHYL1<sub>0Y</sub>*. La quatrième couronne étant importante pour la fertilité des plantes, nous étudierons plus particulièrement l'interaction de PHYL1<sub>0Y</sub> avec le complexe de protéines MADS impliqué dans cette couronne.

## II. Caractérisation biochimique des complexes SEP3/AG/PHYL1<sub>0Y</sub> et SEP3/PHYL1<sub>0Y</sub>

### A. Identification du domaine d'interaction par Yeast-Two-Hybrid

D'après les observations des plantes exprimant *PHYL1<sub>0Y</sub>* sous différents promoteurs et les résultats de Y2H précédents, les MADS-TFs du FQM ciblés par *PHYL1<sub>0Y</sub>* sont les SEPs, AP1 et AG. L'une des couronnes les plus sensibles à l'expression de *PHYL1<sub>0Y</sub>* est la quatrième couronne qui est sous la dépendance du complexe SEP/AG. Nous avons donc choisi de caractériser l'interaction de *PHYL1<sub>0Y</sub>* avec l'hétérocomplexe SEP3/AG. Dans la littérature, il est observé *in vitro* et par Y2H que le domaine K de SEP3 et d'AP1 est nécessaire et suffisant pour l'interaction avec *PHYL1<sub>PnWB</sub>* et *SAP54* respectivement (MacLean et al. 2014; Kitazawa et al. 2017; Liao et al. 2019). J'ai donc cherché à valider l'importance du domaine K des MADS pour l'interaction avec *PHYL1<sub>0Y</sub>* avant de réaliser des analyses biochimiques plus poussées. Pour cela, une expérience de Y2H est réalisée en testant *PHYL1<sub>0Y</sub>* et SEP3 MIKC avec différents domaines de SEP3. Comme le montre la Figure 50, *PHYL1<sub>0Y</sub>* interagit avec la version FL (MIKC) de SEP3 et ses domaines MIK, IKC, KC et K (acides aminés 1-173 colonne 4, 59-252 colonne 5, 91-252 colonne 6 et 75-178 colonne 7 respectivement). Cela suggère que seul le domaine K de SEP3 est important pour l'interaction avec *PHYL1<sub>0Y</sub>*. Pour valider cette hypothèse, l'interaction de *PHYL1<sub>0Y</sub>* avec le variant d'épissage naturel de SEP3, SEP3<sup>[Δ161-174]</sup> qui comporte une délétion de 14 acides aminés dans la zone de tétramérisation de son domaine K, a été testée (Figure 50, colonne 8). Celui-ci interagit avec SEP3 MIKC mais pas avec *PHYL1<sub>0Y</sub>*. J'ai donc formulé l'hypothèse que *PHYL1<sub>0Y</sub>* interagit avec la zone de tétramérisation de SEP3.

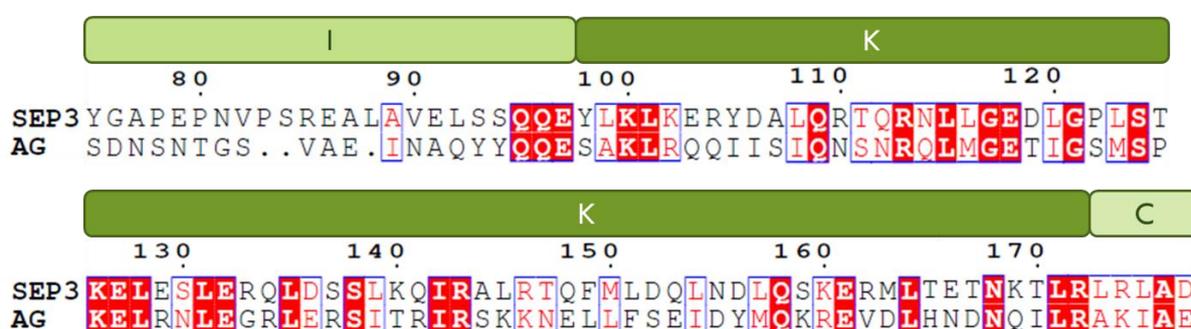
	1	2	3	4	5	6	7	8
pGBK\pGAD	pGAD	SEP3 MIKC	SEP3 MI	SEP3 MIK	SEP3 IKC	SEP3 KC	SEP3 K	SEP3 Δ
1 pGBK								
2 PHYL1 <sub>0Y</sub>		●●●●		●●●●	●●●●	●●●●	●●●●	
3 SEP3 MIKC		●●●●		●●●●	●●●●	●●●●	●●●●	●●●●

**Figure 50 : Etude de l'interaction des différents domaines de SEP3 avec SEP3MIKC et PHYL1<sub>0Y</sub> par Yeast-Two-Hybrid.** Les domaines MIKC, MI, MIK, IKC, K et Δ correspondent aux acides aminés 1-252, 1-90, 1-173, 59-252, 91-252, 75-178, 1-252 Δ 161-174 de SEP3 respectivement. La photographie est prise après 4 jours d'incubation.

## B. Caractérisation biochimique de l'interaction de PHYL1<sub>0Y</sub> avec le domaine K de SEP3/AG et SEP3

### 1. Purification de PHYL1<sub>0Y</sub> et des domaines K de SEP3/AG, de SEP3 et d'AG

Pour caractériser le complexe SEP3/AG/PHYL1<sub>0Y</sub>, des analyses sont également réalisées sur les constituants de ce complexe, les homocomplexes de SEP3 et d'AG, avec PHYL1<sub>0Y</sub>. Dans la mesure où PHYL1<sub>0Y</sub> interagit avec le domaine K de SEP3, j'ai supposé qu'il devrait interagir avec le même domaine chez AG, très semblable en termes de séquence secondaire (Figure 51).

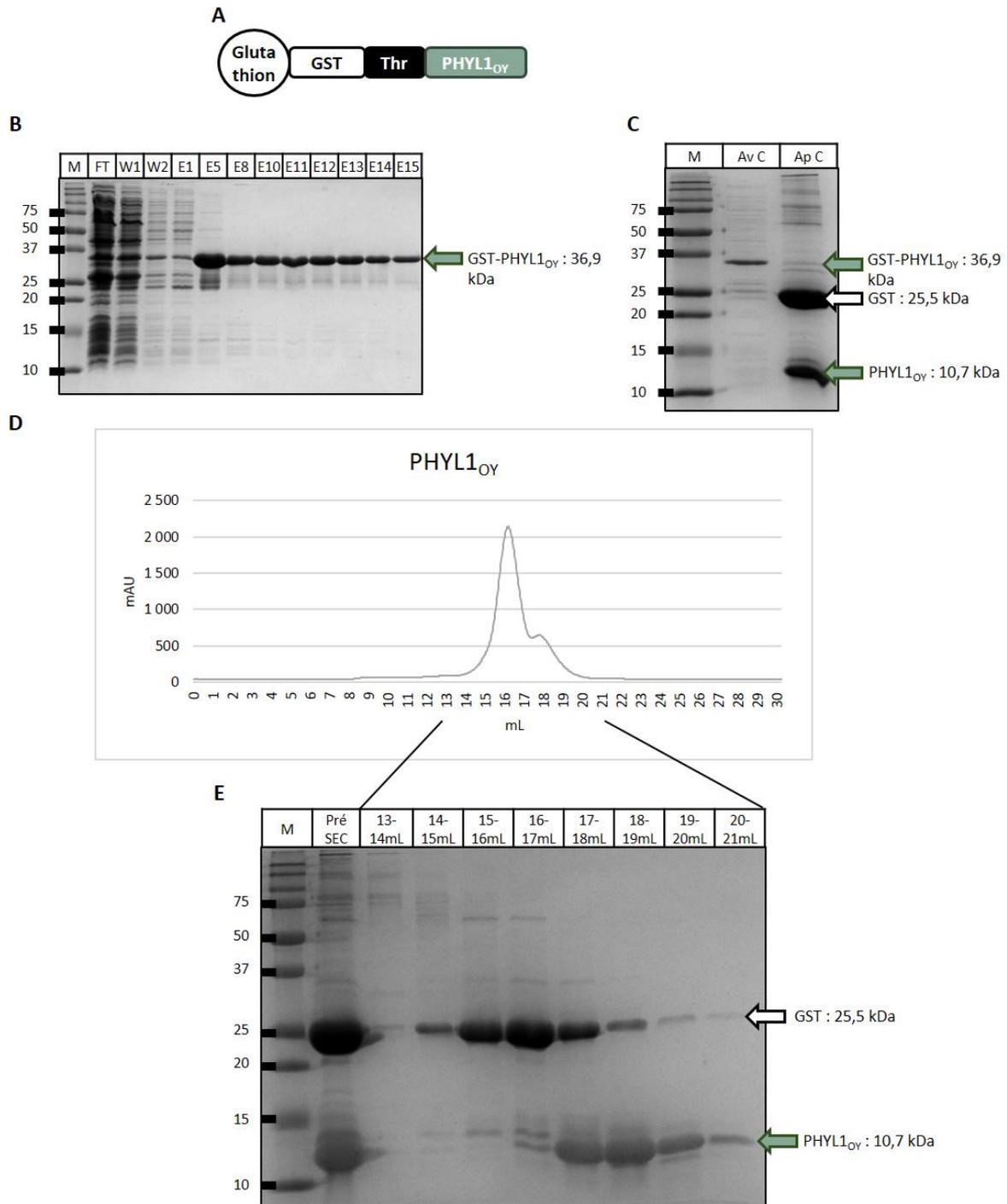


**Figure 51 : Alignement de séquences des domaines K purifiés de SEP3 et d'AG.** Les domaines I, K et C sont annotés.

Pour étudier les complexes SEP3/AG/PHYL1<sub>0Y</sub>, SEP3/PHYL1<sub>0Y</sub> et AG/PHYL1<sub>0Y</sub>, la protéine PHYL1<sub>0Y</sub> puis l'hétérocomplexe SEP3<sup>[75-178]</sup>/AG<sup>[90-189]</sup> ainsi que les complexes formés par le domaine K de SEP3<sup>[75-178]</sup> seul et par le domaine K d'AG<sup>[90-189]</sup> seul sont purifiés.

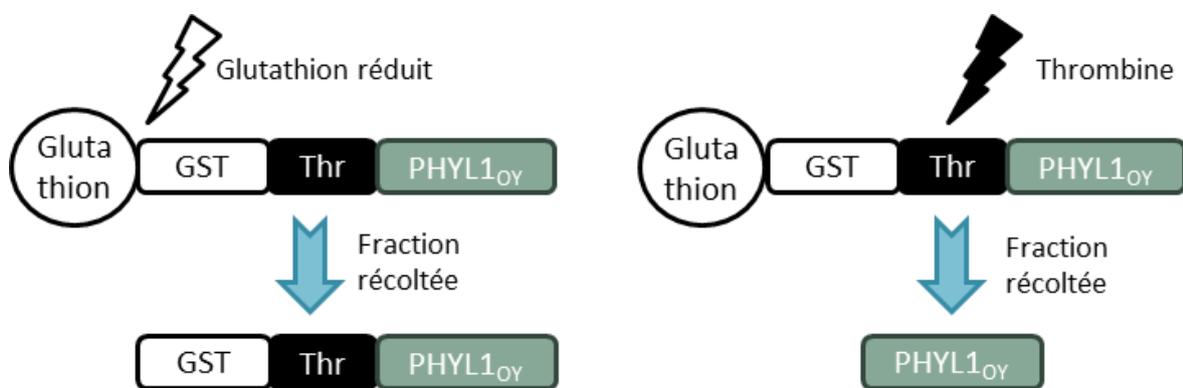
#### a. Purification de PHYL1<sub>0Y</sub>

Les premières purifications de PHYL1<sub>0Y</sub> sont réalisées par liaison du tag GST à de la résine de glutathion Sépharose comme détaillé dans la publication de nos collaborateurs (Iwabuchi et al. 2019) (Figure 52.A). De cette manière, une grande quantité de protéine GST-PHYL1<sub>0Y</sub> est éluee (Figure 52.B) et la protéine native est récoltée après le clivage très efficace du tag GST par la protéase thrombine (Figure 52.C). Un problème important rencontré dans cette purification survient lors de la séparation du tag GST clivé de la protéine native PHYL1<sub>0Y</sub>. En effet, même après plusieurs passages sur résine de glutathion Sépharose et purification en SEC, la quantité de protéine native non contaminée par le tag GST est très faible (Figure 52.D et E).



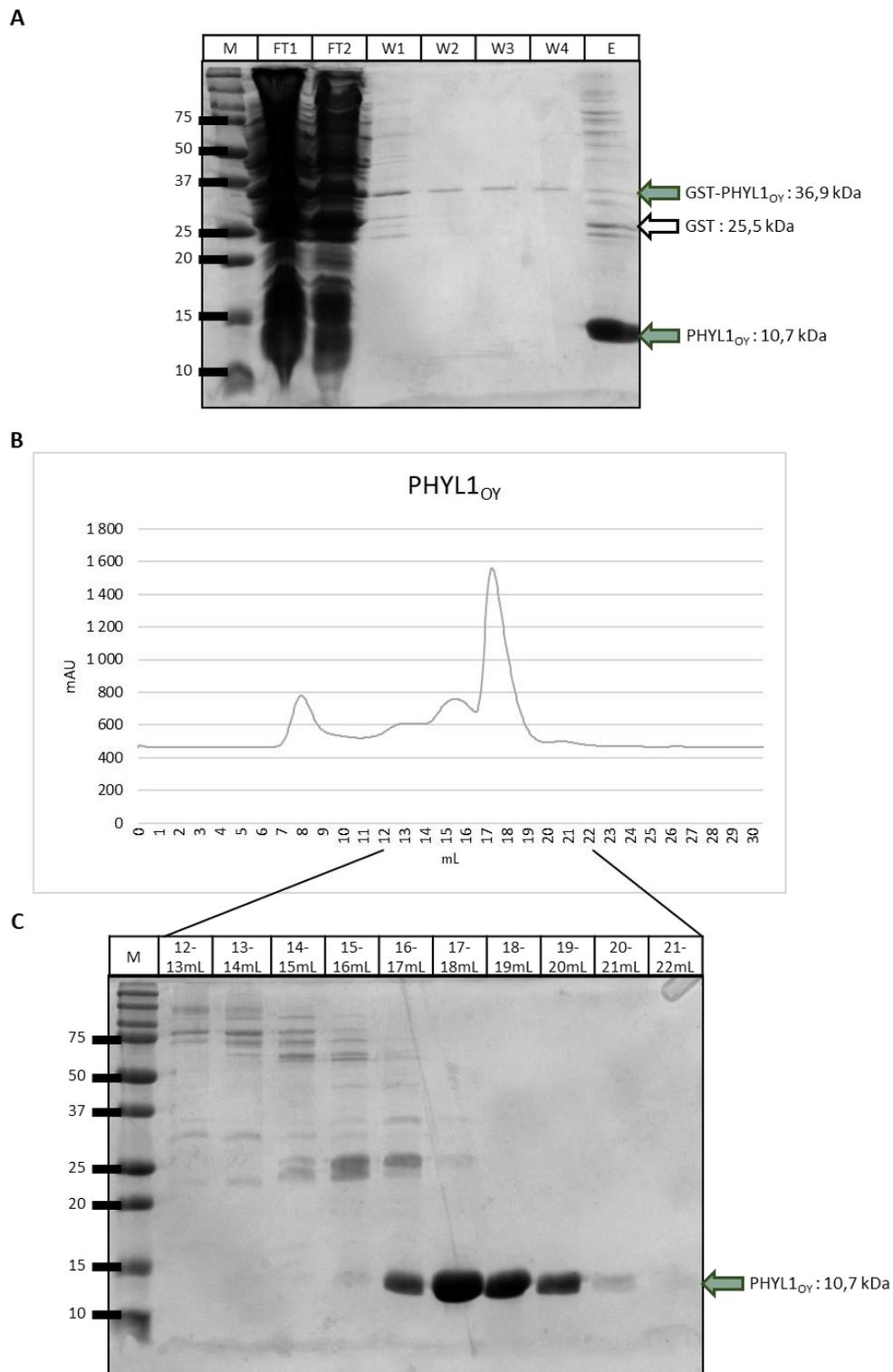
**Figure 52 : Suivi de PHYL1<sub>OY</sub> lors des différentes étapes de la purification sur colonne de glutathion Sépharose. (A)** Schéma de la liaison de la protéine exprimée GST-PHYL1<sub>OY</sub> à la résine de glutathion. Th : site de clivage par la protéase thrombine. **(B)** Gel SDS-PAGE d'acrylamide 15% des différentes fractions récoltées lors de la purification de GST-PHYL1<sub>OY</sub>. FT : flow through. W : lavage. E1-15 : fractions d'élution de 1mL chacune. **(C)** Gel SDS-PAGE d'acrylamide 15% avant et après clivage du tag GST de PHYL1<sub>OY</sub>. Av C : protéine avant clivage. Ap C : protéine après clivage. **(D)** Chromatogramme de la purification en SEC de PHYL1<sub>OY</sub>. **(E)** Gel SDS-PAGE d'acrylamide 15% des différentes fractions récoltées lors de la purification de PHYL1<sub>OY</sub> en SEC. Pré SEC : échantillon avant la purification en SEC. Les traits pleins noirs montrent les fractions (représentant les mL 13 à 21 de l'élution de SEC) analysées sur le gel. Sur l'ensemble des gels montrés, M signifie marqueur de poids moléculaires dont les poids sont annotés à gauche en kDa.

La purification est donc modifiée de la manière suivante : l'étape d'élution, dans laquelle du glutathion réduit est ajouté pour décrocher le tag GST de PHYL1<sub>OY</sub> de la résine de glutathion, est remplacée par une étape de clivage du tag sur la résine (Figure 53). Dans cette étape, la résine liée au tag GST de PHYL1<sub>OY</sub> est incubée à 4°C pendant 16h avec du tampon de clivage (tampon de lyse auquel est ajoutée la thrombine). Pendant cette incubation, la thrombine clive le site spécifique présent entre le tag GST et PHYL1<sub>OY</sub> ce qui libère PHYL1<sub>OY</sub> de son tag (Figure 53). La fraction éluée contient PHYL1<sub>OY</sub> alors que le tag GST reste lié à la résine de glutathion Sépharose (Figure 53 et Figure 54.A).



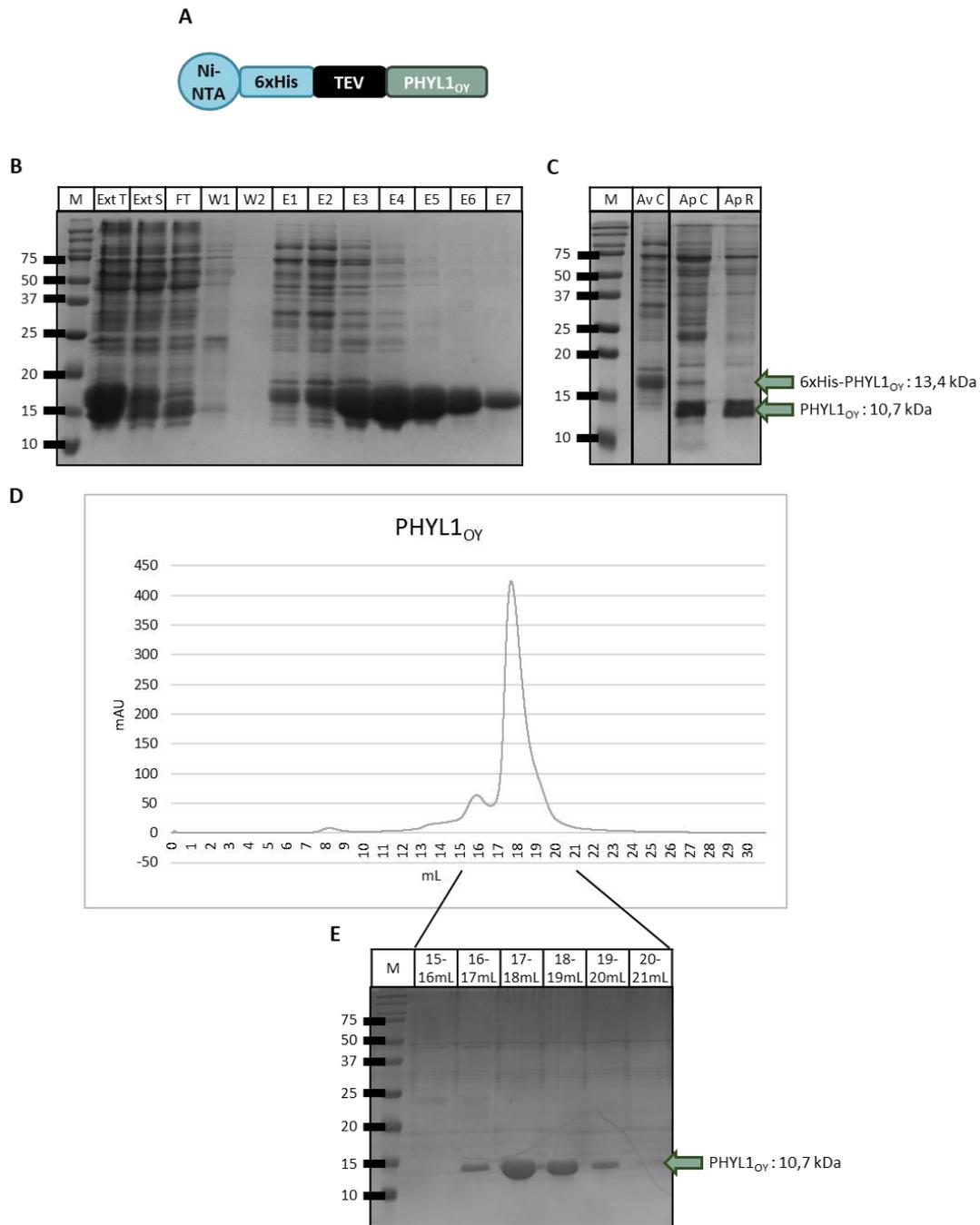
**Figure 53 : Schéma des deux types de purifications réalisées sur résine de Glutathion.** A gauche, l'ajout de Glutathion réduit va décrocher le tag GST lié à la résine et libérer la protéine taggée. A droite, l'ajout de thrombine va cliver au site de clivage et libérer la protéine de son tag. Ce dernier reste lié à la résine. Thr : site de clivage par la protéase thrombine.

Cette purification permet d'obtenir une quantité importante de PHYL1<sub>OY</sub> clivée (Figure 54.A). Après purification en SEC, les fractions contenant PHYL1<sub>OY</sub> clivée sans tag GST sont plus importantes que dans la purification précédente (Figure 54.B et C). En effet, pour six litres de culture bactérienne, 30mg de protéines pures et clivée sont obtenus soit 5mg/L de culture bactérienne. La masse théorique de PHYL1<sub>OY</sub> est estimée à 10,7kDa et son élution à 17,8mL suggère une masse inférieure à 13,7kDa en solution d'après la notice du constructeur. Ceci indique que PHYL1<sub>OY</sub> semble être sous forme monomérique en solution et que la protéine ne semble pas interagir avec elle-même. La structure caractérisée de PHYL1<sub>OY</sub> montre un tétramère mais les expériences de Y2H montrent que PHYL1<sub>OY</sub> n'interagit pas avec elle-même, ce qui suggère une forte compaction des quatre protéines PHYL1<sub>OY</sub> plus qu'une réelle interaction (Iwabuchi et al. 2019).



**Figure 54 : Suivi de PHYL1<sub>OY</sub> lors des différentes étapes de la purification « en clivage sur colonne » sur colonne de glutathion Sépharose. (A) Gel SDS-PAGE d'acrylamide 15% des différentes fractions récoltées lors de la purification de GST-PHYL1<sub>OY</sub>. FT1 et 2 : flow through passé sur la résine deux fois. W1-4 : lavages 1 à 4. E : fraction de 10mL éluée après clivage sur colonne. (B) Chromatogramme de la purification en SEC de PHYL1<sub>OY</sub>. (C) Gel SDS-PAGE d'acrylamide 15% des différentes fractions récoltées lors de la purification de PHYL1<sub>OY</sub> en SEC. Les traits pleins noirs montrent les fractions analysées sur le gel (représentant les mL 13 à 21 de l'élué de SEC). Sur l'ensemble des gels montrés, M signifie marqueur de poids moléculaires dont les poids sont annotés à gauche en kDa.**

La protéine pure et clivée obtenue permet de réaliser les premières analyses des complexes formés avec les MADS mais des problèmes récurrents d'activité de différents lots de thrombine sont rencontrés et réduisent grandement l'efficacité du clivage et donc le rendement de protéines finales. Cette purification est donc remplacée par la purification sur résine de nickel Sépharose de PHYL1<sub>0Y</sub> taggée en N terminal avec 6xHis et comportant un site de clivage à la protéase TEV. La séquence du gène de *PHYL1<sub>0Y</sub>* a été clonée dans le vecteur pESPRIT2 et la protéine produite se lie à la résine de nickel Sépharose par son tag 6xHis (Figure 55.A). Une quantité importante de protéines est purifiée et éluée par ajout de 250mM d'imidazole (Figure 55.B). Le tag 6xHis est ensuite clivé très efficacement par ajout de protéase TEV et cette fraction clivée est ensuite passée sur résine de nickel Sépharose pour retenir le tag 6xHis clivé, la protéine 6xHis-PHYL1<sub>0Y</sub> résiduelle et la protéase TEV elle-même taggée 6xHis (Figure 55.C). La fraction récoltée contenant la protéine clivée presque pure, est purifiée en SEC (Figure 55.D et E) et les fractions les plus pures sont conservées (fractions 16 à 20mL, Figure 55.D et E). La purification par résine de nickel Sépharose de PHYL1<sub>0Y</sub> montre un rendement de 3,3mg/L de culture bactérienne. Cette méthode de purification est donc gardée pour la production de protéine PHYL1<sub>0Y</sub> pure car elle permet d'éviter la rétention du tag dans les fractions finales et la protéase TEV semble plus stable que la thrombine et clive très efficacement les tags.

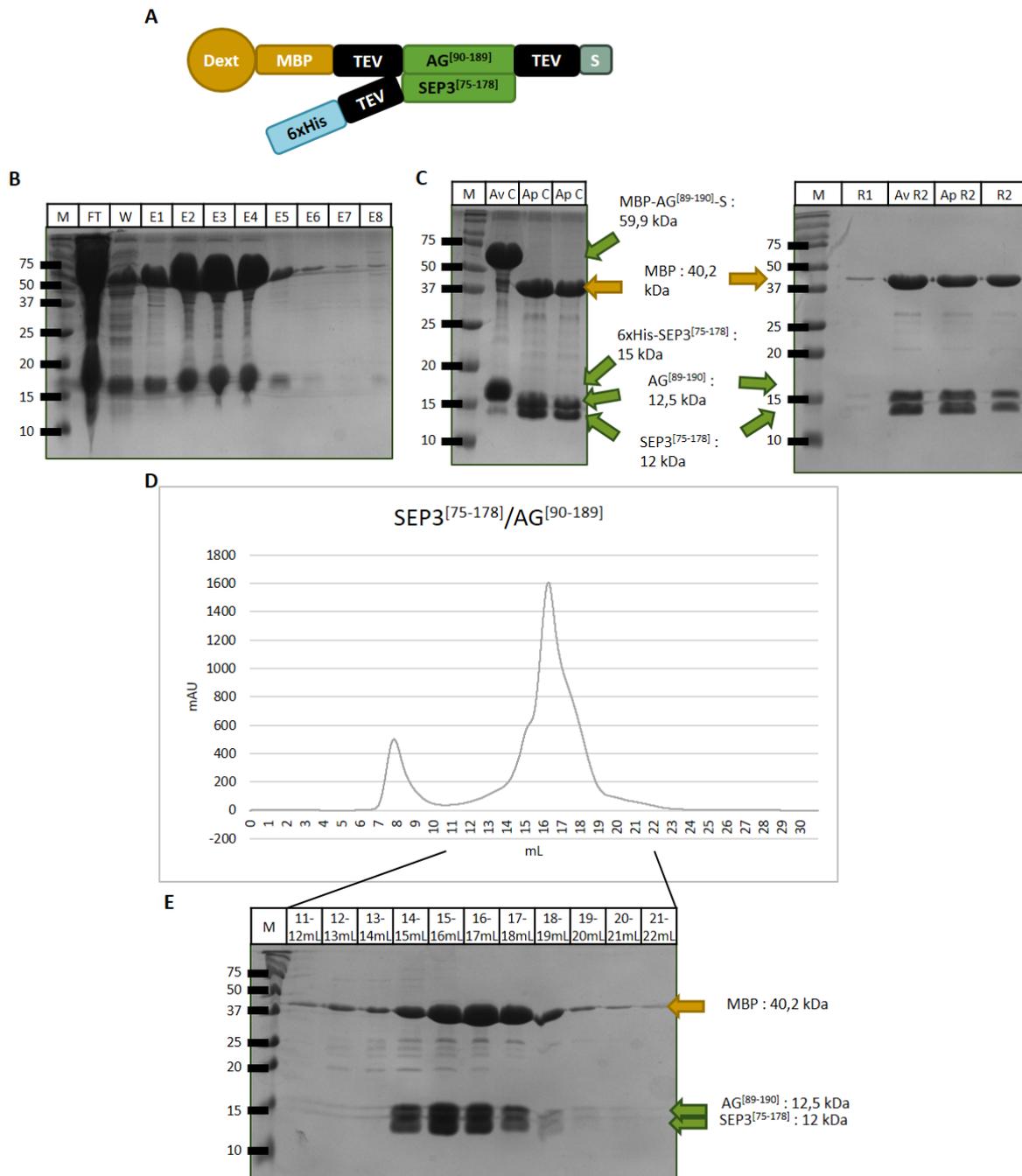


**Figure 55 : Suivi de PHYL1<sub>OY</sub> lors des différentes étapes de la purification sur colonne de nickel Sépharose. (A)** Schéma de la liaison de la protéine exprimée 6xHis-PHYL1<sub>OY</sub> à la résine de nickel Sépharose. TEV : site de clivage par la protéase TEV. **(B)** Gel SDS-PAGE d'acrylamide 15% des différentes fractions récoltées lors de la purification de 6xHis-PHYL1<sub>OY</sub>. Ext T : extrait bactérien total. Ext S : extrait bactérien soluble. FT : flow through. W1 et 2 : lavages 1 et 2. E1-17 : fractions d'élution de 1mL chacune. **(C)** Gel SDS-PAGE d'acrylamide 15% avant et après clivage du tag 6xHis de PHYL1<sub>OY</sub> et après passage sur résine de nickel Sépharose. Av C : protéine avant clivage. Ap C : protéine après clivage. Ap R : protéine après passage sur résine de nickel Sépharose. **(D)** Chromatogramme de la purification en SEC de PHYL1<sub>OY</sub>. **(E)** Gel SDS-PAGE d'acrylamide 15% des différentes fractions récoltées lors de la purification de PHYL1<sub>OY</sub> en SEC. Les traits pleins noirs montrent les fractions analysées sur le gel (représentant les mL 15 à 21 de l'élution de SEC). Les traits noirs montrent que le deuxième puit ne provient pas du même gel que les autres puits. Sur l'ensemble des gels montrés, M signifie marqueur de poids moléculaires dont les poids sont annotés à gauche en kDa.

## b. Purification du domaine K de SEP3/AG

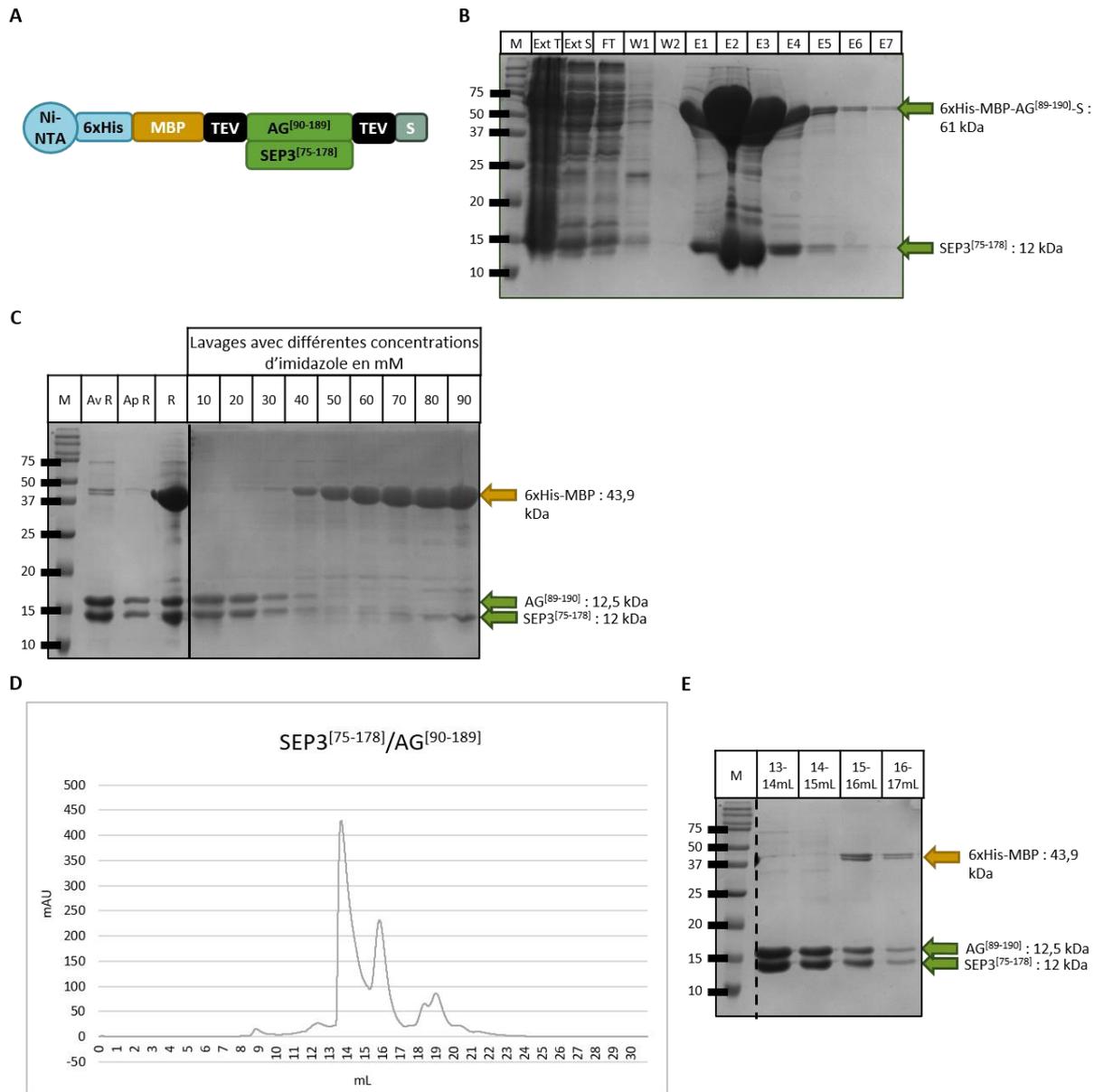
La purification d'un hétérocomplexe recombinant de MADS n'a jamais été réalisée à notre connaissance. Pour réaliser cette purification, les séquences de SEP3<sup>[75-178]</sup> et d'AG<sup>[90-189]</sup> sont amplifiées et insérées dans le vecteur pETDuet-1 qui permet la co-expression simultanée de deux gènes. Des tags sont ajoutés à ces deux gènes afin de pouvoir les purifier : un tag 6xHis suivi d'un site de clivage à la TEV en N-terminal de SEP3<sup>[75-178]</sup> et un tag MBP suivi d'un site de clivage à la TEV en N-terminal d'AG<sup>[90-189]</sup>. Il est important de noter qu'un tag S est présent dans le vecteur et qu'il se trouve en C-terminal d'AG<sup>[90-189]</sup> dans notre construction. Un site de clivage à la TEV est ajouté afin de pouvoir éliminer ce tag après la purification si besoin. Le tag MBP d'AG<sup>[90-189]</sup> est inséré afin d'améliorer sa solubilité. Le premier essai de purification de l'hétérocomplexe SEP3<sup>[75-178]</sup>/AG<sup>[90-189]</sup> est réalisé en liant le tag 6xHis de SEP3<sup>[75-178]</sup> à la résine de nickel Sépharose. Cette purification montre un mélange entre de l'homodimère SEP3<sup>[75-178]</sup>/SEP3<sup>[75-178]</sup> et de l'hétérodimère SEP3<sup>[75-178]</sup>/AG<sup>[90-189]</sup> difficilement séparables et n'est pas poursuivie (non montré).

Ce même complexe est donc purifié en utilisant une résine de dextrine Sépharose liant le tag MBP de AG<sup>[90-189]</sup> (Figure 56.A). L'élution de la purification semble contenir assez peu de protéines surtout trouvées dans les éluions 2, 3 et 4 (Figure 56.B). Le clivage des tags est efficace et montre une équimolarité des deux composants du complexe SEP3<sup>[75-178]</sup> et AG<sup>[90-189]</sup> suggérant que seul l'hétérocomplexe est purifié (Figure 56.C). Cependant, il est très difficile d'éliminer le tag MBP de l'hétérocomplexe élué, même après deux passages sur résine de dextrine et purification en SEC (Figure 56.C, D et E). On peut toutefois noter que le maximum d'élution de l'hétérocomplexe (15-16mL, Figure 56.C, D et E) est atteint légèrement plus tôt que celui de la MBP en SEC (16-17mL, Figure 56.C, D et E) ce qui suggère que sa masse est légèrement plus importante. Sa masse serait donc supérieure à 40,2kDa et pourrait être un hétérotétramère de 49kDa. Ce problème de contamination de tag ressemble beaucoup à celui que j'ai rencontré lors de la première purification de GST-PHYL1<sub>0Y</sub>.



**Figure 56 : Purification de l'hétérocomplexe SEP3<sup>[75-178]</sup>/AG<sup>[90-189]</sup> sur résine de dextrine Sépharose.** **(A)** Schéma de la liaison de l'hétérocomplexe 6xHis-SEP3<sup>[75-178]</sup>/MBP-AG<sup>[90-189]</sup>-S à la résine de dextrine. TEV : site de clivage par la protéase TEV. **(B)** Gel SDS-PAGE d'acrylamide 15% des différentes fractions récoltées lors de la purification de 6xHis-SEP3<sup>[75-178]</sup>/MBP-AG<sup>[90-189]</sup>-S. FT : flow through. W : lavage. E1-8 : fractions d'élué de 1mL chacune. **(C)** Gels SDS-PAGE d'acrylamide 15% avant et après clivage des tags (à gauche) et après passage sur résine de nickel Sépharose (à droite). Av C : protéine avant clivage. Ap C : protéine après clivage. R1 et 2 : protéines liées après les premier et deuxième passages sur résine respectivement. Av R2 : protéines avant le deuxième passage sur la résine. Ap R2 : protéines après le deuxième passage sur la résine. **(D)** Chromatogramme de la purification en SEC de SEP3<sup>[75-178]</sup>/AG<sup>[90-189]</sup>. **(E)** Gel SDS-PAGE d'acrylamide 15% des différentes fractions récoltées lors de la purification de SEP3<sup>[75-178]</sup>/AG<sup>[90-189]</sup> en SEC. Les traits pleins noirs montrent les fractions analysées sur le gel (représentant les mL 11 à 22 de l'élué de SEC). Sur l'ensemble des gels montrés, M signifie marqueur de poids moléculaires dont les poids sont annotés à gauche en kDa.

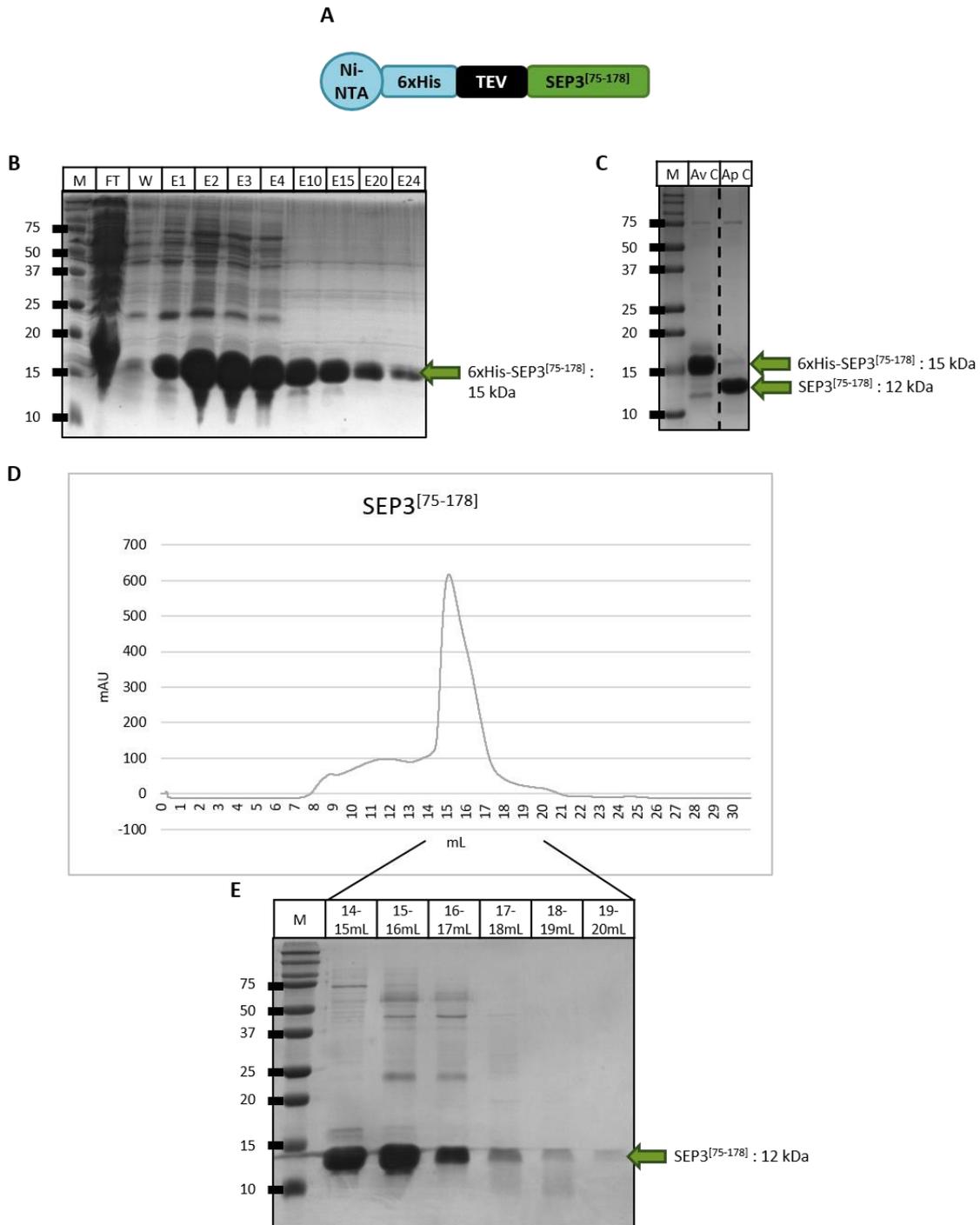
La troisième stratégie qui s'est avérée fructueuse est la suivante : un tag 6xHis en N-terminal du tag MBP d'AG<sup>[90-189]</sup> est ajouté et le tag 6xHis de SEP3 est enlevé (Figure 57.A). Ainsi l'hétérocomplexe est purifié par passage sur colonne de nickel Sépharose et il est plus facile d'éliminer le tag 6xHis-MBP en repassant les protéines clivées sur résine de nickel Sépharose. Cette nouvelle purification montre une quantité d'hétérocomplexe purifié supérieure à la purification précédente (Figure 57.B). Le clivage n'est pas détaillé ici car très semblable aux clivages vus précédemment. Les fractions clivées sont passées sur résine de nickel Sépharose et montrent une rétention du tag très importante mais aussi d'une grande quantité de protéines (Figure 57.C gauche). J'ai donc réalisé des lavages de 2mL avec des concentrations croissantes en imidazole (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 et 90mM) (Figure 57.C droite). Les deux premiers lavages sont ajoutés à la fraction récoltée (notée Ap R sur la Figure 57.C) car ils contiennent une grande quantité de protéines clivées et très peu de tag 6xHis-MBP contrairement aux fractions suivantes (Figure 57.C droite). La fraction contenant l'hétérocomplexe est ensuite purifiée en SEC et on obtient un pic distinct élué à 13,7mL contenant l'hétérocomplexe (Figure 57.D et E). Sur cette purification en SEC, il semble que toutes les fractions aient été éluées 1mL plus tôt que lors de la précédente purification (Figure 57.D et E). En effet, on peut noter que le maximum d'élution du tag 6xHis-MBP est à 15,6mL et non 16-17mL comme vu précédemment (Figure 56.D et E). On peut donc supposer qu'une élution habituelle de l'hétérocomplexe serait à 14,7mL et correspondrait donc à une masse équivalente à celle vue précédemment (Figure 56.D et E), donc à un hétérotétramère. Le pic de l'hétérocomplexe observé est légèrement asymétrique et montre aussi un léger « épaulement » sur sa droite. Ce genre d'épaulement a déjà été observé lors de la purification de SEP3<sup>[75-178]</sup> en SEC (Puranik et al. 2014) et correspond à un dimère de SEP3<sup>[75-178]</sup>. Il est donc possible que SEP3<sup>[75-178]</sup>/AG<sup>[90-189]</sup> soit en équilibre entre une forme tétramérique majoritaire et une forme dimérique. Finalement, les fractions correspondant aux mL 13 à 15 sont conservées. Le rendement de cette purification est proche de celui de la purification conservée de PHYL1<sub>ov</sub> sur résine de nickel Sépharose avec environ 3mg/L de culture bactérienne.



**Figure 57 : Purification de l'hétérocomplexe SEP3<sup>[75-178]</sup>/AG<sup>[90-189]</sup> sur résine de nickel Sépharose. (A)** Schéma de la liaison de l'hétérocomplexe SEP3<sup>[75-178]</sup>/6xHis-MBP-AG<sup>[90-189]</sup>-S à la résine de nickel Sépharose. TEV : site de clivage par la protéase TEV. **(B)** Gel SDS-PAGE d'acrylamide 15% des différentes fractions récoltées lors de la purification de SEP3<sup>[75-178]</sup>/6xHis-MBP-AG<sup>[90-189]</sup>-S. Ext T : extrait bactérien total. Ext S : extrait bactérien soluble. FT : flow through. W1 et 2 : lavages 1 et 2. E1-7 : fractions d'élution de 1mL chacune. **(C)** Gel SDS-PAGE d'acrylamide 15% avant et après passage sur résine et après lavage de la résine. Av R : protéines avant passage sur résine. Ap R : protéines après passage sur résine. R : protéines liées après le passage sur résine. WxmM : lavage avec une concentration de xmM d'imidazole. Le trait plein montre la séparation entre deux gels différents. **(D)** Chromatogramme de la purification en SEC de SEP3<sup>[75-178]</sup>/AG<sup>[90-189]</sup>. **(E)** Gel SDS-PAGE d'acrylamide 15% des différentes fractions récoltées lors de la purification de SEP3<sup>[75-178]</sup>/AG<sup>[90-189]</sup> en SEC. Le trait pointillé montre une coupure réalisée sur le gel. Sur l'ensemble des gels montrés, M signifie marqueur de poids moléculaires dont les poids sont annotés à gauche en kDa.

### c. Purification du domaine K de SEP3

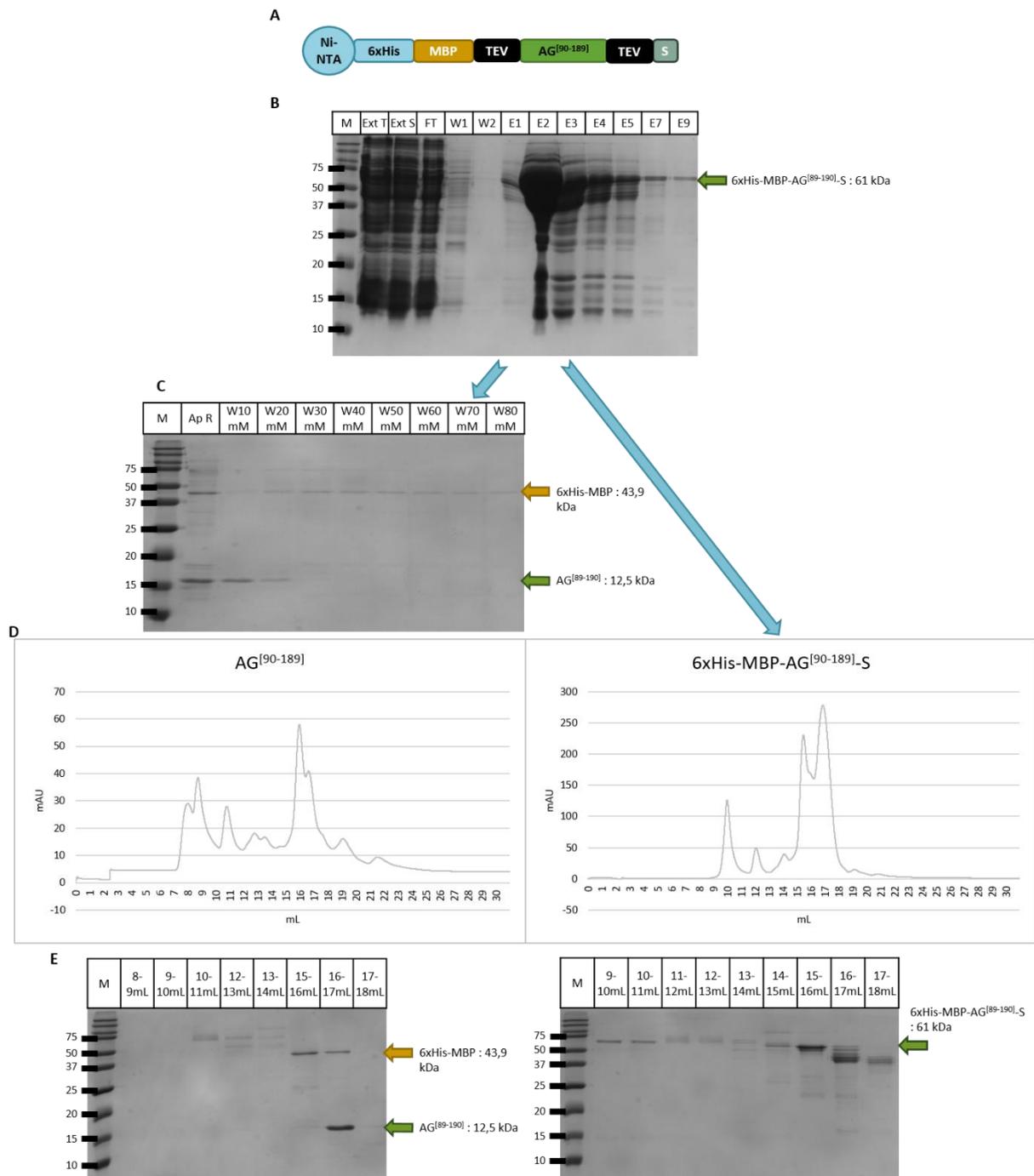
La construction de SEP3<sup>[75-178]</sup> dans le vecteur pESPRIT2 était déjà disponible au laboratoire et les conditions de purification de SEP3<sup>[75-178]</sup> avaient déjà été mises au point au laboratoire ; le protocole établi est donc suivi (Puranik et al. 2014). La purification liant le tag 6xHis de SEP3<sup>[75-178]</sup> à la résine de nickel Sépharose (Figure 58.A) permet d'obtenir une grande quantité de complexe 6xHis-SEP3<sup>[75-178]</sup> (Figure 58.B). Le clivage du tag de la protéine est réalisé par ajout de protéase TEV et montre une grande efficacité (Figure 58.C). Cette fraction clivée est ensuite passée sur résine de nickel Sépharose pour retenir le tag 6xHis clivé et la protéine 6xHis-SEP3<sup>[75-178]</sup> résiduelle. La fraction éluée contenant la protéine clivée presque pure, est purifiée en SEC (Figure 58.D) et les fractions les plus pures sont conservées (Figure 58.E, fractions 14 à 17mL). La purification est réalisée à partir de six litres de culture bactérienne et permet d'obtenir 70mg de SEP3<sup>[75-178]</sup> soit environ 11,7mg/L de culture bactérienne. La masse théorique de SEP3<sup>[75-178]</sup> est estimée à 12kDa et son élution à 14,7mL suggère une masse légèrement supérieure à 44kDa en solution d'après la notice du constructeur. Ceci indique que SEP3<sup>[75-178]</sup> semble être sous forme majoritairement tétramérique en solution comme le montre la structure caractérisée de ce domaine de SEP3 (Puranik et al. 2014). Cependant, le pic observé est légèrement asymétrique et montre un « épaulement » sur sa droite. Comme dit précédemment, cet épaulement correspond à un dimère de SEP3<sup>[75-178]</sup> (Puranik et al. 2014). Comme SEP3<sup>[75-178]</sup>/AG<sup>[90-189]</sup>, SEP3<sup>[75-178]</sup> semble être sous deux formes en équilibre en solution : une forme tétramérique largement prédominante et une forme dimérique (Puranik et al. 2014).



**Figure 58 : Suivi de SEP3<sup>[75-178]</sup> lors des différentes étapes de la purification. (A)** Schéma de la liaison de la protéine exprimée 6xHis-SEP3<sup>[75-178]</sup> à la résine de nickel Sépharose. TEV : site de clivage par la protéase TEV. **(B)** Gel SDS-PAGE d'acrylamide 15% des différentes fractions récoltées lors de la purification de 6xHis-SEP3<sup>[75-178]</sup> sur résine de nickel Sépharose. FT : flow through. W : lavage. E1-24 : fractions d'élution de 1mL chacune. **(C)** Gel SDS-PAGE d'acrylamide 15% avant et après clivage du tag 6xHis de SEP3<sup>[75-178]</sup>. Av C : protéine avant clivage. Ap C : protéine après clivage. Le trait pointillé montre une coupure réalisée sur l'image du gel. **(D)** Courbe de la purification en SEC de SEP3<sup>[75-178]</sup>. **(E)** Gel SDS-PAGE d'acrylamide 15% des différentes fractions récoltées lors de la purification de SEP3<sup>[75-178]</sup> en SEC. Les traits pleins noirs montrent les fractions analysées sur le gel (représentant les mL 14 à 20 de l'élution de SEC). Sur l'ensemble des gels montrés, M signifie marqueur de poids moléculaires dont les poids sont annotés à gauche en kDa.

#### d. Purification du domaine K d'AG

Pour purifier la protéine 6xHis-MBP-AG<sup>[90-189]</sup>-S seule et ainsi obtenir un complexe AG<sup>[90-189]</sup> seul, la séquence de SEP3<sup>[75-178]</sup> est retirée du vecteur utilisé pour la purification de l'hétérocomplexe SEP3<sup>[75-178]</sup>/AG<sup>[90-189]</sup> sur résine de nickel Sépharose. Le principe de purification est donc le même que pour l'hétérocomplexe précédent (Figure 59.A). De même que précédemment, une grande quantité de complexe d'AG<sup>[90-189]</sup> se trouve dans les fractions d'élutions E2 et E3 (Figure 59.B). La purification d'AG<sup>[90-189]</sup> avait déjà été tentée avant mon arrivée au laboratoire et avait présenté des problèmes de précipitation. J'ai donc décidé de séparer les fractions éluées en deux lots égaux, un avec de la TEV afin de cliver les tags et un autre sans protéase pour conserver les tags et améliorer sa solubilité. Après clivage des tags, une grande partie de la protéine AG<sup>[90-189]</sup> précipite et une très faible quantité de protéines est obtenue après passage sur résine de nickel Sépharose (Figure 59.C). De même que pour la purification de l'hétérocomplexe, différents lavages sont réalisés afin de décrocher la protéine AG<sup>[90-189]</sup> restée sur la résine et seul le premier lavage est conservé (Figure 59.C). Les deux lots ainsi formés (AG<sup>[90-189]</sup> clivée et 6xHis-MBP-AG<sup>[90-189]</sup>-S dialysée) ont été purifiés en SEC et les différentes fractions récoltées analysées sur gels (Figure 59.D et E). La protéine clivée AG<sup>[90-189]</sup> est présente en trop faible quantité après la purification en SEC et contaminée par le tag 6xHis-MBP ce qui ne permet pas de l'utiliser pour l'analyse de complexe avec PHYL1<sub>OR</sub> (Figure 59.D et E gauche). En revanche, une quantité faible mais suffisante de protéines 6xHis-MBP-AG<sup>[90-189]</sup>-S est obtenue pure (Figure 59.D et E droite, fraction 15-16mL) et peut être utilisée pour ces analyses. Le rendement de la purification de 6xHis-MBP-AG<sup>[90-189]</sup>-S est d'environ 0,155mg/L de culture bactérienne. Ce très faible rendement montre que même la version taggée de la protéine n'est pas stable en solution comme le suggère la présence de cette protéine agrégée dans la purification en SEC (Figure 59.D et E droite, fractions 9 à 11mL). L'élution de la protéine AG taggée entre 15 et 16mL suggère une masse entre 40 et 50kDa. Ce résultat n'est pas cohérent avec la masse théorique de cette protéine taggée qui est de 61kDa. Il est donc possible que cette protéine soit une contamination.



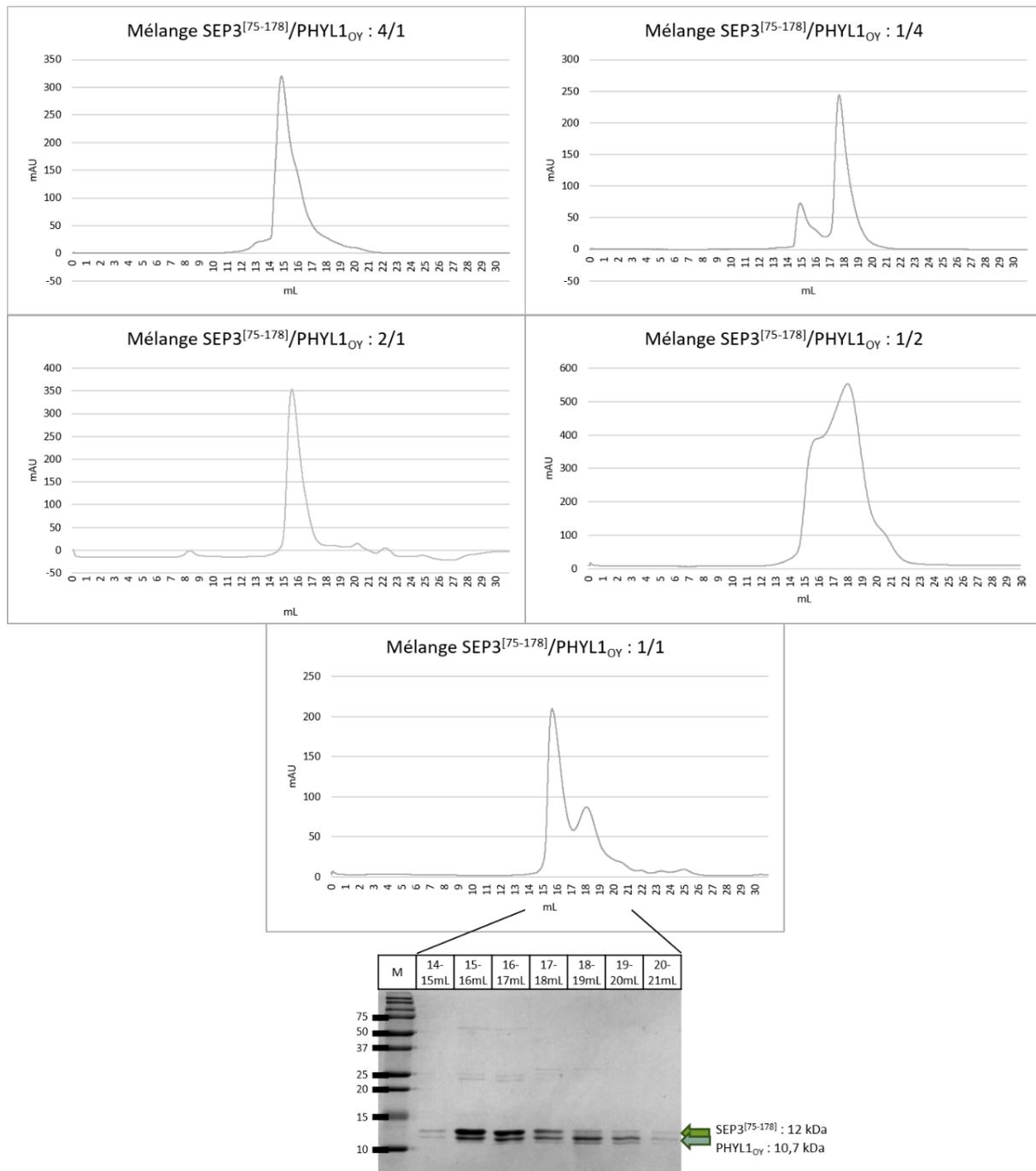
**Figure 59 : Purification de 6xHis-MBP-AG<sup>[90-189]</sup>-S sur résine de nickel Sépharose. (A)** Schéma de la liaison de 6xHis-MBP-AG<sup>[90-189]</sup>-S à la résine de nickel Sépharose. TEV : site de clivage par la protéase TEV. **(B)** Gel SDS-PAGE d'acrylamide 15% des différentes fractions récoltées lors de la purification de 6xHis-MBP-AG<sup>[90-189]</sup>-S. Ext T : extrait bactérien total. Ext S : extrait bactérien soluble. FT : flow through. W1 et 2 : lavages 1 et 2. E1-9 : fractions d'éluion de 1mL chacune. **(C)** Gel SDS-PAGE d'acrylamide 15% après passage sur résine et après lavage de la résine. Ap R : protéines après passage sur résine. WxmM : lavage avec une concentration de xmM d'imidazole. **(D)** Chromatogrammes de la purification en SEC de AG<sup>[90-189]</sup> (gauche) et 6xHis-MBP-AG<sup>[90-189]</sup>-S (droite). **(E)** Gel SDS-PAGE d'acrylamide 15% des différentes fractions récoltées lors de la purification de AG<sup>[90-189]</sup> (gauche) et 6xHis-MBP-AG<sup>[90-189]</sup>-S (droite) en SEC. Sur l'ensemble des gels montrés, M signifie marqueur de poids moléculaires dont les poids sont annotés à gauche en kDa.

## 2. Stœchiométrie des complexes formés entre MADS et PHYL1<sub>OY</sub>

### a. Purification des complexes formés en SEC et détermination approximative de la stœchiométrie

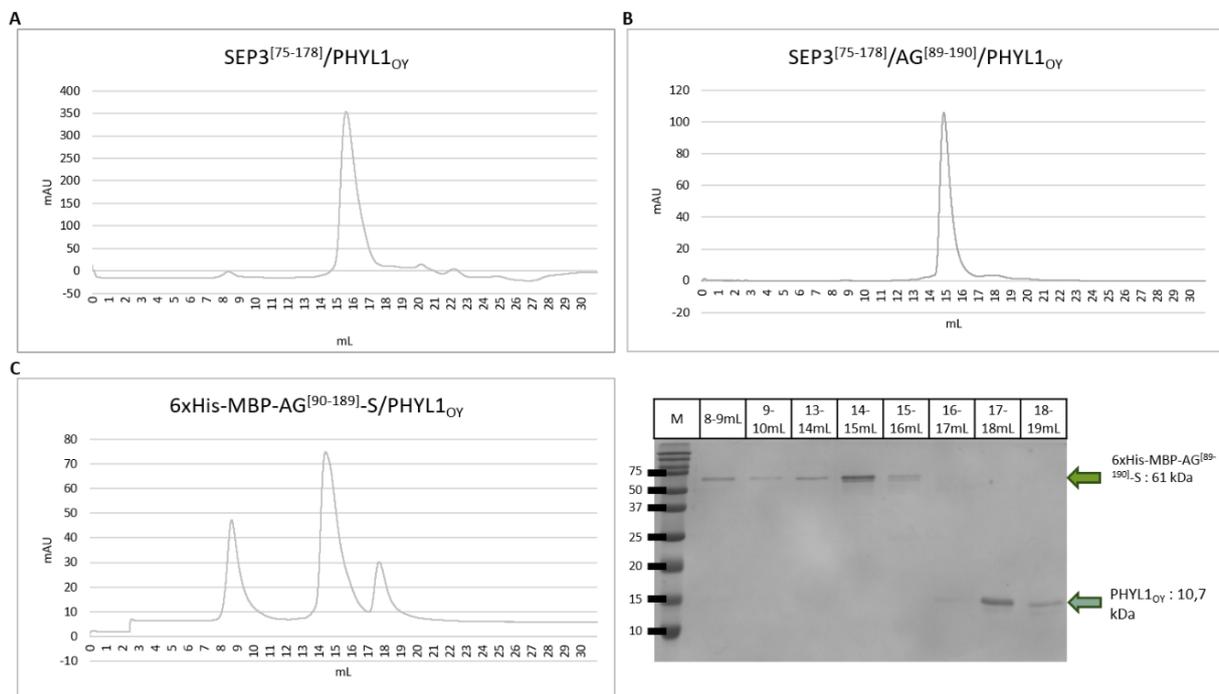
Pour déterminer la stœchiométrie des complexes formés entre MADS et PHYL1<sub>OY</sub>, le complexe SEP3<sup>[75-178]</sup>/PHYL1<sub>OY</sub> est étudié car il est plus facile d'obtenir de la protéine SEP3<sup>[75-178]</sup> que des autres complexes de protéines MADS (rendement par litre de culture bactérienne de 11,7mg/mL contre 0,155mg/mL pour AG<sup>[90-189]</sup> taggée et 3mg/mL pour SEP3<sup>[75-178]</sup>/AG<sup>[90-189]</sup>). Des mélanges de SEP3<sup>[75-178]</sup>/PHYL1<sub>OY</sub> avec différents ratios (4/1, 2/1, 1/1, 1/2 et 1/4) sont réalisées puis purifiés en SEC (Figure 60). Le chromatogramme du mélange SEP3<sup>[75-178]</sup>/PHYL1<sub>OY</sub> 4/1 montre la présence d'un seul pic asymétrique à 15mL (Figure 60 haut gauche). Ceci nous montre que la totalité de PHYL1<sub>OY</sub> est consommée dans le complexe et que le complexe se forme mais ne nous renseigne pas sur la quantité de SEP3<sup>[75-178]</sup> nécessaire pour former le complexe. Ce pic est atteint au même volume qu'un homocomplexe de SEP3<sup>[75-178]</sup> et semble englober un second pic plus faible vers 16mL. Il ne semble donc pas pertinent d'utiliser SEP3<sup>[75-178]</sup> comme facteur excédentaire puisqu'il est impossible de discerner l'homocomplexe de SEP3<sup>[75-178]</sup> et l'hétérocomplexe formé. Inversement, le chromatogramme du mélange SEP3<sup>[75-178]</sup>/PHYL1<sub>OY</sub> 1/4 montre la présence de deux pics : un pic de faible intensité à 15mL correspondant sûrement au complexe et un pic à 18mL correspondant à un excès de PHYL1<sub>OY</sub> (Figure 60 haut droite). Ceci nous montre que la totalité de SEP3<sup>[75-178]</sup> est consommée dans le complexe mais ne nous renseigne pas sur la quantité de PHYL1<sub>OY</sub> nécessaire pour former le complexe. Un mélange SEP3<sup>[75-178]</sup>/PHYL1<sub>OY</sub> 2/1 est ensuite réalisé et montre le même profil que le mélange 4/1 à la différence que le pic est symétrique et pourrait correspondre à un complexe totalement formé (Figure 60 milieu gauche). Le chromatogramme du mélange SEP3<sup>[75-178]</sup>/PHYL1<sub>OY</sub> 1/2 montre un profil similaire au mélange 1/4 avec deux pics à 15 et 18 mL (Figure 60 milieu droite). Pour finir, un mélange équimolaire est réalisé et montre également la présence de deux pics à 15 et 18mL (Figure 60 bas). Ceci confirme le fait que PHYL1<sub>OY</sub> n'est pas limitant dans la formation de complexe dans nos conditions et que ce complexe est réalisé pour un mélange 4/1 ou 2/1. Le gel des fractions collectées montre que le pic à 15mL contient les deux protéines et que SEP3<sup>[75-178]</sup> semble être deux fois plus abondante que PHYL1<sub>OY</sub> (Figure 60 bas). Les fractions correspondant au pic à 18mL semblent comporter une grande majorité de PHYL1<sub>OY</sub> et un peu de SEP3<sup>[75-178]</sup> résiduelle.

Le complexe semble donc suivre le ratio 2/1. Les complexes formés semblent être élués entre 15 et 16mL et donc être plus petits qu'une élution de SEP3<sup>[75-178]</sup> seule (14,7mL, Figure 58). Ces complexes sont donc inférieurs à des tétramères de SEP3<sup>[75-178]</sup> (48kDa) et peuvent correspondre à un dimère de SEP3<sup>[75-178]</sup> avec un monomère de PHYL1<sub>OY</sub> (34,7kDa).



**Figure 60 : Etude de mélanges de SEP3<sup>[75-178]</sup>/PHYL1<sub>OY</sub> à différents ratios.** Le gel SDS-PAGE d'acrylamide 15% annoté montre les fractions récoltées de la purification du mélange 1/1. Les traits pleins noirs montrent les fractions analysées sur le gel (représentant les mL 14 à 21 de l'élution de SEC).

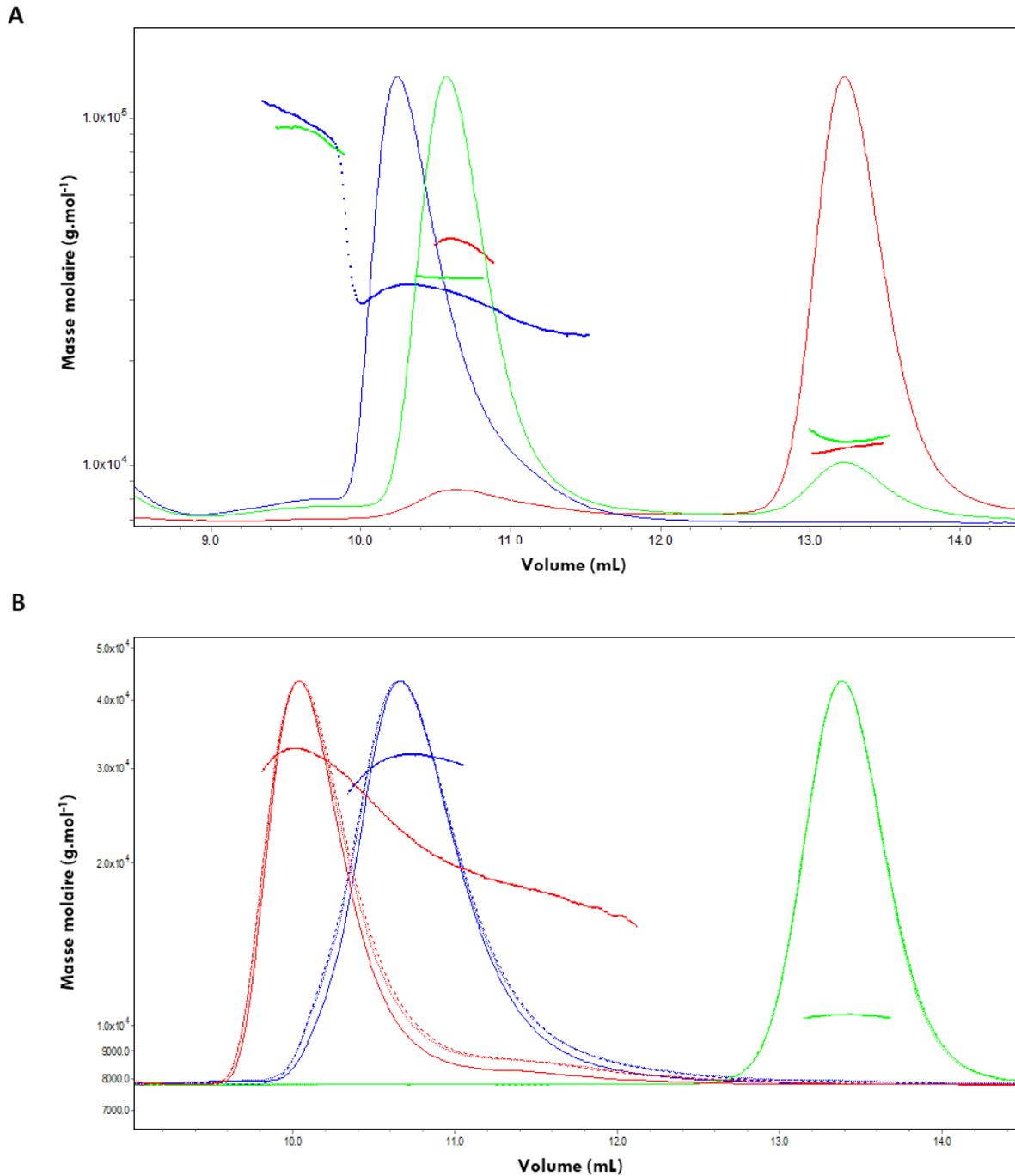
Pour vérifier si les autres complexes de MADS suivent la même stœchiométrie avec PHYL1<sub>OY</sub>, des mélanges des complexes de protéines MADS purifiés avec PHYL1<sub>OY</sub> sont réalisés dans un ratio de 2/1 (MADS/PHYL1<sub>OY</sub>) (Figure 61). Les chromatogrammes montrent la présence d'un unique pic pour les mélanges SEP3<sup>[75-178]</sup>/PHYL1<sub>OY</sub> et SEP3<sup>[75-178]</sup>/AG<sup>[90-189]</sup>/PHYL1<sub>OY</sub> suggérant la formation d'un complexe stable (Figure 61.A et B). Ces résultats montrent que les complexes de SEP3<sup>[75-178]</sup>/PHYL1<sub>OY</sub> et SEP3<sup>[75-178]</sup>/AG<sup>[90-189]</sup>/PHYL1<sub>OY</sub> se forment en suivant les ratios 2/1 et 1/1/1 respectivement, correspondant à un ratio de 2MADS/1PHYL1<sub>OY</sub>. Pour l'interaction d'homocomplexe d'AG avec PHYL1<sub>OY</sub>, la protéine taggée 6xHis-MBP-AG<sup>[90-189]</sup>-S est utilisée car comme nous l'avons vu précédemment, la protéine non taggée AG<sup>[90-189]</sup> n'est pas stable et précipite dès le clivage des tags (Figure 59). Le chromatogramme du mélange 6xHis-MBP-AG<sup>[90-189]</sup>-S/PHYL1<sub>OY</sub> montre deux pics distincts et les fractions de ces deux pics analysées sur gel montrent respectivement 6xHis-MBP-AG<sup>[90-189]</sup>-S (Figure 61.C, fractions 13 à 16mL) et PHYL1<sub>OY</sub> (Figure 61.B, fractions 17 à 19mL) indiquant que ces deux protéines n'interagissent pas ou très faiblement.



**Figure 61 : Mélange des protéines (A) SEP3<sup>[75-178]</sup>/PHYL1<sub>OY</sub>, (B) SEP3<sup>[75-178]</sup>/AG<sup>[90-189]</sup>/PHYL1<sub>OY</sub> et (C) 6xHis-MBP-AG<sup>[90-189]</sup>-S/PHYL1<sub>OY</sub> en suivant un ratio de 2 MADS-TFs pour 1 PHYL1<sub>OY</sub>. Les chromatogrammes de purification en SEC (gauche) montrent un unique pic lors de la formation d'un complexe stable (A et C). Le gel SDS-PAGE d'acrylamide 15% des fractions collectées de la purification en SEC du mélange 6xHis-MBP-AG<sup>[90-189]</sup>-S/PHYL1<sub>OY</sub> est annoté et montre que les deux protéines n'interagissent pas de manière stable.**

## b. Détermination précise de la stœchiométrie des complexes MADS/PHYL1<sub>OY</sub> par purification en SEC-MALS

Pour définitivement valider la stœchiométrie des complexes SEP3<sup>[75-178]</sup>/AG<sup>[90-189]</sup>/PHYL1<sub>OY</sub> et SEP3<sup>[75-178]</sup>/PHYL1<sub>OY</sub> ces deux complexes ont été formés en suivant le ratio 1/1/1 et 2/1 respectivement puis analysés en SEC-MALS. Cette technique permet la séparation de molécules par leur taille (par la SEC) puis la détermination précise de la masse molaire des espèces présentes en solution dans chaque pic du chromatogramme (par le MALS) (Some et al. 2019). Pour la purification en SEC, une colonne analytique (Superdex® 75 Increase 10/300 GL) est utilisée et permet une meilleure séparation des espèces purifiées que dans nos purifications en SEC. Pour chaque complexe, trois injections sont réalisées : une injection des MADS seuls (SEP3<sup>[75-178]</sup>/AG<sup>[90-189]</sup> et SEP3<sup>[75-178]</sup>), une injection de PHYL1<sub>OY</sub> et une injection du complexe MADS/PHYL1<sub>OY</sub> formé. Dans la Figure 62.A, le chromatogramme bleu correspond à la purification et à l'élution de l'hétérocomplexe SEP3<sup>[75-178]</sup>/AG<sup>[90-189]</sup> à 10,3mL. La masse molaire de l'espèce présente dans ce pic est de 32,8kDa. Cette valeur mesurée pourrait correspondre à un homotrimère de SEP3<sup>[75-178]</sup> (36kDa), d'AG<sup>[90-189]</sup> (37,5kDa) ou un hétérotrimère de SEP3<sup>[75-178]</sup>/AG<sup>[90-189]</sup> (36,5 ou 37kDa) mais ces trimères n'ont jamais été observés contrairement aux dimères et tétramères de ces MADS. Il est donc plus probable que ce pic corresponde à un équilibre dimère/tétramère de l'hétérocomplexe SEP3<sup>[75-178]</sup>/AG<sup>[90-189]</sup> (24,5/49kDa donc en moyenne 36,75kDa) comme supposé lors de la purification (Figure 57). Le chromatogramme rouge correspond à la purification et à l'élution de PHYL1<sub>OY</sub> seul à 13,2mL. La masse molaire de l'espèce présente dans ce pic est de 11,2kDa et la masse molaire théorique de PHYL1<sub>OY</sub> est de 10,7kDa. Il semble donc que PHYL1<sub>OY</sub> soit sous forme monomérique comme nous l'avons vu lors de la purification (Figure 54). Pour la formation du complexe SEP3<sup>[75-178]</sup>/AG<sup>[90-189]</sup>/PHYL1<sub>OY</sub>, un petit excès de PHYL1<sub>OY</sub> est ajouté donnant le ratio final 1/1/1,1, afin de vérifier que les protéines MADS sont le facteur limitant. Le chromatogramme vert montre la purification et l'élution du complexe SEP3<sup>[75-178]</sup>/AG<sup>[90-189]</sup>/PHYL1<sub>OY</sub> à 10,6mL. La masse molaire de l'espèce présente dans ce pic est de 34,7kDa très proche de la masse molaire d'un complexe SEP3<sup>[75-178]</sup>/AG<sup>[90-189]</sup>/PHYL1<sub>OY</sub> (35,2kDa). On observe également un pic très faible élué à 13,3mL correspondant à l'excès de PHYL1<sub>OY</sub> injecté. Cette expérience nous confirme que le complexe SEP3<sup>[75-178]</sup>/AG<sup>[90-189]</sup>/PHYL1<sub>OY</sub> se forme sous le ratio 1/1/1 donc que la liaison de PHYL1<sub>OY</sub> se fait à un hétérodimère de SEP3<sup>[75-178]</sup>/AG<sup>[90-189]</sup>.



**Figure 62 : Etude de la stœchiométrie des complexe SEP3<sup>[75-178]</sup>/AG<sup>[90-189]</sup>/PHYL1<sub>OY</sub> et SEP3<sup>[75-178]</sup>/PHYL1<sub>OY</sub> par SEC-MALS. (A)** Expérimentation SEC-MALS du complexe SEP3<sup>[75-178]</sup>/AG<sup>[90-189]</sup>/PHYL1<sub>OY</sub>. Les chromatogrammes bleu, vert et rouge représentent les pics des purifications de SEP3<sup>[75-178]</sup>/AG<sup>[90-189]</sup>, SEP3<sup>[75-178]</sup>/AG<sup>[90-189]</sup>/PHYL1<sub>OY</sub> et PHYL1<sub>OY</sub> respectivement. **(B)** Expérimentation SEC-MALS du complexe SEP3<sup>[75-178]</sup>/PHYL1<sub>OY</sub>. Les chromatogrammes rouge, bleu et vert représentent les pics des purifications de SEP3<sup>[75-178]</sup>, SEP3<sup>[75-178]</sup>/AG<sup>[90-189]</sup>/PHYL1<sub>OY</sub> et PHYL1<sub>OY</sub> respectivement.

Dans la Figure 62.B, le chromatogramme rouge correspond à la purification et à l'élution de SEP3<sup>[75-178]</sup> seul à 10,1mL. La masse molaire de l'espèce présente dans ce pic est de 31,6kDa. Rappelons que la masse molaire théorique de SEP3<sup>[75-178]</sup> est de 12kDa. Ainsi la valeur mesurée

pourrait correspondre à un trimère de SEP3<sup>[75-178]</sup> de masse molaire 36kDa ou à un équilibre entre un dimère (24kDa) de SEP3<sup>[75-178]</sup> et un tétramère de SEP3<sup>[75-178]</sup> (48kDa). Un trimère de SEP3<sup>[75-178]</sup> n'a jamais été observé contrairement aux dimères et tétramères, il semble donc plus probable que SEP3<sup>[75-178]</sup> soit sous forme dimérique et tétramérique en équilibre comme supposé après la purification de SEP3<sup>[75-178]</sup> (Figure 58). Le chromatogramme vert correspond à la purification et à l'élution de PHYL1<sub>OY</sub> seul à 13,4mL. La masse molaire de l'espèce présente dans ce pic est de 10,4kDa et la masse molaire théorique de PHYL1<sub>OY</sub> est de 10,7kDa, montrant à nouveau sa forme monomérique. Le chromatogramme bleu montre la purification et l'élution du complexe SEP3<sup>[75-178]</sup>/PHYL1<sub>OY</sub> à 10,7mL. La masse molaire de l'espèce présente dans ce pic est de 31kDa très proche d'un complexe SEP3<sup>[75-178]</sup>/SEP3<sup>[75-178]</sup>/PHYL1<sub>OY</sub> de 34,7kDa. De plus, le décalage d'élution entre l'injection de SEP3<sup>[75-178]</sup> seul et de SEP3<sup>[75-178]</sup>/SEP3<sup>[75-178]</sup>/PHYL1<sub>OY</sub> montre que le second complexe est plus petit. Cette expérience nous permet donc de confirmer que le complexe SEP3<sup>[75-178]</sup>/PHYL1<sub>OY</sub> est formé par la liaison d'un dimère de SEP3<sup>[75-178]</sup> avec un monomère de PHYL1<sub>OY</sub>.

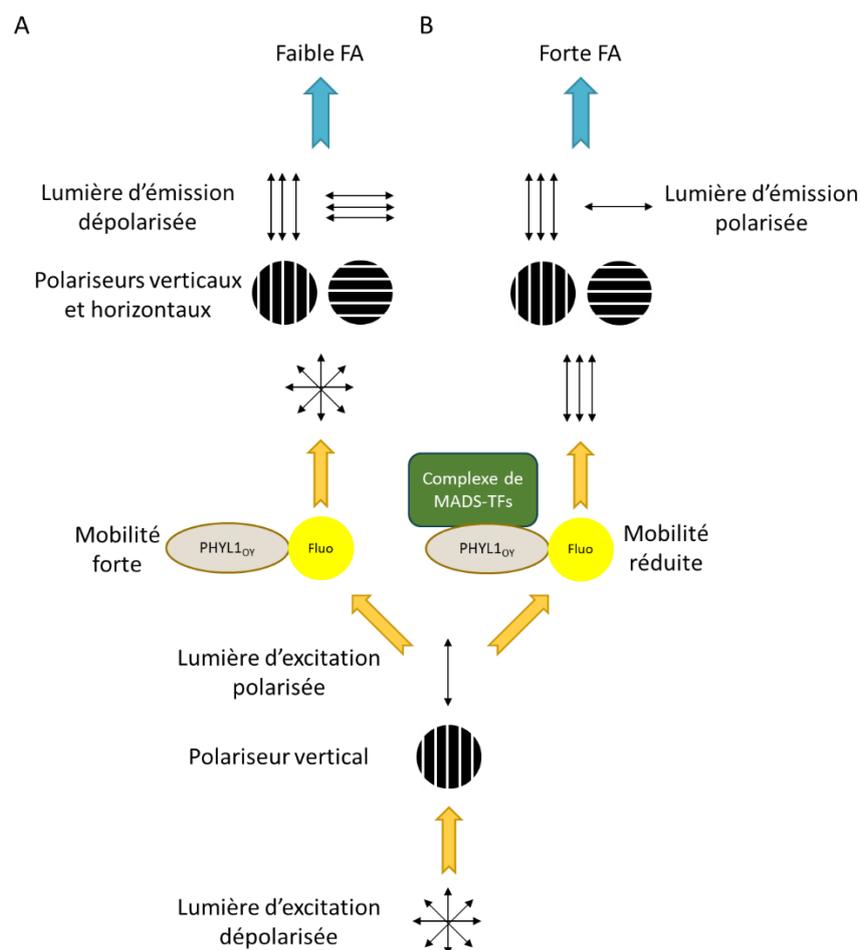
Ces stœchiométries suggèrent donc une interaction entre un dimère de MADS et un monomère de PHYL1<sub>OY</sub>.

### 3. Détermination de l'affinité entre PHYL1<sub>OY</sub> et les complexes MADS par anisotropie de fluorescence

Après avoir déterminé la stœchiométrie de ces deux complexes, l'affinité de PHYL1<sub>OY</sub> pour les complexes de SEP3<sup>[75-178]</sup>/AG<sup>[90-189]</sup> et de SEP3<sup>[75-178]</sup> est analysée par anisotropie de fluorescence avec l'aide de Dr. Sarah Le Hir, chercheuse dans notre équipe. Dans une expérience d'anisotropie de fluorescence (FA), une lumière d'excitation polarisée (connue) est émise vers un fluorochrome qui émet à son tour une lumière d'émission plus ou moins polarisée en fonction de sa mobilité (Figure 63.A et B). La polarisation verticale et horizontale de la lumière d'émission est mesurée et un ratio de ces polarisations est calculé, ce qui permet de calculer l'anisotropie de la fluorescence. Cette technique est fréquemment utilisée pour déterminer les constantes d'affinité de protéines.

En solution, une protéine est mobile et possède un volume hydrodynamique (Vh) donné. Plus le Vh de la protéine est élevé, plus sa mobilité est réduite en solution. Dans cette expérience, la protéine PHYL1<sub>OY</sub> purifiée a été marquée avec de la fluorescéine (par un résidu Cys C-

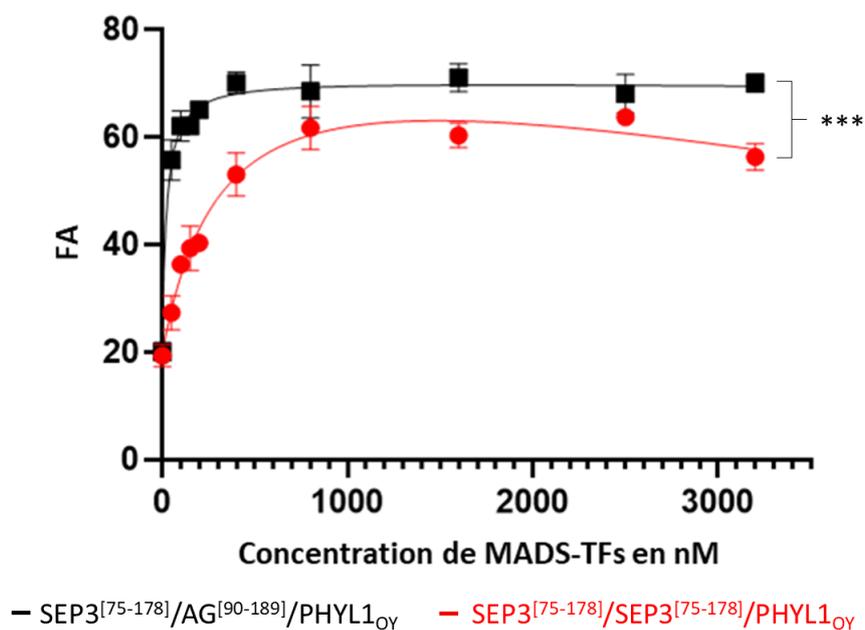
terminal ajouté par mutagenèse dirigée). Cette protéine PHYL1<sub>0Y</sub>-Cys-fluorescéine obtenue est utilisée à concentration constante dans notre expérience. Cette petite protéine est très mobile et lorsqu'elle est exposée à une lumière d'excitation polarisée, elle fluoresce. Puisque cette protéine est très mobile, la lumière qu'elle émet se propage dans toutes les directions et correspond donc à une lumière d'émission dépolarisée. L'anisotropie de fluorescence (FA) mesurée sera faible (Figure 63.A). Quand des protéines MADS SEP3<sup>[75-178]</sup>/AG<sup>[90-189]</sup> ou SEP3<sup>[75-178]</sup> sont ajoutées à la protéine PHYL1<sub>0Y</sub>-Cys-fluorescéine, un complexe MADS/PHYL1<sub>0Y</sub>-Cys-fluorescéine se forme et son V<sub>h</sub> est plus important que celui de la protéine PHYL1<sub>0Y</sub>-Cys-fluorescéine. Lorsqu'il est exposé à la même lumière d'excitation polarisée que précédemment, ce complexe fluoresce également mais émet une lumière d'émission bien plus polarisée (du fait de sa mobilité réduite) que la protéine PHYL1<sub>0Y</sub>-Cys-fluorescéine. La FA mesurée sera plus forte que pour la protéine PHYL1<sub>0Y</sub>-Cys-fluorescéine (Figure 63.B).



**Figure 63 : Application de l'anisotropie de fluorescence (FA) pour la détermination de constantes d'affinité de PHYL1<sub>0Y</sub> pour un complexe de MADS-TFs. (A) Schéma de l'expérience de FA sur PHYL1<sub>0Y</sub> liée à la fluorescéine (cercle jaune nommé « Fluo »). (B) Schéma de l'expérience de FA sur PHYL1<sub>0Y</sub> liée à la fluorescéine (cercle jaune nommé « Fluo ») interagissant avec un complexe de MADS-TFs.**

En augmentant les concentrations de MADS ajoutées à la protéine PHYL1<sub>OY</sub>-Cys-fluorescéine, la FA atteint un maximum lorsque toutes les protéines PHYL1<sub>OY</sub> sont en complexe avec les dimères MADS (Figure 64).

L'utilisation des données d'anisotropie (Figure 64) et des équations (données dans le Chapitre II) permet l'obtention d'un  $K_d$  de  $22,8 \pm 8,0$ nM et  $80,0 \pm 7,8$ nM pour SEP3<sup>[75-178]</sup>/AG<sup>[90-189]</sup>/PHYL1<sub>OY</sub>-Cys-fluorescéine et SEP3<sup>[75-178]</sup>/PHYL1<sub>OY</sub>-Cys-fluorescéine respectivement.



**Figure 64 : Courbes d'anisotropie de fluorescence (sans unité) des complexes SEP3<sup>[75-178]</sup>/AG<sup>[90-189]</sup>/PHYL1<sub>OY</sub>-Cys-fluorescéine (rouge) et SEP3<sup>[75-178]</sup>/PHYL1<sub>OY</sub>-Cys-fluorescéine (noir).** PHYL1<sub>OY</sub>-Cys-fluorescéine est à concentration constante (50nM) et les protéines MADS SEP3<sup>[75-178]</sup>/AG<sup>[90-189]</sup> et SEP3<sup>[75-178]</sup> sont ajoutées à 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 400, 800, 1600, 2500 et 3200nM.

Ces résultats suggèrent une affinité bien plus forte de PHYL1<sub>OY</sub> pour le complexe SEP3<sup>[75-178]</sup>/AG<sup>[90-189]</sup> que pour le complexe SEP3<sup>[75-178]</sup>/SEP3<sup>[75-178]</sup> alors même que PHYL1<sub>OY</sub> ne semble pas interagir avec le domaine K d'AG<sup>[90-189]</sup> purifié (Figure 61). Le  $K_d$  calculé pour SEP3/AG et PHYL1<sub>OY</sub> est extrêmement fort suggérant une affinité très forte de PHYL1<sub>OY</sub> pour ce complexe de MADS. En effet, d'autres interactions connues et fortes telle que celle de la calmoduline avec les ions Ca<sup>2+</sup> montrent des  $K_d$  plus faibles de 5 à 0,5 $\mu$ M (Chin et Means 2000). L'interaction entre PHYL1<sub>OY</sub> et SEP3/AG semble donc particulièrement forte et suggère une évolution très spécifique des phytoplasmes pour cibler les MADS-TFs (Rümppler et al. 2015; Aurin et al. 2020). Des expériences menées sur un effecteur homologue à PHYL1<sub>OY</sub>, PHYL1<sub>P<sub>NWB</sub></sub> montre un  $K_d$  de

6,5nM pour un monomère de PHYL1<sub>PnWB</sub> et un monomère de SEP3<sup>[75-178]</sup> (Liao et al. 2019). Ce  $K_d$  semble relativement proche des  $K_d$  calculés dans nos expériences et confirme la forte affinité des phyllogènes pour le domaine K des MADS.

## C. Impact de PHYL1<sub>OY</sub> sur la liaison de MADS-TFs FL à l'ADN

### 1. Confirmation de la stœchiométrie et de l'affinité de PHYL1<sub>OY</sub> pour les complexes SEP3/AG et SEP3

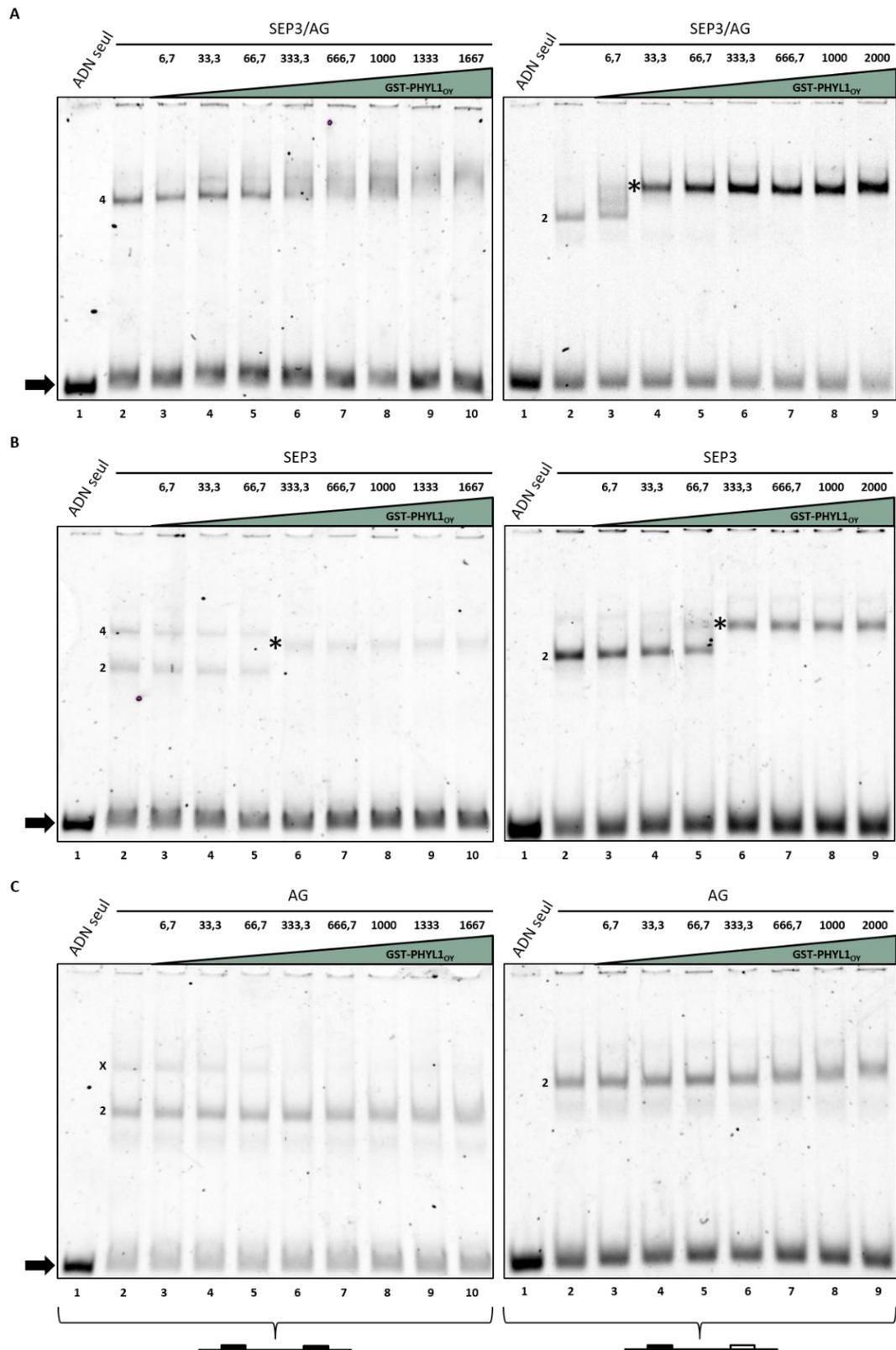
L'interaction de PHYL1<sub>OY</sub> et les complexes MADS se fait par le domaine K, sans interaction avec le domaine M comme nous l'avons vu précédemment (Figure 41). Après avoir analysé les complexes formés à partir des domaines K purifiés, il est important de vérifier comment PHYL1<sub>OY</sub> se lie à un complexe de MADS FL. Pour cela, les protéines sont produites en utilisant le système de transcription et traduction (TnT® Promega SP6 High Yield Expression System, K. Q. Zhao et al. 2007; L. Zhao et al. 2010). Ce système contient de l'extrait de germe de blé qui possède un système de transcription et traduction permettant l'obtention d'une petite quantité de protéines (10–100µg/mL) rapidement à partir d'un plasmide contenant le gène d'intérêt précédé du promoteur SP6. Les séquences des gènes MADS *SEP3* et *AG* sont insérées dans le vecteur pSP64 PolyA (Promega) en 3' du promoteur SP6 et les protéines associées sont produites. L'impact de la liaison de PHYL1<sub>OY</sub> sur la liaison à l'ADN d'un complexe de protéines MADS FL est analysé par electrophoretic mobility shift assays (EMSA ou gel retard). Cette technique permet de visualiser un complexe ADN/protéines en utilisant de l'ADN marqué par un fluorochrome (ici Cys5). Les protéines, dans notre cas les protéines MADS FL avec ou sans PHYL1<sub>OY</sub>, sont incubées avec un milieu réactionnel contenant l'ADN marqué et sont ensuite chargées et séparées sur gel d'acrylamide. Le complexe ADN/protéines, plus lourd que l'ADN libre, est retardé dans sa migration d'où le nom de gel retard ou EMSA. Deux sondes d'ADN comportant deux ou une CARG-box sont utilisées permettant la liaison de dimères et de tétramères de protéines MADS à l'ADN (Figure 65).

Les EMSAs réalisés avec SEP3/AG montrent que l'hétérocomplexe lie l'ADN en tétramère sur la sonde avec deux CARG-box (Figure 65.A gauche noté 4) et en dimère seulement sur la sonde d'une CARG-box (Figure 65.A droite noté 2). L'EMSA avec deux CARG-box montre, qu'à 33,3nM de GST-PHYL1<sub>OY</sub>, un nouveau complexe, plus lourd que le tétramère, semble apparaître (Figure 65.A gauche). Le tétramère initial disparaît complètement à partir de 333,3nM de GST-

PHYL1<sub>0Y</sub>. Ce nouveau complexe formé ne semble pas stable puisqu'aucune bande nette n'est observée même aux fortes concentrations. L'EMSA avec une CARG-box montre des résultats bien plus clairs avec la disparition totale du dimère à partir de 33,3nM de GST-PHYL1<sub>0Y</sub> et l'apparition d'un nouveau complexe plus lourd (Figure 65.A droite). Ce complexe correspond très sûrement à un dimère de SEP3/AG lié à un monomère de GST-PHYL1<sub>0Y</sub> puisqu'il est visible avec une CARG-box.

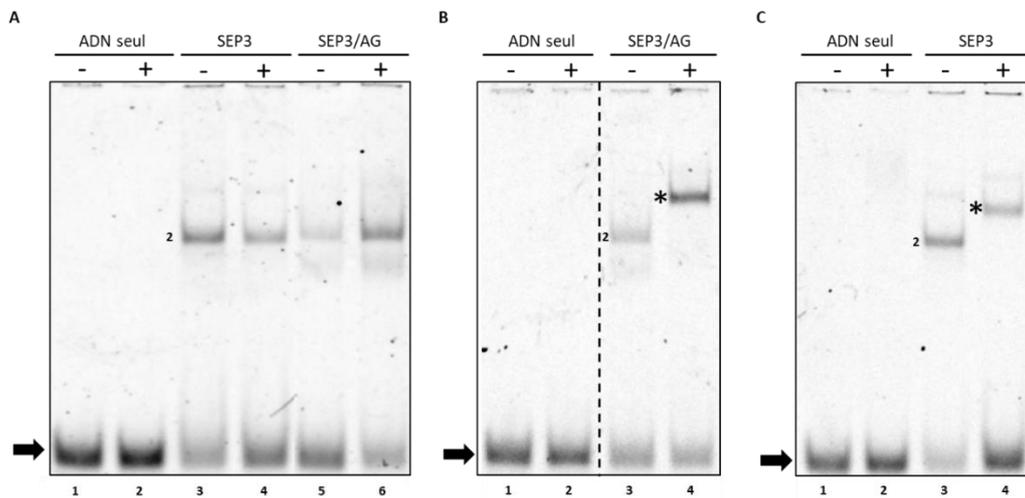
Les EMSAs réalisés avec SEP3 montrent que SEP3 lie l'ADN en dimère et tétramère (Figure 65.B gauche notés 2 et 4 respectivement) sur la sonde avec deux CARG-box et seulement en dimère (Figure 65.B droite noté 2) sur la sonde d'une CARG-box. Dans les deux EMSAs, à partir de 333,3nM de GST-PHYL1<sub>0Y</sub>, les dimères et tétramères de SEP3 disparaissent et un nouveau complexe intermédiaire apparaît (Figure 65.B, puits 6 et plus). Ce complexe correspond à un dimère de SEP3 lié à un monomère de GST-PHYL1<sub>0Y</sub> puisqu'il migre entre les dimères et les tétramères de SEP3. De plus, le retard de migration obtenu semble proche de celui vu avec SEP3/AG et suggère que les complexes SEP3/AG/PHYL1<sub>0Y</sub> et SEP3/PHYL1<sub>0Y</sub> suivent ici aussi la même stœchiométrie de 2MADS/1PHYL1<sub>0Y</sub>.

Les EMSAs réalisés avec AG montrent qu'AG lie l'ADN en dimère et en un autre degré d'oligomérisation sur la sonde avec deux CARG-box (Figure 65.C gauche notés 2 et X respectivement) et seulement en dimère sur la sonde d'une CARG-box (Figure 65.C droite noté 2). Il n'a jamais été observé qu'AG puisse former d'homotétramère (Silva et al. 2016; Hugouvieux et al. 2018) suggérant que le complexe X correspond à deux dimères d'AG liant chacun une CARG-box du même ADN mais ne formant pas de tétramère. L'EMSA avec deux CARG-box réalisé avec AG montre que le dimère semble très légèrement moins abondant aux fortes concentrations de GST-PHYL1<sub>0Y</sub> et que le complexe X semble disparaître à partir de 333,3nM de GST-PHYL1<sub>0Y</sub> (Figure 65.C gauche). Aucun nouveau complexe n'apparaît suggérant que GST-PHYL1<sub>0Y</sub> pourrait interagir très faiblement avec un dimère d'AG et soit déstabiliser sa liaison à l'ADN, soit ne pas affecter sa liaison à l'ADN mais être présent en trop faible quantité pour être vu sur notre EMSA. Cette dernière hypothèse semble se confirmer grâce à l'EMSA réalisé avec une CARG-box puisqu'aux fortes concentrations de GST-PHYL1<sub>0Y</sub>, le dimère d'AG semble être légèrement retardé dans sa migration (Figure 65.C droite). Ceci suggère que l'interaction entre PHYL1<sub>0Y</sub> et AG est très faible comparée aux interactions entre PHYL1<sub>0Y</sub> et SEP3/AG et SEP3 et qu'elle ne déstabilise pas fortement la liaison d'AG à l'ADN.



**Figure 65 : Impact de GST-PHYL1<sub>OY</sub> sur la liaison à l'ADN de différents complexes de MADS.** Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) de **(A)** SEP3/AG, **(B)** SEP3 et **(C)** AG mis en contact avec un gradient de concentrations (annotées en haut de chaque puits en nM) de GST-PHYL1<sub>OY</sub> avec de l'ADN marqué du promoteur de *SEP3* contenant deux CARG-box (gauche) ou une CARG-box (droite). L'astérisque montre l'apparition d'une nouvelle bande et les numéros 2 et 4 représentent des dimères et des tétramères liant l'ADN respectivement. Les flèches noires montrent l'ADN libre.

Pour vérifier que la GST n'est pas responsable de ces retards de migrations, un EMSA est réalisé avec SEP3 et SEP3/AG et de la GST seule (Figure 66.A). La GST a été ajoutée à 667nM, concentration suffisante avec GST-PHYL1<sub>OY</sub> pour retarder les complexes SEP3 et SEP3/AG (Figure 66.B et C). Comme attendu, aucun retard de migration n'est observé avec la GST ce qui montre que les complexes formés sont dus à l'activité de PHYL1<sub>OY</sub> (Figure 66.A).



**Figure 66 : Impact de GST et GST-PHYL1<sub>OY</sub> sur la liaison à l'ADN de différents complexes de MADS.** (A) Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) de SEP3 et SEP3/AG mis en contact avec et sans GST (+ et - respectivement) avec de l'ADN marqué du promoteur de SEP3 contenant une CARG-box. EMSAs de (B) SEP3/AG et (C) SEP3 mis en contact avec et sans GST-PHYL1<sub>OY</sub> (+ et - respectivement) avec de l'ADN marqué du promoteur de SEP3 contenant une CARG-box. Les astérisques montrent l'apparition d'un nouveau complexe et les numéros 2 représentent des dimères. Le trait pointillé montre une coupure réalisée sur l'image du gel. Les protéines GST-PHYL1<sub>OY</sub> et GST ont été ajoutées à 667nM. Les flèches noires montrent l'ADN libre.

Ces résultats suggèrent que la stœchiométrie 2/1 observée avec la formation des complexes SEP3<sup>[75-178]</sup>/AG<sup>[90-189]</sup>/PHYL1<sub>OY</sub> et SEP3<sup>[75-178]</sup>/PHYL1<sub>OY</sub> se confirme quand les MADS-TFs sont produites en FL. De plus, les K<sub>d</sub> observés précédemment sont cohérents avec les fourchettes observées en EMSA (entre 6,7nM et 33,3nM comparé à 22,8 ± 8,0nM pour SEP3/AG et entre 66,7 à 333,3nM comparé à 80,0 ± 7,8nM pour SEP3). L'interaction entre PHYL1<sub>OY</sub> et AG observée en levures (Figure 41) semble se confirmer en EMSA même si elle paraît très faible et pourrait expliquer pourquoi aucune interaction n'est observée avec le domaine K d'AG<sup>[90-189]</sup> purifié (Figure 61.C).

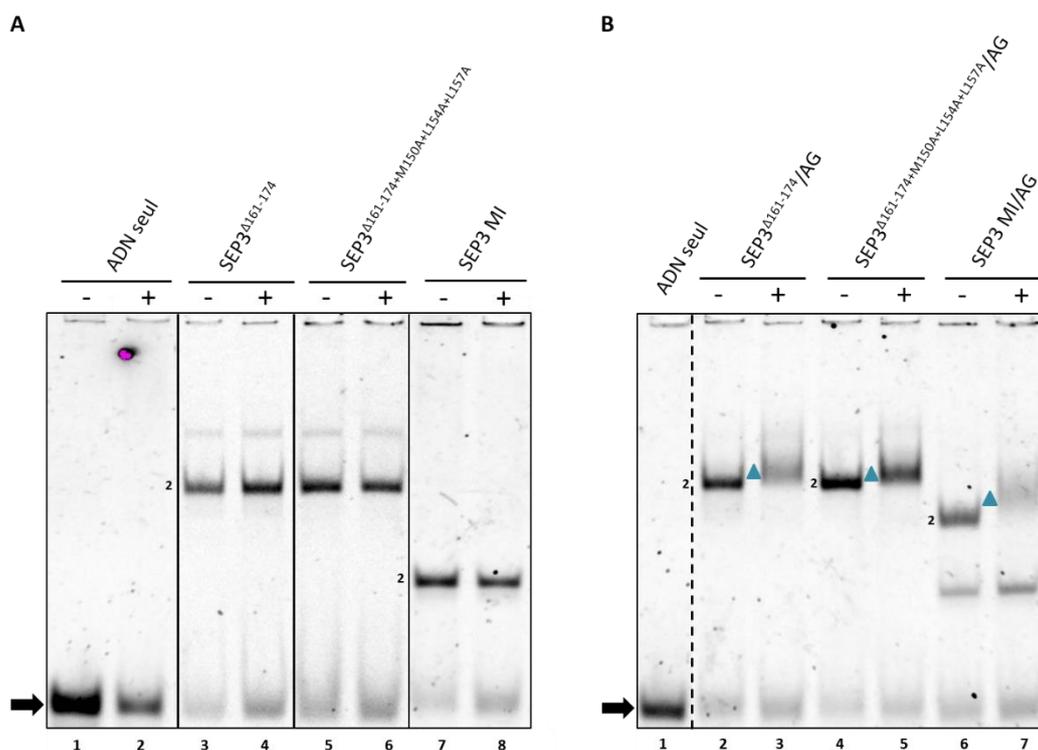
Les modèles d'interaction de phyllogènes avec SEP3 dans la littérature suggèrent des stœchiométries différentes de celle que nous observons avec les domaines K et les versions FL de SEP3 et SEP3/AG. Une première étude montre par EMSA que SAP54 peut lier un

tétramère de SEP3 (Aurin et al. 2020). Il est intéressant de noter que des expériences de dynamic light scattering (DLS) dans cette étude montrent que SAP54 se trouve en dimère en solution ce qui ne semble pas être le cas de PHYL1<sub>OY</sub> d'après nos purifications en SEC (Figure 54.B et C) et la littérature (Iwabuchi et al. 2019). Même si PHYL1<sub>OY</sub> et SAP54 comportent un taux d'identité très fort (83%, Aurin et al. 2020), il est possible qu'ils aient des mécanismes d'interaction inter et intramoléculaires différents. Un second modèle avec la protéine PHYL1<sub>PnWB</sub> a été construit grâce à des expérimentations d'ultracentrifugation du mélange PHYL1<sub>PnWB</sub>/SEP3<sup>[75-178]</sup> et suggère la formation d'un hétérodimère donc une stœchiométrie 1/1 (Liao et al. 2019). Dans ces expérimentations, des monomères et tétramères de SEP3<sup>[75-178]</sup> ont été observés alors qu'un monomère de SEP3<sup>[75-178]</sup> n'a jamais été observé en solution dans notre étude et dans Puranik et al. 2014. Il est donc possible que l'expérience d'ultracentrifugation ait dissocié le complexe PHYL1<sub>PnWB</sub>/SEP3<sup>[75-178]</sup> (Liao et al. 2019; Aurin et al. 2020). Il est également important de noter que PHYL1<sub>OY</sub> et PHYL1<sub>PnWB</sub> comporte une identité plus faible (60%, Liao et al. 2019) qu'avec SAP54 ce qui pourrait justifier également des mécanismes moléculaires d'interaction encore plus différents. La stœchiométrie des complexes MADS/phylogènes est encore en discussion dans la littérature et nécessite d'autres études afin d'être clairement définie.

## 2. L'interaction entre PHYL1<sub>OY</sub> et SEP3/AG nécessite la zone de tétramérisation de SEP3 et semble renforcée par AG

Nous avons déterminé précédemment que la zone de tétramérisation de SEP3 est importante pour l'interaction entre PHYL1<sub>OY</sub> et SEP3 en Y2H (Figure 50) et avec nos analyses biochimiques précédentes réalisées sur les domaines K purifiés. Dans la mesure où PHYL1<sub>OY</sub> interagit plus fortement avec SEP3/AG qu'avec SEP3 et très faiblement avec AG, il semble logique de penser que la zone de tétramérisation de SEP3 est le point d'accroche de l'interaction et qu'AG pourrait stabiliser cette interaction. Pour vérifier cette hypothèse, l'interaction de différents dimères de MADS (portant des délétions et/ou des mutations dans leur domaines K ou des troncations des domaines KC) avec GST-PHYL1<sub>OY</sub> est testée en EMSA. Nous avons vu précédemment que la sonde d'ADN ne comportant qu'une CARG-box donne des résultats plus clairs que celle comportant deux CARG-box et que les résultats obtenus avec les domaines K purifiés se confirment avec cette sonde d'ADN en EMSA (Figure 65). Cette sonde d'ADN est donc conservée pour la suite des expériences.

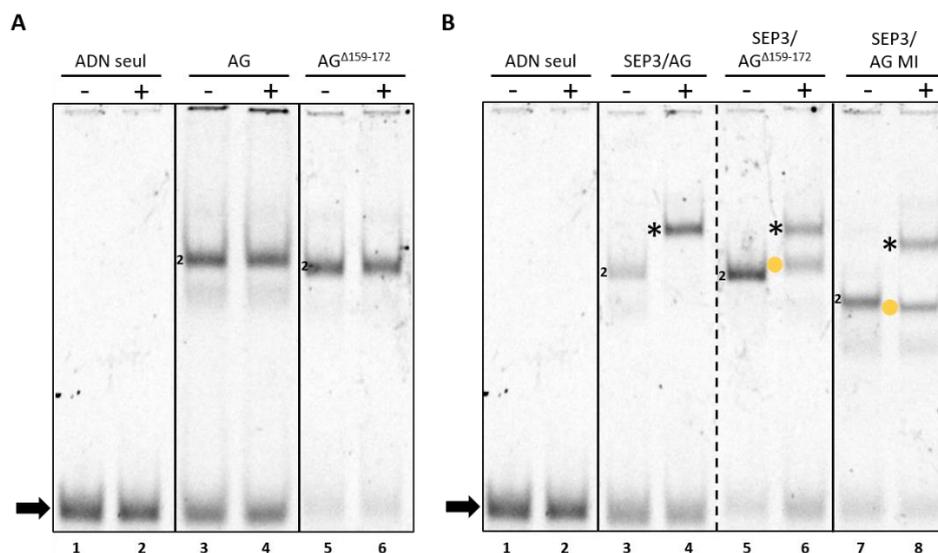
Lorsqu'un homocomplexe de versions mutées dans la zone de tétramérisation et/ou tronquées de SEP3 ( $SEP3^{\Delta161-174}$ ,  $SEP3^{\Delta161-174+M150A+L154A+L157A}$  ou  $SEP3MI$  :  $SEP^{[1-90]}$ ) est formé, aucun complexe ne se forme avec 667nM de GST-PHYL1<sub>0Y</sub> (Figure 67.A) ce qui confirme que la zone de tétramérisation du domaine K de SEP3 est nécessaire pour l'interaction entre un homodimère de SEP3 et PHYL1<sub>0Y</sub>. Lorsqu'un hétérocomplexe d'AG et d'une des versions précédentes de SEP3 est formé, aucun complexe net n'est formé avec PHYL1<sub>0Y</sub> même si un très léger retard de migration est observé avec 667nM de GST-PHYL1<sub>0Y</sub> (triangles bleus, Figure 67.B). Ce résultat montre que la zone de tétramérisation de SEP3 est absolument nécessaire pour la formation d'un complexe fort et stable SEP3/AG/PHYL1<sub>0Y</sub>. Cependant, l'hétérocomplexe SEP3muté/AG semble interagir faiblement avec GST-PHYL1<sub>0Y</sub> ce qui suggère une implication d'AG dans l'interaction entre SEP3/AG et GST-PHYL1<sub>0Y</sub> alors qu'AG n'interagit pas seul avec GST-PHYL1<sub>0Y</sub> à ces concentrations (Figure 67.B et Figure 65.C).



**Figure 67 : Impact de GST-PHYL1<sub>0Y</sub> sur la liaison à l'ADN de différents complexes de MADS comportant des versions tronquées ou mutées de SEP3. (A)** Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) de  $SEP3^{\Delta161-174}$ ,  $SEP3^{\Delta161-174+M150A+L154A+L157A}$  et  $SEP3 MI$  ( $SEP^{[1-90]}$ ) mis en contact avec et sans GST-PHYL1<sub>0Y</sub> (+ et - respectivement) avec de l'ADN marqué du promoteur de SEP3 contenant une CARG-box. **(B)** EMSA de  $SEP3^{\Delta161-174}/AG$ ,  $SEP3^{\Delta161-174+M150A+L154A+L157A}/AG$  et  $SEP3 MI/AG$  mis en contact avec et sans GST-PHYL1<sub>0Y</sub> (+ et - respectivement) avec de l'ADN marqué du promoteur de SEP3 contenant une CARG-box. Les astérisques montrent l'apparition d'un nouveau complexe et les numéros 2 représentent des dimères. Les traits pointillés et pleins montrent des coupures réalisées sur le même gel et sur deux gels différents respectivement. La protéine GST-PHYL1<sub>0Y</sub> est ajoutée à 667nM. Les flèches noires montrent l'ADN libre.

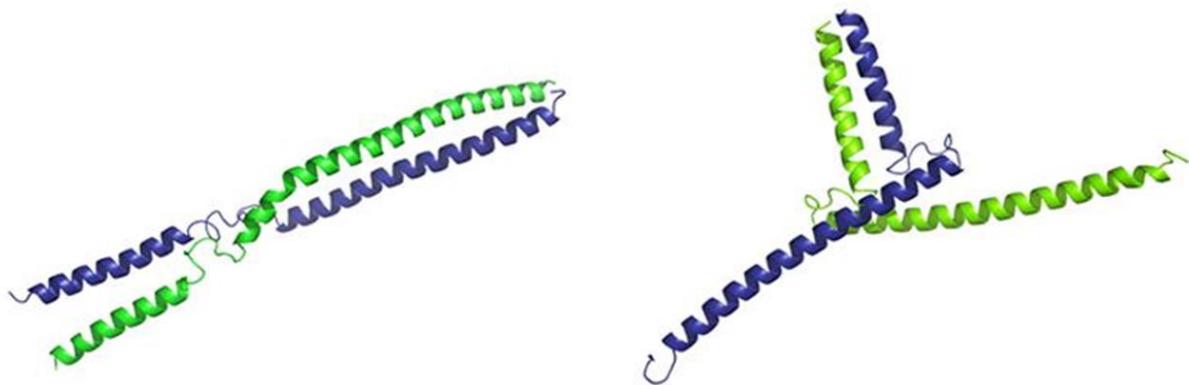
Pour vérifier que SEP3 est suffisante pour l'interaction entre SEP3/AG et PHYL1<sub>0Y</sub> et donc qu'AG n'est que faiblement impliquée dans cette interaction, des expériences similaires aux précédentes sont réalisées en mutant, cette fois, AG.

Lorsqu'un homocomplexe de versions sauvages ou tronquées d'AG (AG : AG<sup>[1-253]</sup>, AG<sup>Δ159-172</sup> ou AG MI : AG<sup>[1-102]</sup>) est formé, aucun complexe ne se forme avec 667nM de GST-PHYL1<sub>0Y</sub> (Figure 68.A). Lorsqu'un hétérocomplexe de SEP3 et d'une des versions précédentes d'AG est formé, un complexe net se forme avec 667nM de GST-PHYL1<sub>0Y</sub> comme le montrent les retards de migration (astérisques Figure 68.B). Ces complexes ne migrent pas comme un homodimère de SEP3 lié à GST-PHYL1<sub>0Y</sub> (Annexe 12) et correspondent donc à des hétérodimères des MADS précédents liés à un monomère de GST-PHYL1<sub>0Y</sub>. Dans les puits 6 et 8 apparaissent également d'autres complexes moins retardés (cercles jaunes Figure 68.B) qui correspondent très probablement à des excès d'AG<sup>Δ159-172</sup> et d'AG MI respectivement. Ces expériences montrent que les différentes troncations n'empêchent pas l'interaction forte entre SEP3/AG et GST-PHYL1<sub>0Y</sub> et confirment que SEP3 est nécessaire et suffisante pour l'interaction entre SEP3/AG et GST-PHYL1<sub>0Y</sub>.



**Figure 68 : Impact de GST-PHYL1<sub>0Y</sub> sur la liaison à l'ADN de complexes de MADS comportant des versions tronquées ou sauvages d'AG. (A)** Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) de AG et AG<sup>Δ159-172</sup> mis en contact avec et sans GST-PHYL1<sub>0Y</sub> (+ et - respectivement) avec de l'ADN marqué du promoteur de SEP3 contenant une CArG-box. **(B)** EMSA de SEP3/AG, SEP3/AG<sup>Δ159-172</sup> et SEP3/AG MI mis en contact avec et sans GST-PHYL1<sub>0Y</sub> (+ et - respectivement) avec de l'ADN marqué du promoteur de SEP3 contenant une CArG-box. Les astérisques et les cercles jaunes montrent l'apparition d'un complexe de MADS avec GST-PHYL1<sub>0Y</sub> et d'un complexe résiduel de MADS respectivement. Les numéros 2 représentent des dimères. Les traits pointillés et pleins montrent des coupures réalisées sur le même gel et sur deux gels différents respectivement. La protéine GST-PHYL1<sub>0Y</sub> est ajoutée à 667nM. Les flèches noires montrent l'ADN libre.

Ces expériences nous montrent que la zone de tétramérisation de SEP3 est le point d'ancrage d'une interaction forte entre PHYL1<sub>0Y</sub> et l'hétérodimère SEP3/AG ou l'homodimère SEP3/SEP3. Elles montrent également qu'AG semble faiblement impliqué dans l'interaction de PHYL1<sub>0Y</sub> avec l'hétérodimère SEP3/AG alors que PHYL1<sub>0Y</sub> n'interagit pas avec un homodimère d'AG dans ces conditions. C'est donc en dimérisant avec SEP3, qu'AG interagit plus fortement avec PHYL1<sub>0Y</sub> et permet de rendre l'interaction entre SEP3/AG et PHYL1<sub>0Y</sub> plus forte qu'entre SEP3/SEP3 et PHYL1<sub>0Y</sub>. L'hypothèse la plus crédible quant à cette forte interaction est, qu'en s'associant, SEP3 et AG changent légèrement leur conformation ce qui rend l'interaction avec PHYL1<sub>0Y</sub> plus propice. En effet, alors que SEP3 comporte un angle droit entre les deux hélices de son domaine K permis par sa zone de pont, le domaine K d'AG semble avoir une conformation plus flexible d'après des expérimentations de small angle x-ray scattering (SAXS) réalisées dans notre équipe (Silva et al. 2016). L'angle entre les deux hélices du domaine K d'AG en solution pourrait être soit de 180° (une conformation ouverte), soit semblable à celui de SEP3 (Figure 69). Cette flexibilité de conformation d'AG pourrait, en étant associée à SEP3, créer une zone favorable pour l'interaction avec PHYL1<sub>0Y</sub> et stabiliser cette interaction.



**Figure 69 : Conformations possibles d'un dimère d'AG<sup>[74-173]</sup> en solution.** La conformation ouverte (gauche) montre un angle de 180° entre les deux hélices du domaine K et la conformation plus fermée (droite) ressemble davantage à celle du domaines K de SEP3 d'après Silva et al. 2016. Chaque monomère est coloré en vert et en bleu respectivement.

Rappelons également qu'AG interagit avec PHYL1<sub>0Y</sub> en Y2H (Figure 41) et semble interagir avec PHYL1<sub>0Y</sub> en EMSA aux fortes concentrations (Figure 65.C). Cette interaction est toutefois moins forte que l'interaction entre SEP3 et PHYL1<sub>0Y</sub>. On peut donc voir les dimères SEP3/AG et SEP3/SEP3 comme deux dimères présentant deux sites de liaison différents : un fort (zone de tétramérisation de SEP3) et un faible (AG) pour SEP3/AG et deux forts pour SEP3/SEP3. Il est possible que PHYL1<sub>0Y</sub> soit semblable au dimère SEP3/AG en présentant deux sites

d'interaction, un fort et un faible. Ainsi, les sites forts de SEP3/AG et PHYL1<sub>0Y</sub> pourraient interagir ensemble et les sites faibles également ce qui rendrait l'interaction plus forte. Dans la mesure où SEP3/SEP3 présente deux sites forts, l'interaction pourrait être moins forte car le site faible de PHYL1<sub>0Y</sub> ne pourrait pas interagir fortement avec le site fort libre de SEP3.

---

### *En résumé*

---

Dans ce chapitre, la caractérisation biochimique de l'interaction de PHYL1<sub>0Y</sub> avec les complexes SEP3/AG et SEP3/SEP3 a été réalisée. Grâce à la purification des domaines K de SEP3/AG, SEP3, et AG, la stœchiométrie et le  $K_d$  ont été déterminés et montre que PHYL1<sub>0Y</sub> se lie en monomère à des dimères de MADS-TFs. La zone de tétramérisation du domaine K de SEP3 est nécessaire et suffisante pour l'interaction de PHYL1<sub>0Y</sub> avec les dimères SEP3/AG et SEP3/SEP3 et PHYL1<sub>0Y</sub> se lie plus fortement à SEP3/AG qu'à SEP3 et ne semble lier que très faiblement AG. La liaison de PHYL1<sub>0Y</sub> aux versions FL de ces protéines suit les mêmes caractéristiques : liaison à des dimères de MADS et affinités similaires (entre 66,7 et 333,3nM comparé à  $80,0 \pm 7,8$ nM pour SEP3 et entre 6,7nM et 33,3nM comparé à  $22,8 \pm 8,0$ nM pour SEP3/AG). AG semble jouer un rôle dans l'interaction entre PHYL1<sub>0Y</sub> et SEP3/AG en stabilisant légèrement l'interaction. La conformation du dimère SEP3/AG est possiblement l'élément clef de cette interaction forte avec PHYL1<sub>0Y</sub>.

### III. Identification de l'interaction MADS/PHYL1<sub>OY</sub> au niveau atomique et moléculaires

#### A. Cristallogénèse des complexes MADS/PHYL1<sub>OY</sub> formés et de l'hétérocomplexe SEP3<sup>[75-178]</sup>/AG<sup>[90-189]</sup>

Dès l'obtention du complexe SEP3<sup>[75-178]</sup>/AG<sup>[90-189]</sup>/PHYL1<sub>OY</sub>, nous avons décidé de réaliser des essais de cristallisation sur ce complexe afin de caractériser sa structure atomique. Pour cela, des essais préliminaires de cristallisation dans différents tampons sont réalisés par la plateforme de cristallisation à haut débit CRIMS de l'EMBL et l'IBS à Grenoble. Ce criblage de plus de 1500 conditions différentes permet de visualiser les conditions dans lesquelles des cristaux se forment et de cribler ces conditions par la technique de la goutte suspendue sur des plaques de cristallisation au laboratoire.

##### 1. Cristallogénèse de SEP3<sup>[75-178]</sup>/AG<sup>[90-189]</sup>/PHYL1<sub>OY</sub>

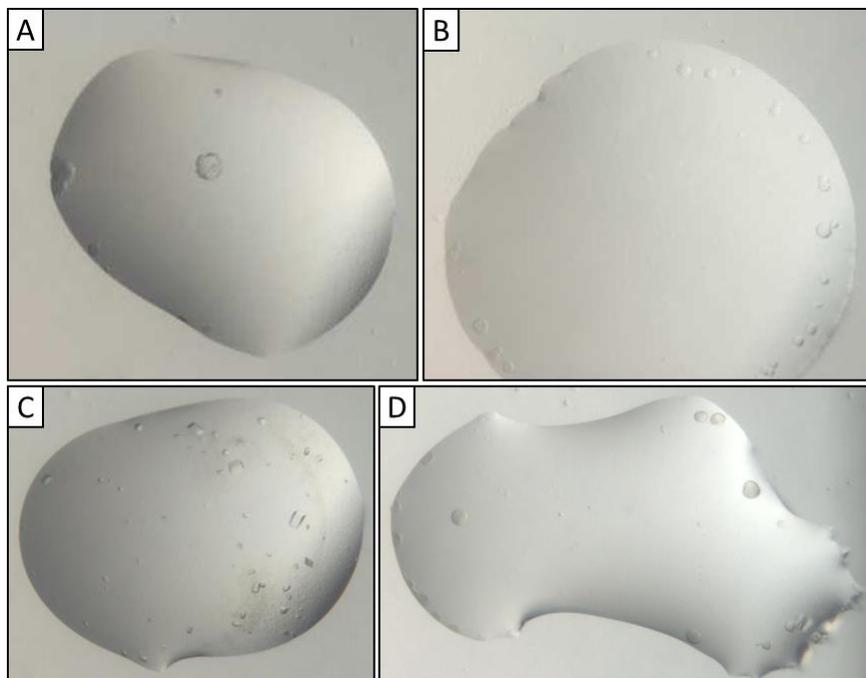
Les essais de cristallisation réalisés par la plateforme de cristallisation à haut débit CRIMS de l'EMBL et l'IBS à Grenoble avec le complexe SEP3<sup>[75-178]</sup>/AG<sup>[90-189]</sup>/PHYL1<sub>OY</sub> ne montrent aucun cristal après 87 jours. Des essais sont actuellement poursuivis en purifiant à nouveau le complexe et en le testant à diverses concentrations et avec divers kits de la plateforme de cristallisation à haut débit CRIMS de l'EMBL et l'IBS à Grenoble.

En parallèle, des essais de cristallisation sont réalisés sur les complexes SEP3<sup>[75-178]</sup>/AG<sup>[90-189]</sup> et SEP3<sup>[75-178]</sup>/PHYL1<sub>OY</sub>. En effet, aucune structure de domaine K d'hétérocomplexe de MADS MIKC n'a été élucidée à notre connaissance. L'obtention de la structure tridimensionnelle de SEP3<sup>[75-178]</sup>/AG<sup>[90-189]</sup> permettrait de caractériser au niveau atomique un complexe physiologique de protéines MADS. D'autre part, SEP3 semble être l'acteur majoritaire de l'interaction entre PHYL1<sub>OY</sub> et SEP3/AG. Ainsi la caractérisation atomique de ces deux complexes permettrait d'obtenir des informations précieuses sur la structure du complexe SEP3/AG/PHYL1<sub>OY</sub>, notamment par modélisation ou par remplacement moléculaire.

##### 2. Cristallogénèse de SEP3<sup>[75-178]</sup>/AG<sup>[90-189]</sup>

Les essais de cristallisation du complexe SEP3<sup>[75-178]</sup>/AG<sup>[90-189]</sup> par la plateforme de cristallisation à haut débit CRIMS de l'EMBL et l'IBS à Grenoble montrent quatre conditions favorables à l'apparition de cristaux : 0,2M thiocyanate de potassium, 0,1M de Bis Tris

propane à pH7,5 et 20% de PEG3350 (Figure 70.A), 0,1M de cacodylate de sodium à pH6,5, 40% de MPD et 5% de PEG8000 (Figure 70.B), 0,1M Tris à pH8 et 2,4M de formate de sodium à pH8 (Figure 70.C) et pour finir 0,2M de sulfate de lithium, 0,1M d'imidazole à pH8 et 10% de PEG3000 (Figure 70.D). Ces différents cristaux sont testés sur la ligne de lumière ID23-2 de l'ESRF par Dr. Chloé Zubieta et seuls ceux provenant de la condition 0,1M Tris à pH8 et 2,4M de formate de sodium à pH8 diffractent faiblement. Des tests sont réalisés au laboratoire en réalisant une gamme de concentration de formate de sodium ainsi que le ratio de protéines/tampon dans la goutte et des cristaux sont obtenus pour les concentrations de 1,8, 2, 2,1, 2,2 et 2,3M de formate de sodium à pH8 et pour tous les ratios de précipitant dans la goutte.



**Figure 70 : Cristaux obtenus du complexe SEP3<sup>[75-178]</sup>/AG<sup>[90-189]</sup> après criblage par la plateforme de cristallisation à haut débit CRIMS de l'EMBL et l'IBS à Grenoble.** Les différentes conditions sont **(A)** 0,2M thiocyanate de potassium, 0,1M de Bis Tris propane à pH7,5 et 20% de PEG3350, **(B)** 0,1M de cacodylate de sodium à pH6,5, 40% de MPD et 5% de PEG8000 **(C)** 0,1M Tris à pH8 et 2,4M de formate de sodium à pH8 et **(D)** 0,2M de sulfate de lithium, 0,1M d'imidazole à pH8 et 10% de PEG3000. Les cristaux mesurent entre quelques  $\mu\text{m}$  et  $100\mu\text{m}$ .

Ces cristaux sont testés sur la ligne de lumière ID23-2 de l'ESRF par Dr. Chloé Zubieta et la meilleure résolution obtenue est de  $2,4\text{\AA}$  mais n'a pas permis de résoudre la structure du complexe pour le moment (Tableau 8). Il serait peut-être possible d'améliorer la résolution en remplaçant les méthionines des protéines purifiées par des sélénométhionines. Pour cela, la

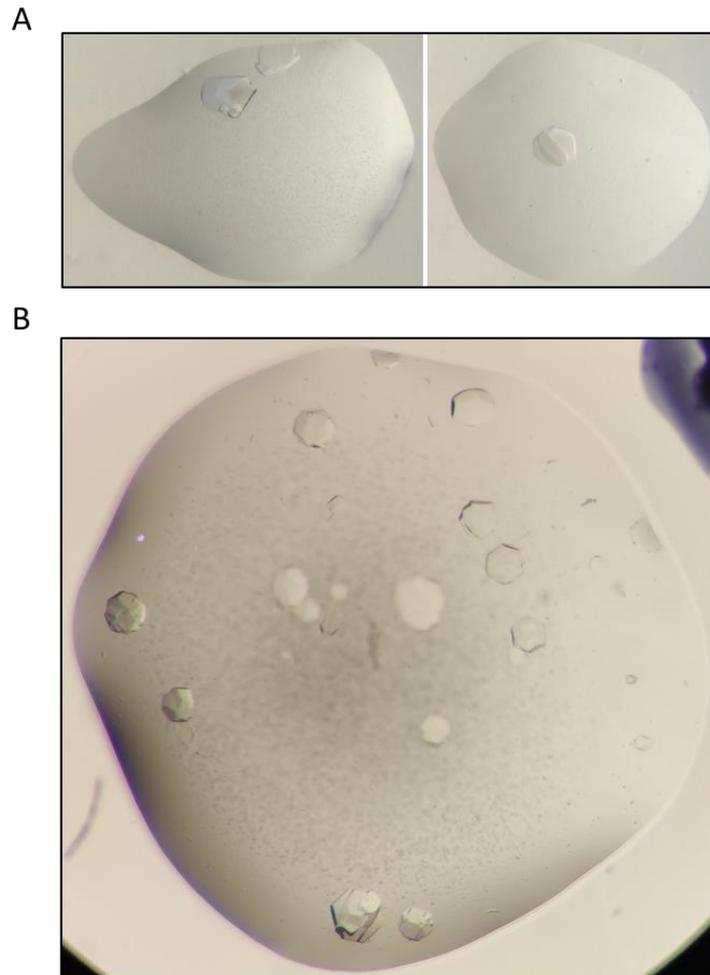
production de protéines se fera dans un milieu dans lequel les méthionines sont remplacées par des sélénométhionines (Hendrickson, Horton, et LeMaster 1990).

SEP3 <sup>[75-178]</sup> /AG <sup>[90-189]</sup>		
Groupe d'espace		C222 <sub>1</sub>
Dimensions des cellules	a, b, c (Å)	101.3, 138.4, 100.2
	a, b, g (°)	90, 90, 90
Résolution (Å)		48.-2.4 (2.46-2.4)
R <sub>sym</sub> ou R <sub>merge</sub>		9.0 (151)
CC <sub>1/2</sub>		99.9 (48.5)
Complétude (%)		99.5 (94.1)
Redondance		7.3 (6.9)

**Tableau 8 : Tableau des données collectées après diffraction des cristaux de SEP3<sup>[75-178]</sup>/AG<sup>[90-189]</sup> sur la ligne de lumière ID23-2 de l'ESRF.** Les données entre parenthèses montrent les données de la meilleure résolution obtenue.

### 3. Cristallogénèse de SEP3<sup>[75-178]</sup>/PHYL1<sub>0Y</sub>

Les essais de cristallisation du complexe SEP3<sup>[75-178]</sup>/ PHYL1<sub>0Y</sub> par la plateforme de cristallisation à haut débit CRIMS de l'EMBL et l'IBS à Grenoble montrent deux conditions favorables à l'apparition de cristaux : acétate de sodium 0,1M pH 4,6, chlorure de sodium 2M et acétate de sodium 0,1M pH 4,6, formate de sodium 2M) sont ensuite testées au laboratoire (Figure 71.A). Après plusieurs essais d'optimisation des concentrations de sels et de pH des deux tampons précédents ainsi que du ratio de précipitant dans la goutte, une condition unique est conservée car elle produit plusieurs cristaux en moins de deux semaines (0,1M acétate de sodium pH 4,6, 2,04M chlorure de sodium). Les cristaux obtenus n'étant pas parfaitement polyédriques et peu nombreux, un kit d'additifs est utilisé afin d'optimiser les cristaux. Ces nouveaux essais sont réalisés avec la condition unique précédente en ajoutant chacun des 96 composés provenant d'un kit d'additifs (Additive screen HR-428, Hampton Research). Une condition donne de nombreux cristaux plus polyédriques que les précédents : l'ajout de 5% (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol (MPD) (Figure 71.B). L'ajout d'une gamme de MPD est réalisé sur cette même condition unique et permet d'obtenir ce même type de cristaux aux conditions de 5% de MPD.



**Figure 71 : Cristaux du complexe SEP3<sup>[75-178]</sup>/PHYL1<sub>OY</sub>.** **(A)** Cristaux obtenus après criblage par la plateforme de cristallisation à haut débit CRIMS de l'EMBL et l'IBS à Grenoble. Les conditions sont des tampons d'acétate de sodium 0,1M pH 4,6, chlorure de sodium 2M et d'acétate de sodium 0,1M ph 4,6, formate de sodium 2M à gauche et à droite respectivement. **(B)** Cristaux obtenus au laboratoire avec la condition 0,1M acétate de sodium ph 4,6, 2,04M chlorure de sodium, 5% de MPD. Les cristaux mesurent entre quelques  $\mu\text{m}$  et 100 $\mu\text{m}$ .

Les différents cristaux obtenus sont testés de nombreuses fois sur la ligne de lumière ID23-2 de l'ESRF par Dr. Chloé Zubieta. La meilleure résolution obtenue est de 3,6Å mais n'a pas permis de résoudre la structure du complexe (Tableau 9). Des essais de remplacement moléculaire avec la structure connue de SEP3<sup>[75-178]</sup> (testée en monomère, dimère ou tétramère, 4OX0, Puranik et al. 2014) et celle de PHYL1<sub>OY</sub> (testée en monomère, 6JQA, Iwabuchi et al. 2019) sont réalisés mais restent infructueux. Les conditions de cristallisation doivent encore être optimisées pour obtenir cette structure. Comme pour le complexe SEP3<sup>[75-178]</sup>/AG<sup>[90-189]</sup>, les cristaux pourraient être optimisés en produisant les protéines avec de la sélénométhionine (Hendrickson, Horton, et LeMaster 1990).

SEP3 <sup>[75-178]</sup> /PHYL1 <sub>0Y</sub>		
Groupe d'espace		P6 <sub>1</sub> 22
Dimensions des cellules	a, b, c (Å)	158.6, 158.6, 78.1
	a, b, g (°)	90, 90, 120
Résolution (Å)		48.-3.57 (3.79-3.57)
R <sub>sym</sub> ou R <sub>merge</sub>		15.8 (156)
CC <sub>1/2</sub>		99.6 (34)
Complétude (%)		95.4 (94.0)
Redondance		2.3 (2.3)

**Tableau 9 : Tableau des données collectées après diffraction des cristaux de SEP3<sup>[75-178]</sup>/PHYL1<sub>0Y</sub> sur la ligne de lumière ID23-2 de l'ESRF.** Les données entre parenthèses montrent les données de la meilleure résolution obtenue.

Les cristallogénèses étant en cours, des études de mutagenèse sont réalisées afin d'identifier les domaines précis et acides aminés nécessaires pour l'interaction.

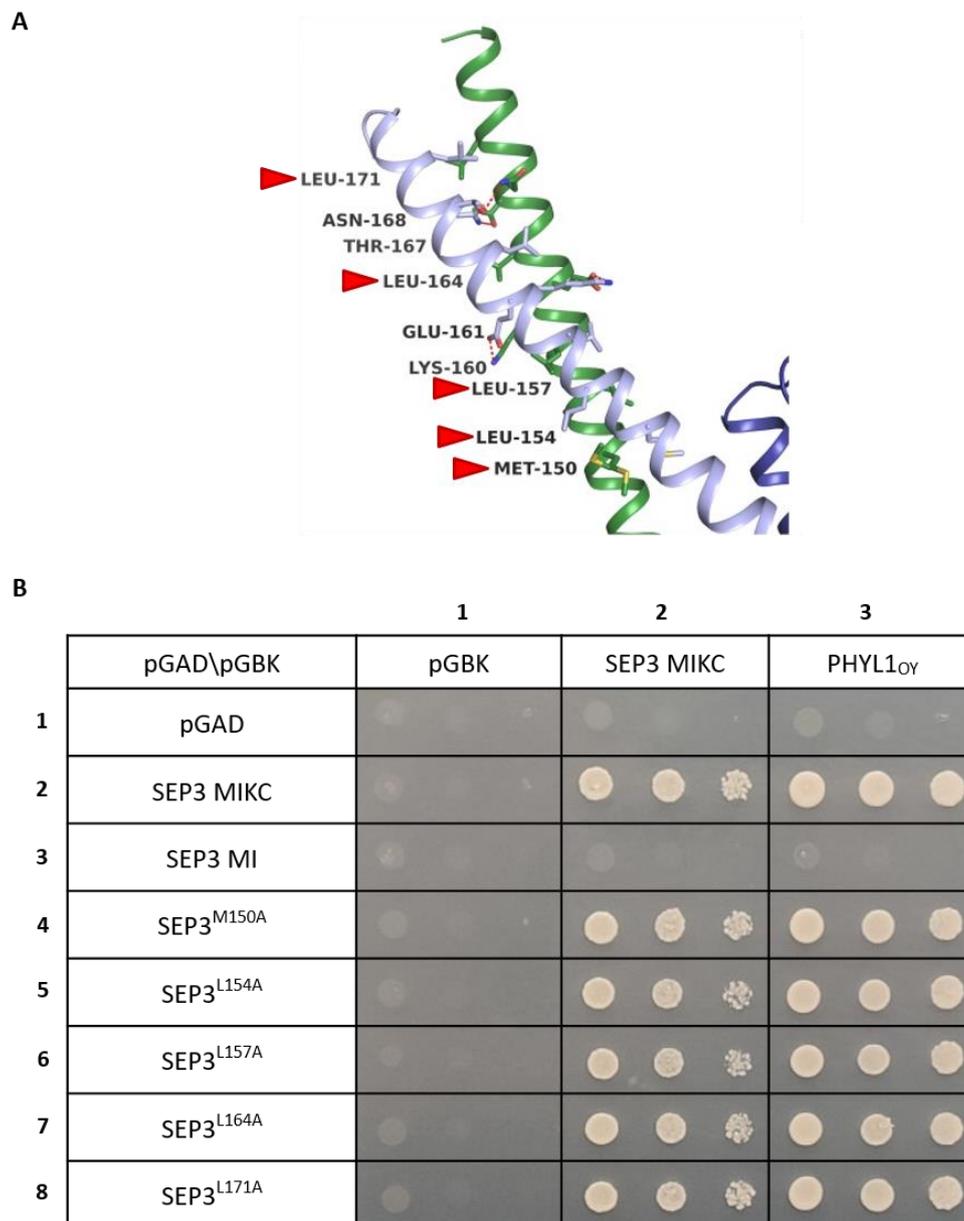
## B. Identification des acides aminés nécessaires pour l'interaction de SEP3 avec PHYL1<sub>0Y</sub> par mutagenèse

### 1. Etude des mutations d'acides aminés hydrophobes de la zone de tétramérisation de SEP3 en Y2H

Les résultats précédents ont montré que PHYL1<sub>0Y</sub> nécessite la zone de tétramérisation de SEP3 pour interagir fortement avec SEP3 ou SEP3/AG. Cette zone est riche en leucines qui permettent l'interaction en leucine-zipper de SEP3 avec d'autres MADS-TFs (Y. Yang et Jack 2004; Puranik et al. 2014; Silva et al. 2016; Rümpler, Theißen, et Melzer 2018; Lai et al. 2019). La littérature suggère également que l'interaction de PHYL1<sub>0Y</sub> et SAP54 avec SEP3 est dépendante d'acides aminés hydrophobes et surtout de leucines qui permettraient leur interaction en leucine-zipper (Iwabuchi et al. 2019; Aurin et al. 2020). Pour déterminer quels acides aminés sont importants pour cette interaction, différents acides aminés hydrophobes de la zone de tétramérisation de SEP3 ont été mutés en alanine, acide aminé hydrophobe non chargé et incapable de réaliser des liaisons hydrogènes. D'abord, des mutations simples des acides aminés M150A, L154A, L157A, L164A et L171A sont réalisées (Figure 72.A) puis les doubles mutations de ces acides aminés ainsi qu'une mutation triple et quadruple de ces acides aminés. Certaines de ces mutations sont testées en Y2H puis en EMSA avec en contrôle

négatif SEP3MI. Il est important de noter que la double mutation SEP3<sup>L154A+L157A</sup> n'a pas été testée car il n'a pas été possible de l'obtenir par mutagenèse.

Les résultats de Y2H montrent que l'interaction avec PHYL1<sub>0Y</sub> n'est pas affectée avec les versions de SEP3 comportant des mutations simples. Ceci indique que chaque mutation seule n'empêche pas l'interaction entre PHYL1<sub>0Y</sub> et ces versions mutées de SEP3 (Figure 72.B).

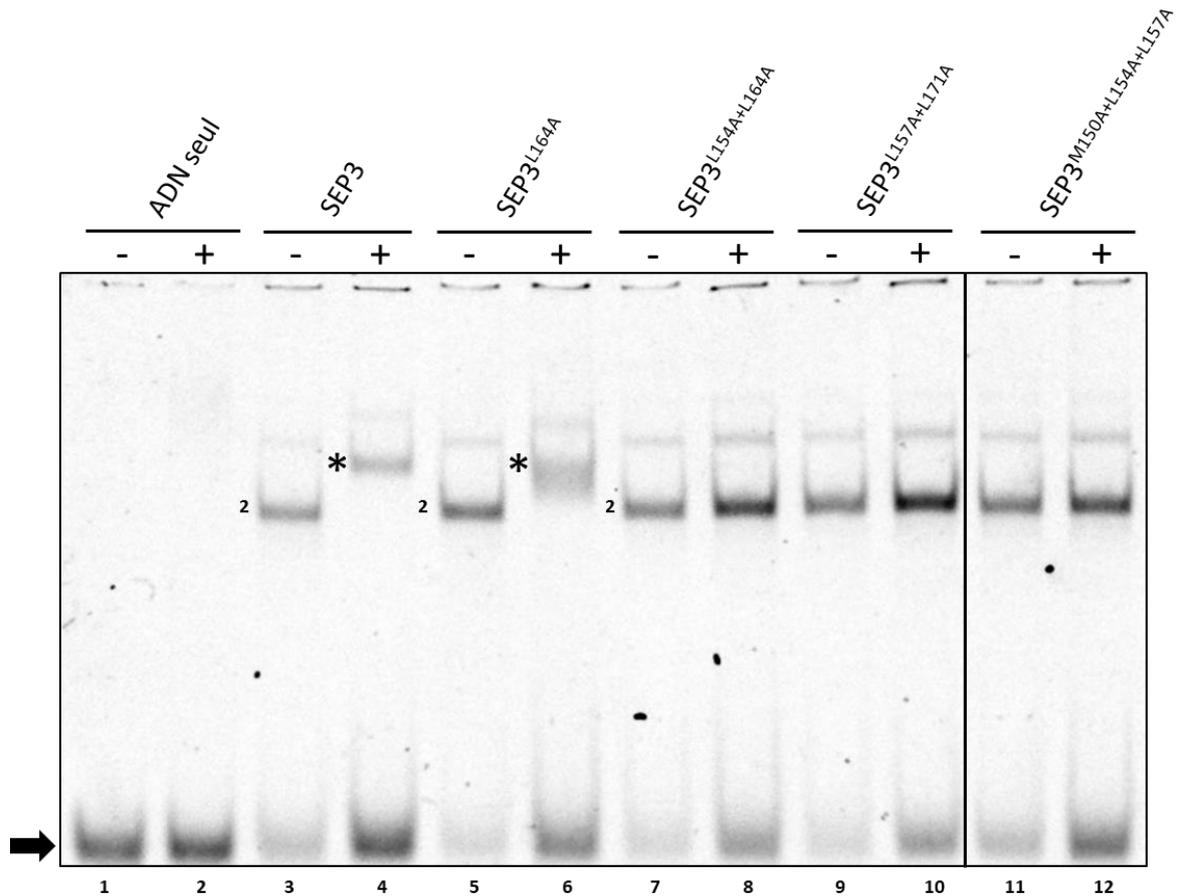


**Figure 72 : Etude de l'interaction entre PHYL1<sub>0Y</sub> et des versions de SEP3 comportant des mutations simples d'acides aminés hydrophobes de la zone de tétramérisation. (A)** Schéma des substitutions en alanines réalisées (flèches rouges) sur la zone de tétramérisation de SEP3. **(B)** Expérience de Yeast-Two-Hybrid de différents simples mutants de SEP3 décrits en (A) avec SEP3 et PHYL1<sub>0Y</sub>. Les échantillons SEP3 MIKC et SEP3 MI utilisés en contrôles positif et négatif correspondent aux constructions SEP3<sup>1-252]</sup> et SEP3<sup>1-90]</sup> respectivement. Les mutations ont été réalisées sur la version MIKC de SEP3. La photographie est prise après 4 jours d'incubation.



## 2. Etude des mutations d'acides aminés hydrophobes de la zone de tétramérisation de SEP3 en EMSA

Comme nous avons vu précédemment que les EMSAs reproduisent fidèlement les résultats obtenus avec les domaines K purifiés des protéines natives (Figure 65 et Figure 66), certains mutants testés en Y2H précédemment (Figure 72 et Figure 73) sont également testés en EMSA pour confirmer ou non les pertes d'interactions de ces mutants. Ici, les versions SEP3 MIKC (SEP3<sup>[1-252]</sup>), SEP3<sup>L164A</sup>, SEP3<sup>L154A+L164A</sup>, SEP3<sup>L157A+L171A</sup> et SEP3<sup>M150A+L154A+L164A</sup> sont testées (Figure 74). Les résultats montrent qu'avec la mutation L164A (astérisque puit 6, Figure 74), le retard de la migration semble très légèrement affecté comparé au retard d'un dimère de SEP3 sauvages interagissant avec PHYL1<sub>0Y</sub> (astérisque puit 4, Figure 74). Ceci suggère que l'interaction avec PHYL1<sub>0Y</sub> est faiblement affectée et corrèle bien avec les données de Y2H (Figure 72). Les mutations L154A+L164A et L157A+L171A semblent empêcher complètement l'interaction puisqu'aucun retard de migration n'est observé comparé aux puits sans PHYL1<sub>0Y</sub> (puits 7 à 10, Figure 74). De même, la version SEP3<sup>M150A+L154A+L164A</sup> ne présentent aucune différence entre les puits avec ou sans PHYL1<sub>0Y</sub>, suggérant une rupture complète de l'interaction (puits 11 à 14, Figure 74). Les résultats de Y2H et d'EMSA sont cohérents et montrent que les acides aminés hydrophobes, et plus spécifiquement les leucines, de la zone de tétramérisation de SEP3 sont nécessaires pour son interaction avec PHYL1<sub>0Y</sub>. En effet, deux mutations de leucines en alanines sont suffisantes pour complètement rompre l'interaction entre SEP3 et PHYL1<sub>0Y</sub>. Ces mutations rompent la succession de leucines sur la même face de l'hélice de SEP3 et empêchent l'interaction, très vraisemblablement de type leucine-zipper, avec PHYL1<sub>0Y</sub>. Il serait intéressant d'étudier l'impact de ces mutations sur la liaison d'un hétérocomplexe de SEP3muté/AG avec PHYL1<sub>0Y</sub>.



**Figure 74 : Impact de GST-PHYL1<sub>OY</sub> sur la liaison à l'ADN d'homodimères de SEP3 sauvages ou comportant des mutations simple, doubles, triple et quadruple d'acides aminés hydrophobes de la zone de tétramérisation.** Electrophoretic mobility shift assay d'homodimères de SEP3 sauvages (SEP3<sup>[1-252]</sup>), de SEP3<sup>L164A</sup>, de SEP3<sup>L154A+L164A</sup>, de SEP3<sup>L157A+L171A</sup> et de SEP3<sup>M150A+L154A+L157A</sup> mis en contact avec et sans GST-PHYL1<sub>OY</sub> (+ et - respectivement) avec de l'ADN marqué du promoteur de SEP3 contenant une CARG-box. Les astérisques montrent l'apparition d'un nouveau complexe et les numéros 2 représentent des dimères. Le trait plein montre une coupure réalisée entre deux gels différents. La protéine GST-PHYL1<sub>OY</sub> est ajoutée à 667nM. La flèche noire montre l'ADN libre.

### 3. Etude des acides aminés hydrophobes chez les autres MADS-TFs du FQM

Dans la mesure où les leucines de la zone de tétramérisation sont nécessaires pour l'interaction avec PHYL1<sub>OY</sub>, je me suis intéressé à la séquence de la zone de tétramérisation des autres MADS-TFs du FQM (Figure 75.A). Les acides aminés hydrophobes semblent conservés chez tous ces MADS-TFs à l'exception d'AP3 et PI qui n'interagissent pas avec PHYL1<sub>OY</sub> (Figure 41). Il semble raisonnable de supposer qu'avec des acides aminés hydrophobes aux positions clés vues précédemment (acides aminés 150, 154, 157, 164 et 171), AP3 et PI pourraient interagir avec PHYL1<sub>OY</sub>. PI présente une importante délétion dans cette zone et ne représente donc pas un outil intéressant pour cette hypothèse. En revanche,



La version tronquée sauvage AP3 IKC (AP3<sup>[59-233]</sup>) ainsi que les versions mutées AP3 IKC<sup>T150L</sup>, AP3 IKC<sup>Q157L</sup> et AP3 IKC<sup>T150L+Q157L</sup> sont testées en Y2H avec PHYL1<sub>OY</sub> (Figure 75.C, colonne 3). Les résultats montrent qu'AP3 IKC interagit fortement avec SEP3 et AG comme attendu (Riechmann, Krizek, et Meyerowitz 1996) mais pas avec PHYL1<sub>OY</sub>. Les versions mutées AP3 IKC<sup>T150L</sup> et AP3 IKC<sup>Q157L</sup> interagissent toujours avec SEP3 et AG et n'interagissent toujours pas avec PHYL1<sub>OY</sub> (Figure 75.C, lignes 2 et 3 respectivement). En revanche, la version double mutante AP3 IKC<sup>T150L+Q157L</sup> interagit avec PHYL1<sub>OY</sub> et SEP3 alors que son interaction avec AG est affaiblie (Figure 75.C, ligne 4). Il semblerait donc que la succession de leucines sur une face de l'hélice  $\alpha$  facilite l'interaction avec PHYL1<sub>OY</sub>.

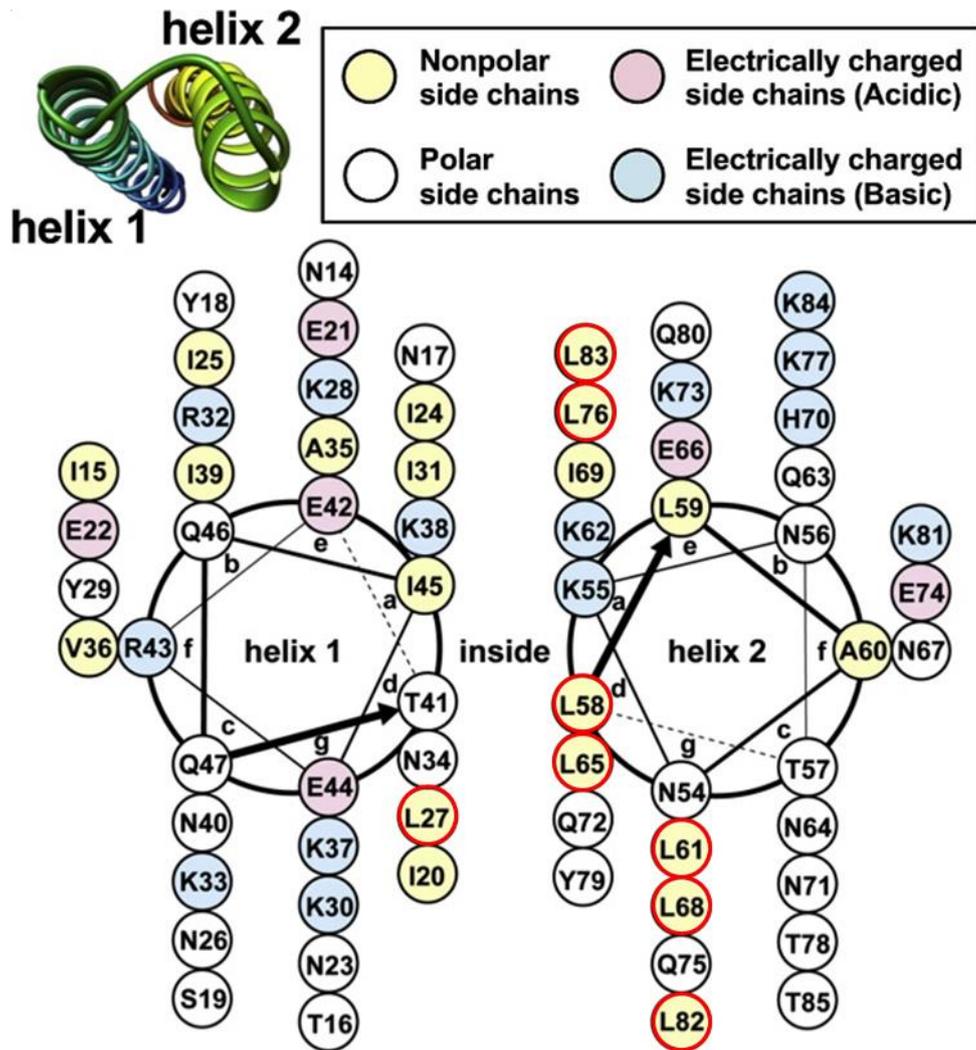
Il est important de noter que la double mutation AP3<sup>T150L+Q157L</sup> a déjà été réalisée dans la littérature (Rümppler, Theißen, et Melzer 2018). Dans cette étude, deux versions chimériques de SEP3 sont réalisées : SEP3<sup>AP3chim</sup> dont la zone de tétramérisation (acides aminés 150 à 171) est remplacée par celle d'AP3 sauvage (acides aminés 143 à 164) et SEP3<sup>AP3T150L+Q157Lchim</sup> dont la zone de tétramérisation est remplacée par celle d'AP3<sup>T150L+Q157L</sup>. Les versions sauvages et chimériques de SEP3 sont testées en EMSA et montrent que SEP3 se trouve majoritairement en homotétramère, SEP3<sup>AP3chim</sup> se trouve à 50% en homotétramère et 50% en homodimère, et que SEP3<sup>AP3T150L+Q157Lchim</sup> se trouve uniquement en homotétramère. Ceci montre que la double mutation réalisée améliore très fortement la capacité à homotétramériser de SEP3<sup>AP3T150L+Q157Lchim</sup> par rapport à SEP3<sup>AP3chim</sup> et même par rapport à SEP3 (Rümppler, Theißen, et Melzer 2018). Il est donc très probable qu'AP3 IKC<sup>T150L+Q157L</sup> soit plus affiné à homooligomériser qu'à interagir avec d'autres MADS. Ceci pourrait expliquer la faible interaction d'AP3 IKC<sup>T150L+Q157L</sup> avec AG comparée à celle d'AP3 IKC avec AG.

Cette expérience n'a été réalisée qu'une seule fois et ces résultats restent donc à confirmer en Y2H mais aussi en EMSA. Pour réaliser cette expérience en EMSA, il serait judicieux de former un dimère d'AP3/PI et un dimère d'AP3<sup>T150L+Q157L</sup>/PI. GST-PHYL1<sub>OY</sub> ne devrait pas interagir avec le premier dimère mais pourrait possiblement interagir avec le second dimère en utilisant AP3<sup>T150L+Q157L</sup> comme point d'ancrage, de la même manière qu'elle utilise SEP3 comme point d'accroche pour le complexe SEP3/AG.

### C. Modèles d'interaction de PHYL1<sub>0Y</sub> avec les dimères de MADS

D'après les résultats précédents, PHYL1<sub>0Y</sub> interagit avec les leucines de la zone de tétramérisation du domaine K de SEP3 des dimères de SEP3 et de SEP3/AG. Ce domaine de SEP3 est nécessaire et suffisant pour l'interaction avec un dimère de SEP3 et de SEP3/AG mais la présence d'AG semble renforcer l'interaction. Ainsi dans nos modèles ci-dessous, la zone de tétramérisation de SEP3 sera considérée comme le point d'ancrage fort de l'interaction et AG sera considéré comme un second point d'interaction plus faible mais facilitant l'interaction entre PHYL1<sub>0Y</sub> et SEP3/AG.

PHYL1<sub>0Y</sub> est composé de deux hélices. On peut donc se demander si les deux hélices sont importantes pour l'interaction ou si l'une d'entre elles est l'acteur majeur. De nombreuses études ont montré que les deux hélices et surtout les acides aminés hydrophobes de ces deux hélices sont nécessaires à l'interaction (Figure 31) (Iwabuchi et al. 2019; 2020; Liao et al. 2019; Aurin et al. 2020). Il est important de noter que, dans ces études, la majorité des substitutions réalisées provoquent une rupture du motif hélicoïdal et que les insertions réalisées changent les successions d'acides aminés (comme les leucines) exposés sur la même face de l'hélice. Il est donc possible que ces pertes d'interaction soient dues à des modifications de structure et de succession des acides aminés exposés sur les faces des hélices plutôt qu'aux acides aminés spécifiquement mutés. Une étude sur PHYL1<sub>P<sub>N</sub>WB</sub> a montré qu'une double substitution d'acides aminés hydrophobes en lysines sur la deuxième hélice de cette protéine rompt l'interaction avec le domaine K de SEP3, alors qu'une double substitution d'acides aminés hydrophobes en lysines sur la première hélice affecte légèrement l'interaction (Liao et al. 2019). Ceci montre que les deux hélices semblent importantes pour l'interaction mais que la deuxième est nécessaire pour cette interaction. En étudiant la séquence des deux hélices, on peut noter que la seconde hélice semble plus propice à l'interaction en leucine-zipper. En effet, elle contient huit leucines exposées sur trois faces côte à côte alors que l'autre hélice ne contient qu'une leucine (Figure 76). La seconde hélice semble donc plus propice à réaliser des interactions hydrophobiques fortes que la première ; c'est pourquoi elle sera privilégiée dans nos modèles. Comme supposé précédemment, PHYL1<sub>0Y</sub> pourrait se comporter comme SEP3/AG avec une zone d'interaction forte (seconde hélice) et une zone d'interaction plus faible (première hélice).

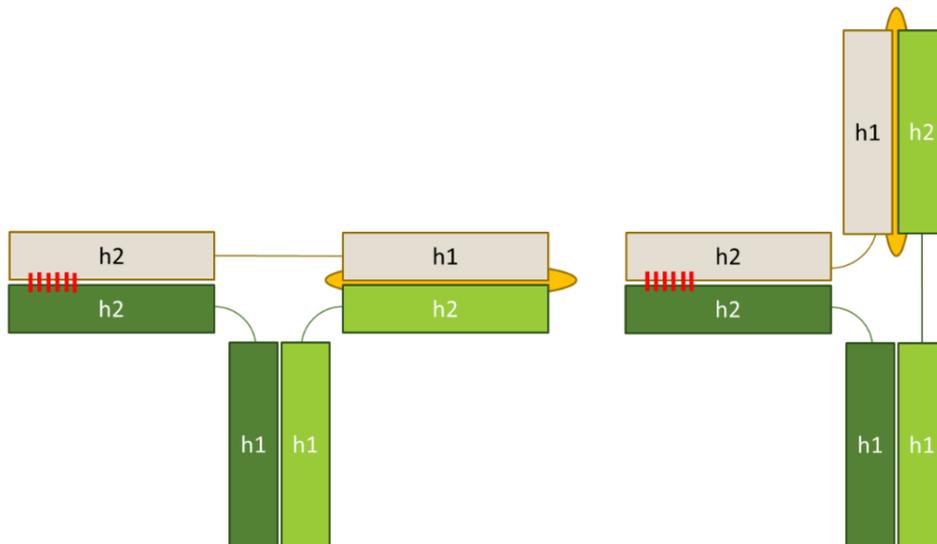


**Figure 76 : Représentation en roue hélicoïdale de la séquence des deux hélices de PHYL1<sub>OY</sub>.** Les acides aminés hydrophobes sont colorés en jaune et les leucines sont entourées en rouge d'après Iwabuchi et al. 2019.

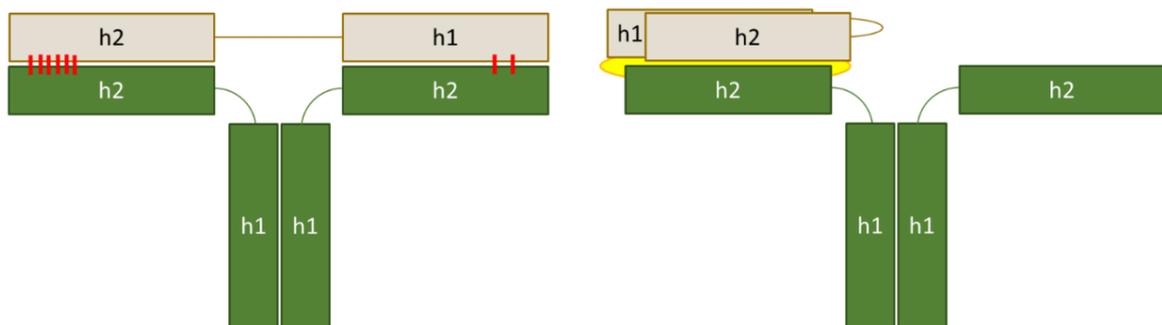
Grâce aux résultats obtenus dans cette étude et dans la littérature, différents modèles ont pu être imaginés (Figure 77). Pour l'interaction entre PHYL1<sub>OY</sub> et SEP3<sup>[75-178]</sup>/AG<sup>[90-189]</sup>, deux modèles peuvent être supposés. Ces deux modèles sont globalement similaires avec deux zones d'interaction : une zone d'interaction forte en leucine-zipper entre la zone de tétramérisation de SEP3<sup>[75-178]</sup> et la deuxième hélice de PHYL1<sub>OY</sub>, et une seconde zone d'interaction moins forte entre la deuxième hélice du domaine K d'AG et la première hélice de PHYL1<sub>OY</sub> (Figure 77.A). Cette deuxième zone d'interaction pourrait être une interaction en leucine-zipper moins forte ou plus largement une interaction hydrophobique en coiled-coil. La différence entre ces deux modèles réside dans la conformation qu'adopterait AG dans l'hétérodimère : une conformation semblable à un homodimère de SEP3 (Figure 77.A gauche) ou une conformation plus ouverte (Figure 77.A droite). Cette interaction est plus forte que

l'interaction entre SEP3 et PHYL1<sub>0Y</sub>. Comme nous l'avons suggéré précédemment, c'est en dimérisant avec SEP3, qu'AG interagit plus fortement avec PHYL1<sub>0Y</sub> et permet de rendre l'interaction entre SEP3/AG et PHYL1<sub>0Y</sub> plus forte qu'entre SEP3/SEP3 et PHYL1<sub>0Y</sub>. Il est également possible que, comme supposé précédemment, SEP3/AG et PHYL1<sub>0Y</sub> soient similaires en présentant un site fort et un site faible d'interaction chacun. Ceci pourrait rendre cette interaction plus forte qu'avec SEP3/SEP3 qui présente deux sites forts d'interaction ne pouvant pas forcément interagir pleinement avec le site faible d'interaction de PHYL1<sub>0Y</sub>.

A



B



**Figure 77 : Modèles d'interaction de PHYL1<sub>0Y</sub> avec des dimères de SEP3/AG et de SEP3. (A)** Modèles d'interaction de PHYL1<sub>0Y</sub> (gris) avec un dimère de SEP3/AG (vert foncé/vert clair) avec AG en conformation ouverte (gauche) ou plus fermée (droite). **(B)** Modèles d'interaction de PHYL1<sub>0Y</sub> (gris) avec un dimère de SEP3 (vert foncé). A gauche, la deuxième hélice de PHYL1<sub>0Y</sub> interagit avec la zone de tétramérisation d'une hélice de SEP3 alors qu'à droite chaque hélice de PHYL1<sub>0Y</sub> interagit avec la même zone de tétramérisation d'une hélice de SEP3. Les cercles jaune et orange et les traits rouges représentent la zone hydrophobe permettant l'interaction en coiled-coil des trois hélices, une zone d'interaction hydrophobique en coiled-coil ou un en leucine-zipper moins forte et les leucines permettant l'interaction en leucine-zipper respectivement.

Pour l'interaction entre PHYL1<sub>0Y</sub> et SEP3<sup>[75-178]</sup>, deux modèles peuvent être supposés. Le premier modèle comprend deux zones d'interaction : la zone d'interaction en leucine-zipper

forte entre la deuxième hélice de PHYL1<sub>0Y</sub> et une des zones de tétramérisation d'une hélice de SEP3<sup>[75-178]</sup>, et la zone d'interaction en leucine-zipper faible entre la première hélice de PHYL1<sub>0Y</sub> et la zone de tétramérisation de l'autre hélice de SEP3<sup>[75-178]</sup> (Figure 77.B gauche). Le deuxième modèle ne comprend qu'une zone d'interaction : une interaction coiled-coil très forte entre les deux hélices de PHYL1<sub>0Y</sub> et la zone de tétramérisation d'une hélice de SEP3<sup>[75-178]</sup> (Figure 77.B droite). Il est possible que ces deux modèles soient en équilibre selon l'environnement dans lequel se trouve ce complexe. Par exemple, si PHYL1<sub>0Y</sub> est également en train d'interagir avec RAD23, l'interaction est peut-être plus semblable au premier modèle pour libérer davantage la première hélice de PHYL1<sub>0Y</sub>.

Ces modèles sont en cours d'études. En parallèle des analyses de cristallogénèse et de diffraction aux rayons X, des expériences permettant de déterminer des changements de conformation des constituants du complexe (expériences de FRET) et une structure à faible résolution (expériences de SAXS) sont initiées.

---

### *En résumé*

---

Ce travail a permis d'initier l'analyse de la structure tridimensionnelle des complexes SEP3/AG/PHYL1<sub>0Y</sub> et SEP3/SEP3/PHYL1<sub>0Y</sub> afin de déterminer les acides aminés d'interaction. La structure tridimensionnelle n'a pas pu être caractérisée mais des analyses ciblées de mutagénèse montrent que les acides aminés hydrophobes de la zone de tétramérisation de SEP3 sont nécessaires pour son interaction avec PHYL1<sub>0Y</sub>. En effet, il est possible de diminuer l'interaction avec une substitution de leucine en alanine et de fortement réduire l'interaction en substituant deux leucines en alanines. Il semble même possible de faire interagir AP3 avec PHYL1<sub>0Y</sub> en substituant deux acides aminés non hydrophobes de sa zone de tétramérisation en leucines. Ceci nous confirme que PHYL1<sub>0Y</sub> utilise les successions de leucines pour réaliser des interactions en leucine-zipper avec les MADS-TFs du FQM.

# Conclusions et perspectives

Les MADS-TFs sont des acteurs très importants du développement des angiospermes comme notre organisme modèle *A. thaliana*. Ils interviennent tout au long du cycle de vie de ces plantes et ont été particulièrement étudiés dans le contexte de la floraison. Certaines bactéries parasitaires appelées phytoplasmes ciblent certains de ces MADS-TFs et induisent d'importants phénotypes floraux conduisant à la stérilité de la plante et à de très fortes pertes économiques de culture agronomiques. Ici j'ai caractérisé l'interaction d'un des effecteurs de ces bactéries, appelé PHYL1<sub>OY</sub>, avec un des complexes de MADS qu'il cible, l'hétérocomplexe de SEP3/AG primordial pour le développement du quatrième verticille, les carpelles.

## PHYL1<sub>OY</sub> cible les complexes MADS impliqués dans la morphogénèse florale et empêche leur fonctionnement *in vivo*

PHYL1<sub>OY</sub> interagit en Y2H avec les MADS-TFs SEP1-4, AP1 et AG impliqués dans la morphogénèse florale mais n'interagit pas avec les MADS-TFs AP3 et PI. L'expression de PHYL1<sub>OY</sub> *in planta* sous le contrôle de différents promoteurs a permis de montrer que son expression est délétère pour l'ensemble des organes floraux (Chapitre III.I). Les sépales et les carpelles (déterminés par les complexes SEP/AP1 et SEP/AG respectivement) sont les organes les plus sensibles et suggèrent que PHYL1<sub>OY</sub> cible et dégrade particulièrement les complexes SEP/AP1 et SEP/AG. L'expression de PHYL1<sub>OY</sub> sous le contrôle des promoteurs de gènes MADS a permis de retrouver les phénotypes des mutants correspondants et a montré que cette expression est restreinte aux couronnes dans lesquelles le gène est exprimé. PHYL1<sub>OY</sub> semble donc être un outil adapté pour muter spécifiquement certains gènes avec lesquels il interagit.

L'obtention de lignées stables de ces plantes transgéniques, notamment des lignées exprimant *AP1::PHYL1<sub>OY</sub>* qui produisent des graines, pourrait représenter un outil très adapté pour l'étude d'inhibiteurs de l'interaction PHYL1<sub>OY</sub>/MADS-TFs. Ces inhibiteurs pourraient être des petites molécules obtenues en criblant (par Y2H par exemple) une librairie de celles-ci contre les MADS-TFs ciblés par PHYL1<sub>OY</sub> et PHYL1<sub>OY</sub>. L'interaction de ces molécules avec PHYL1<sub>OY</sub> et les MADS-TFs ciblés par PHYL1<sub>OY</sub> pourrait être étudiée *in vitro* et les molécules interagissant plus fortement avec PHYL1<sub>OY</sub> qu'avec les MADS-TFs peuvent être considérées comme inhibiteurs. En exprimant ces inhibiteurs dans les plantes exprimant *AP1::PHYL1<sub>OY</sub>*, il est attendu que les phénotypes observés s'atténuent. Les inhibiteurs atténuant les

phénotypes des plantes exprimant *AP1::PHYL1<sub>0Y</sub>*, pourraient être développés en produit phytosanitaire à sprayer sur les cultures agronomiques touchées.

## PHYL1<sub>0Y</sub> cible des dimères de MADS par leur domaine K

Aux vues des forts phénotypes sur les carpelles, induisant la stérilité de la plante, nous avons étudié l'interaction de PHYL1<sub>0Y</sub> avec l'hétérocomplexe SEP3/AG (Chapitre III.II) et par extension avec les homocomplexes de SEP3 et d'AG. PHYL1<sub>0Y</sub> interagit avec le domaine K de SEP3. Des études biochimiques sur les domaines K de SEP3/AG, de SEP3 et d'AG ont permis de déterminer la stœchiométrie et les constantes d'affinité des complexes PHYL1<sub>0Y</sub>/SEP3/AG et PHYL1<sub>0Y</sub>/SEP3. Ces analyses montrent que PHYL1<sub>0Y</sub> interagit en monomère avec des dimères des MADS SEP3/AG et SEP3/SEP3 et est beaucoup plus affin pour SEP3/AG que pour SEP3/SEP3 alors qu'il n'interagit pas avec AG seul. L'utilisation d'EMSA a permis de confirmer ces données sur les protéines entières et de montrer que le complexe PHYL1<sub>0Y</sub>/MADS peut toujours lier à l'ADN. Ces analyses ont également montré que la zone de tétramérisation de SEP3 est nécessaire et suffisante pour l'interaction entre SEP3/AG et PHYL1<sub>0Y</sub>. Cette zone servirait de point d'ancrage pour cette interaction que la présence d'AG semble renforcer. Le complexe SEP3/AP1 est en cours d'analyse dans l'équipe et son interaction avec PHYL1<sub>0Y</sub> analysée. Il sera intéressant de découvrir si AP1 assure le même rôle que SEP3. Il serait donc possible que le complexe SEP3/AP1 agisse à la manière du complexe SEP3/SEP3 en présentant deux zones fortes d'interaction qui ne permettent pas une interaction aussi forte qu'avec SEP3/AG.

## PHYL1<sub>0Y</sub> imitateur de la zone de tétramérisation des MADS

Par des expérimentations de Y2H et d'EMSA (Chapitre III.III), nous avons restreint l'interaction de PHYL1<sub>0Y</sub> aux acides aminés hydrophobes de la zone de tétramérisation de SEP3. PHYL1<sub>0Y</sub> cible spécifiquement des successions de leucines caractéristiques des interactions en leucine-zipper. Ces interactions sont très utilisées par les MADS-TFs pour interagir en dimère et en tétramère. Les phytoplasmes ont certainement évolué pour créer des effecteurs phyllogènes imitant la zone de tétramérisation des MADS pour interagir avec eux. Ces différents indices nous ont permis d'élaborer plusieurs modèles d'interaction mais pour confirmer ces hypothèses, les structures tridimensionnelles de ces complexes sont nécessaires (en cours). Grâce à ces données, il serait possible de muter les MADS-TFs ciblés par PHYL1<sub>0Y</sub> pour les

rendre moins favorables à cette interaction, tout en n'affectant pas leur fonction *in planta*. Les plantes, ainsi générées, pourraient constituer les premières plantes « insensibles » à PHYL1<sub>OY</sub>, et potentiellement à la phyllodie.

Ces travaux ont eu pour but de caractériser l'interaction de PHYL1<sub>OY</sub> avec les MADS afin de mieux la comprendre et de déboucher, à plus long terme, sur des stratégies de lutttes efficaces contre ce parasite. En effet, à l'heure actuelle aucun traitement efficace n'est proposé contre les invasions de phytoplasmes à part l'arrachage des plants infectés et la lutte contre les insectes vecteurs. Nos travaux permettent de comprendre davantage comment PHYL1<sub>OY</sub> cible spécifiquement certains complexes de MADS *in planta* et pourraient déboucher sur la production d'inhibiteurs de ces interactions, protégeant ainsi les cultures agronomiques ciblées par PHYL1<sub>OY</sub>. Grâce aux connaissances que nous avons apportées sur les acides aminés des MADS-TFs ciblés par PHYL1<sub>OY</sub>, il serait également possible de générer des plantes présentant des mutations de ces MADS-TFs pouvant ainsi éviter d'être ciblés par PHYL1<sub>OY</sub>. Dans le contexte d'une agriculture qui tend à nourrir de plus en plus de personnes et à employer de plus en plus d'intrants écologiques, il semble de toute importance de comprendre comment ces effecteurs bactériens ciblent les MADS et de trouver des moyens écoresponsables de lutter contre eux.

# Références bibliographiques

- Adamczyk, Benjamin J., et Donna E. Fernandez. 2009. « MIKC\* MADS Domain Heterodimers Are Required for Pollen Maturation and Tube Growth in Arabidopsis ». *Plant Physiology* 149 (4): 1713-23. <https://doi.org/10.1104/pp.109.135806>.
- Aguilar-Martínez, José Antonio, César Poza-Carrión, et Pilar Cubas. 2007. « Arabidopsis BRANCHED1 Acts as an Integrator of Branching Signals within Axillary Buds ». *The Plant Cell* 19 (2): 458-72. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.048934>.
- Alvarez-Buylla, Elena R., Soraya Pelaz, Sarah J. Liljegren, Scott E. Gold, Caroline Burgeff, Gary S. Ditta, Lluís Ribas de Pouplana, León Martínez-Castilla, et Martin F. Yanofsky. 2000. « An ancestral MADS-box gene duplication occurred before the divergence of plants and animals ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (10): 5328-33.
- Anabestani, Ameneh, Keramat Izadpanah, Simona Abbà, Luciana Galetto, Abozar Ghorbani, Sabrina Palmano, Majid Siampour, Flavio Veratti, et Cristina Marzachi. 2017. « Identification of Putative Effector Genes and Their Transcripts in Three Strains Related to 'Candidatus Phytoplasma Aurantifolia' ». *Microbiological Research* 199 (juin): 57-66. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.03.001>.
- Angenent, G. C., et L. Colombo. 1996. « Molecular Control of Ovule Development ». *Trends in Plant Science* 1 (7): 228-32. [https://doi.org/10.1016/1360-1385\(96\)86900-7](https://doi.org/10.1016/1360-1385(96)86900-7).
- Angenent, G. C., J. Franken, M. Busscher, A. van Dijken, J. L. van Went, H. J. Dons, et A. J. van Tunen. 1995. « A Novel Class of MADS Box Genes Is Involved in Ovule Development in Petunia ». *The Plant Cell* 7 (10): 1569-82. <https://doi.org/10.1105/tpc.7.10.1569>.
- Arndt, Katja M., Joelle N. Pelletier, Kristian M. Müller, Andreas Plückthun, et Tom Alber. 2002. « Comparison of In Vivo Selection and Rational Design of Heterodimeric Coiled Coils ». *Structure* 10 (9): 1235-48. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(02\)00838-9](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(02)00838-9).
- Aurin, Marc-Benjamin, Michael Haupt, Matthias Görlach, Florian Rümpler, et Günter Theißen. 2020. « Structural Requirements of the Phytoplasma Effector Protein SAP54 for Causing Homeotic Transformation of Floral Organs ». *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI* 33 (9): 1129-41. <https://doi.org/10.1094/MPMI-02-20-0028-R>.
- Bai, Xiaodong, Valdir R. Correa, Tania Y. Toruño, El-Desouky Ammar, Sophien Kamoun, et Saskia A. Hogenhout. 2009. « AY-WB Phytoplasma Secretes a Protein That Targets Plant Cell Nuclei ». *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI* 22 (1): 18-30. <https://doi.org/10.1094/MPMI-22-1-0018>.
- Bai, Xiaodong, Jianhua Zhang, Adam Ewing, Sally A. Miller, Agnes Jancso Radek, Dmitriy V. Shevchenko, Kiryl Tsukerman, et al. 2006. « Living with Genome Instability: The Adaptation of Phytoplasmas to Diverse Environments of Their Insect and Plant Hosts ». *Journal of Bacteriology* 188 (10): 3682-96. <https://doi.org/10.1128/JB.188.10.3682-3696.2006>.
- Becker, Annette, et Günter Theissen. 2003. « The Major Clades of MADS-Box Genes and Their Role in the Development and Evolution of Flowering Plants ». *Molecular Phylogenetics and Evolution* 29 (3): 464-89. [https://doi.org/10.1016/s1055-7903\(03\)00207-0](https://doi.org/10.1016/s1055-7903(03)00207-0).
- Bell, E., R. A. Creelman, et J. E. Mullet. 1995. « A Chloroplast Lipooxygenase Is Required for Wound-Induced Jasmonic Acid Accumulation in Arabidopsis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (19): 8675-79. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.19.8675>.

- Bensmihen, Sandra, Alexandra To, Guillaume Lambert, Thomas Kroj, Jérôme Giraudat, et François Parcy. 2004. « Analysis of an Activated ABI5 Allele Using a New Selection Method for Transgenic Arabidopsis Seeds ». *FEBS Letters* 561 (1-3): 127-31. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(04\)00148-6](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(04)00148-6).
- Bernier, G., A. Havelange, C. Houssa, A. Petitjean, et P. Lejeune. 1993. « Physiological Signals That Induce Flowering ». *The Plant Cell* 5 (10): 1147-55. <https://doi.org/10.1105/tpc.5.10.1147>.
- Bertaccini, Assunta, Bojan Duduk, Samanta Paltrinieri, et Nicoletta Contaldo. 2014. « Phytoplasmas and Phytoplasma Diseases: A Severe Threat to Agriculture ». *American Journal of Plant Sciences* 05 (12): 1763-88. <https://doi.org/10.4236/ajps.2014.512191>.
- Blobel, G, et B Dobberstein. 1975. « Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. » *Journal of Cell Biology* 67 (3): 835-51. <https://doi.org/10.1083/jcb.67.3.835>.
- Bowman, J. L., J. Alvarez, D. Weigel, E. M. Meyerowitz, et D. R. Smyth. 1993. « Control of flower development in Arabidopsis thaliana by APETALA1 and interacting genes ». *Development* 119 (3): 721-43. <https://doi.org/10.1242/dev.119.3.721>.
- Bowman, J L, D R Smyth, et E M Meyerowitz. 1989. « Genes directing flower development in Arabidopsis. » *The Plant Cell* 1 (1): 37-52. <https://doi.org/10.1105/tpc.1.1.37>.
- Chang, Shu Heng, Choon Meng Tan, Chih-Tang Wu, Tzu-Hsiang Lin, Shin-Ying Jiang, Ren-Ci Liu, Ming-Chen Tsai, Li-Wen Su, et Jun-Yi Yang. 2018. « Alterations of plant architecture and phase transition by the phytoplasma virulence factor SAP11 ». *Journal of Experimental Botany* 69 (22): 5389-5401. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery318>.
- Chin, David, et Anthony R Means. 2000. « Calmodulin: A Prototypical Calcium Sensor ». *Trends in Cell Biology* 10 (8): 322-28. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(00\)01800-6](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(00)01800-6).
- Cho, S., S. Jang, S. Chae, K. M. Chung, Y. H. Moon, G. An, et S. K. Jang. 1999. « Analysis of the C-Terminal Region of Arabidopsis Thaliana APETALA1 as a Transcription Activation Domain ». *Plant Molecular Biology* 40 (3): 419-29. <https://doi.org/10.1023/a:1006273127067>.
- Cho, Shu-Ting, Chan-Pin Lin, et Chih-Horng Kuo. 2019. « Genomic Characterization of the Periwinkle Leaf Yellowing (PLY) Phytoplasmas in Taiwan ». *Frontiers in Microbiology* 10 (septembre): 2194. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02194>.
- Chung, Wan-Chia, Ling-Ling Chen, Wen-Sui Lo, Chan-Pin Lin, et Chih-Horng Kuo. 2013. « Comparative Analysis of the Peanut Witches'-Broom Phytoplasma Genome Reveals Horizontal Transfer of Potential Mobile Units and Effectors ». *PLoS ONE* 8 (4): e62770. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062770>.
- Citti, C., E. Dordet-Frisoni, L. X. Nouvel, C. H. Kuo, et E. Baranowski. 2018. « Horizontal Gene Transfers in Mycoplasmas (Mollicutes) ». *Current Issues in Molecular Biology* 29: 3-22. <https://doi.org/10.21775/cimb.029.003>.
- Clough, Steven J., et Andrew F. Bent. 1998. « Floral Dip: A Simplified Method for Agrobacterium -Mediated Transformation of Arabidopsis Thaliana ». *The Plant Journal* 16 (6): 735-43. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1998.00343.x>.
- Coen, E. S., et E. M. Meyerowitz. 1991. « The War of the Whorls: Genetic Interactions Controlling Flower Development ». *Nature* 353 (6339): 31-37. <https://doi.org/10.1038/353031a0>.

- Creelman, Robert A., et John E. Mullet. 1997. « Biosynthesis and Action of Jasmonates in Plants ». *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48 (1): 355-81. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.48.1.355>.
- Crick, F. H. C. 1952. « Is  $\alpha$ -Keratin a Coiled Coil? » *Nature* 170 (4334): 882-83. <https://doi.org/10.1038/170882b0>.
- Crick, F. H. C. 1953. « The Packing of  $\alpha$ -Helices: Simple Coiled-Coils ». *Acta Crystallographica* 6 (8-9): 689-97. <https://doi.org/10.1107/S0365110X53001964>.
- Delaney, T. P., S. Uknes, B. Vernooij, L. Friedrich, K. Weymann, D. Negrotto, T. Gaffney, et al. 1994. « A Central Role of Salicylic Acid in Plant Disease Resistance ». *Science (New York, N.Y.)* 266 (5188): 1247-50. <https://doi.org/10.1126/science.266.5188.1247>.
- Dijk, Aalt D. J. van, Giuseppa Morabito, Martijn Fiers, Roeland C. H. J. van Ham, Gerco C. Angenent, et Richard G. H. Immink. 2010. « Sequence Motifs in MADS Transcription Factors Responsible for Specificity and Diversification of Protein-Protein Interaction ». *PLoS Computational Biology* 6 (11): e1001017. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1001017>.
- Dingwall, Colin, et Ronald A. Laskey. 1991. « Nuclear Targeting Sequences — a Consensus? » *Trends in Biochemical Sciences* 16 (janvier): 478-81. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(91\)90184-W](https://doi.org/10.1016/0968-0004(91)90184-W).
- Ditta, Gary, Anusak Pinyopich, Pedro Robles, Soraya Pelaz, et Martin F. Yanofsky. 2004. « The SEP4 Gene of Arabidopsis Thaliana Functions in Floral Organ and Meristem Identity ». *Current Biology* 14 (21): 1935-40. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.10.028>.
- Doi, Yoji, Michiaki Teranaka, Kiyoshi Yora, et Hideofumi Asuyama. 1967. « Mycoplasma- or PLT Group-like Microorganisms Found in the Phloem Elements of Plants Infected with Mulberry Dwarf, Potato Witches' Broom, Aster Yellows, or Paulownia Witches' Broom ». *Japanese Journal of Phytopathology* 33 (4): 259-66. <https://doi.org/10.3186/jjphytopath.33.259>.
- Dubois, E., J. Bercy, et F. Messenguy. 1987. « Characterization of Two Genes, ARGRI and ARGRIII Required for Specific Regulation of Arginine Metabolism in Yeast ». *Molecular & General Genetics: MGG* 207 (1): 142-48. <https://doi.org/10.1007/BF00331501>.
- Economou, A. 1999. « Following the Leader: Bacterial Protein Export through the Sec Pathway ». *Trends in Microbiology* 7 (8): 315-20. [https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(99\)01555-3](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(99)01555-3).
- Edwards, K, C Johnstone, et C Thompson. 1991. « A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. » *Nucleic Acids Research* 19 (6): 1349.
- Efroni, Idan, Eyal Blum, Alexander Goldshmidt, et Yuval Eshed. 2008. « A Protracted and Dynamic Maturation Schedule Underlies Arabidopsis Leaf Development ». *The Plant Cell* 20 (9): 2293-2306. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.057521>.
- Egea-Cortines, M, H Saedler, et H Sommer. 1999. « Ternary complex formation between the MADS-box proteins SQUAMOSA, DEFICIENS and GLOBOSA is involved in the control of floral architecture in *Antirrhinum majus*. » *The EMBO Journal* 18 (19): 5370-79. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.19.5370>.
- Fan, H. Y., Y. Hu, M. Tudor, et H. Ma. 1997. « Specific Interactions between the K Domains of AG and AGLs, Members of the MADS Domain Family of DNA Binding Proteins ». *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 12 (5): 999-1010. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1997.12050999.x>.

- Farmer, Lisa M., Adam J. Book, Kwang-Hee Lee, Ya-Ling Lin, Hongyong Fu, et Richard D. Vierstra. 2010. « The RAD23 Family Provides an Essential Connection between the 26S Proteasome and Ubiquitylated Proteins in Arabidopsis[W] ». *The Plant Cell* 22 (1): 124-42. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.072660>.
- Favaro, Rebecca, Anusak Pinyopich, Raffaella Battaglia, Maarten Kooiker, Lorenzo Borghi, Gary Ditta, Martin F. Yanofsky, Martin M. Kater, et Lucia Colombo. 2003. « MADS-Box Protein Complexes Control Carpel and Ovule Development in Arabidopsis ». *The Plant Cell* 15 (11): 2603-11. <https://doi.org/10.1105/tpc.015123>.
- Folter, Stefan de, et Gerco C. Angenent. 2006. « Trans Meets Cis in MADS Science ». *Trends in Plant Science* 11 (5): 224-31. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2006.03.008>.
- Folter, Stefan de, Richard G.H. Immink, Martin Kieffer, Lucie Pařenicová, Stefan R. Henz, Detlef Weigel, Marco Busscher, et al. 2005. « Comprehensive Interaction Map of the Arabidopsis MADS Box Transcription Factors ». *The Plant Cell* 17 (5): 1424-33. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.031831>.
- Gabardinho, José, Antonia Beteva, Matias Guijarro, Vicente Rey-Bakaikoa, Darren Spruce, Matthew W. Bowler, Sandor Brockhauser, et al. 2010. « MxCuBE: a synchrotron beamline control environment customized for macromolecular crystallography experiments ». *Journal of Synchrotron Radiation* 17 (Pt 5): 700-707. <https://doi.org/10.1107/S0909049510020005>.
- García-Bellido, A. 1975. « Genetic Control of Wing Disc Development in *Drosophila* ». *Ciba Foundation Symposium* 0 (29): 161-82. <https://doi.org/10.1002/9780470720110.ch8>.
- Gibson, Daniel G., Lei Young, Ray-Yuan Chuang, J. Craig Venter, Clyde A. Hutchison, et Hamilton O. Smith. 2009. « Enzymatic Assembly of DNA Molecules up to Several Hundred Kilobases ». *Nature Methods* 6 (5): 343-45. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1318>.
- Glass, John I., Nacyra Assad-Garcia, Nina Alperovich, Shibu Yooseph, Matthew R. Lewis, Mahir Maruf, Clyde A. Hutchison, Hamilton O. Smith, et J. Craig Venter. 2006. « Essential genes of a minimal bacterium ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (2): 425-30. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510013103>.
- Gramzow, Lydia, Markus S. Ritz, et Günter Theissen. 2010. « On the Origin of MADS-Domain Transcription Factors ». *Trends in Genetics: TIG* 26 (4): 149-53. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2010.01.004>.
- Guilligay, Delphine, Franck Tarendeau, Patricia Resa-Infante, Rocío Coloma, Thibaut Crepin, Peter Sehr, Joe Lewis, et al. 2008. « The Structural Basis for Cap Binding by Influenza Virus Polymerase Subunit PB2 ». *Nature Structural & Molecular Biology* 15 (5): 500-506. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1421>.
- Gustafson-Brown, Cindy, Beth Savidge, et Martin F. Yanofsky. 1994. « Regulation of the Arabidopsis Floral Homeotic Gene APETALA1 ». *Cell* 76 (1): 131-43. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90178-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90178-3).
- Hagen, Gretchen, et Tom Guilfoyle. 2002. « Auxin-Responsive Gene Expression: Genes, Promoters and Regulatory Factors ». *Plant Molecular Biology* 49 (3-4): 373-85.
- Härmä, Harri, Natalia Tong-Ochoa, Arjan J. van Adrichem, Ilian Jelesarov, Krister Wennerberg, et Kari Kopra. 2018. « Toward Universal Protein Post-Translational Modification Detection in High Throughput Format ». *Chemical Communications (Cambridge, England)* 54 (23): 2910-13. <https://doi.org/10.1039/c7cc09575a>.

- Hart, D. J., et F. Tarendeau. 2006. « Combinatorial Library Approaches for Improving Soluble Protein Expression in Escherichia Coli ». *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* 62 (1): 19-26. <https://doi.org/10.1107/S09074444905036097>.
- Hendrickson, W A, J R Horton, et D M LeMaster. 1990. « Selenomethionyl proteins produced for analysis by multiwavelength anomalous diffraction (MAD): a vehicle for direct determination of three-dimensional structure. » *The EMBO Journal* 9 (5): 1665-72.
- Henschel, Katrin, Rumiko Kofuji, Mitsuyasu Hasebe, Heinz Saedler, Thomas Münster, et Günter Theißen. 2002. « Two Ancient Classes of MIKC-Type MADS-Box Genes Are Present in the Moss Physcomitrella Patens ». *Molecular Biology and Evolution* 19 (6): 801-14. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a004137>.
- Hershko, Avram, et Aaron Ciechanover. 1998. « The Ubiquitin System ». *Annual Review of Biochemistry* 67 (1): 425-79. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.425>.
- Hogenhout, Saskia A., Kenro Oshima, El-Desouky Ammar, Shigeyuki Kakizawa, Heather N. Kingdom, et Shigetou Namba. 2008. « Phytoplasmas: Bacteria That Manipulate Plants and Insects ». *Molecular Plant Pathology* 9 (4): 403-23. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2008.00472.x>.
- Honma, T., et K. Goto. 2000. « The Arabidopsis Floral Homeotic Gene PISTILLATA Is Regulated by Discrete Cis-Elements Responsive to Induction and Maintenance Signals ». *Development (Cambridge, England)* 127 (10): 2021-30.
- Honma, T., et K. Goto. 2001. « Complexes of MADS-Box Proteins Are Sufficient to Convert Leaves into Floral Organs ». *Nature* 409 (6819): 525-29. <https://doi.org/10.1038/35054083>.
- Hoshi, Ayaka, Kenro Oshima, Shigeyuki Kakizawa, Yoshiko Ishii, Johji Ozeki, Masayoshi Hashimoto, Ken Komatsu, Satoshi Kagiwada, Yasuyuki Yamaji, et Shigetou Namba. 2009. « A Unique Virulence Factor for Proliferation and Dwarfism in Plants Identified from a Phytopathogenic Bacterium ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (15): 6416-21. <https://doi.org/10.1073/pnas.0813038106>.
- Huala, E., et I. M. Sussex. 1992. « LEAFY Interacts with Floral Homeotic Genes to Regulate Arabidopsis Floral Development ». *The Plant Cell* 4 (8): 901-13. <https://doi.org/10.1105/tpc.4.8.901>.
- Hug, Laura A., Brett J. Baker, Karthik Anantharaman, Christopher T. Brown, Alexander J. Probst, Cindy J. Castelle, Cristina N. Butterfield, et al. 2016. « A New View of the Tree of Life ». *Nature Microbiology* 1 (5): 1-6. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.48>.
- Hugouvieux, Véronique, Catarina S Silva, Agnès Jourdain, Arnaud Stigliani, Quentin Charras, Vanessa Conn, Simon J Conn, Cristel C Carles, François Parcy, et Chloe Zubieta. 2018. « Tetramerization of MADS family transcription factors SEPALLATA3 and AGAMOUS is required for floral meristem determinacy in Arabidopsis ». *Nucleic Acids Research* 46 (10): 4966-77. <https://doi.org/10.1093/nar/gky205>.
- Immink, Richard GH, Isabella AN Tonaco, Stefan de Folter, Anna Shchennikova, Aalt DJ van Dijk, Jacqueline Busscher-Lange, Jan W. Borst, et Gerco C. Angenent. 2009. « SEPALLATA3: the “glue” for MADS box transcription factor complex formation ». *Genome Biology* 10 (2): R24. <https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-2-r24>.
- « International Committee on Systematic Bacteriology Subcommittee on the Taxonomy of Mollicutes ». 1993. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 43 (2): 394-97. <https://doi.org/10.1099/00207713-43-2-394>.

- Irish, V. F., et I. M. Sussex. 1990. « Function of the *Apetala-1* Gene during *Arabidopsis* Floral Development ». *The Plant Cell* 2 (8): 741-53. <https://doi.org/10.1105/tpc.2.8.741>.
- Iwabuchi, Nozomu, Yugo Kitazawa, Kensaku Maejima, Hiroaki Koinuma, Akio Miyazaki, Ouki Matsumoto, Takumi Suzuki, et al. 2020. « Functional Variation in Phyllogen, a Phyllody-Inducing Phytoplasma Effector Family, Attributable to a Single Amino Acid Polymorphism ». *Molecular Plant Pathology* 21 (10): 1322-36. <https://doi.org/10.1111/mpp.12981>.
- Iwabuchi, Nozomu, Kensaku Maejima, Yugo Kitazawa, Hideyuki Miyatake, Masanobu Nishikawa, Ryosuke Tokuda, Hiroaki Koinuma, et al. 2019. « Crystal Structure of Phyllogen, a Phyllody-Inducing Effector Protein of Phytoplasma ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 513 (4): 952-57. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.04.060>.
- Jenik, P. D., et V. F. Irish. 2000. « Regulation of Cell Proliferation Patterns by Homeotic Genes during *Arabidopsis* Floral Development ». *Development (Cambridge, England)* 127 (6): 1267-76.
- Jetha, Khushboo, Günter Theißen, et Rainer Melzer. 2014. « *Arabidopsis* SEPALLATA proteins differ in cooperative DNA-binding during the formation of floral quartet-like complexes ». *Nucleic Acids Research* 42 (17): 10927-42. <https://doi.org/10.1093/nar/gku755>.
- Jones, Jonathan D. G., et Jeffery L. Dangl. 2006. « The Plant Immune System ». *Nature* 444 (7117): 323-29. <https://doi.org/10.1038/nature05286>.
- Kabsch, Wolfgang. 2010. « Integration, scaling, space-group assignment and post-refinement ». *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* 66 (Pt 2): 133-44. <https://doi.org/10.1107/S0907444909047374>.
- Kagale, Sateesh, Matthew G. Links, et Kevin Rozwadowski. 2010. « Genome-Wide Analysis of Ethylene-Responsive Element Binding Factor-Associated Amphiphilic Repression Motif-Containing Transcriptional Regulators in *Arabidopsis*1[W][OA] ». *Plant Physiology* 152 (3): 1109-34. <https://doi.org/10.1104/pp.109.151704>.
- Kagale, Sateesh, et Kevin Rozwadowski. 2010. « Small yet effective ». *Plant Signaling & Behavior* 5 (6): 691-94.
- Kakizawa, S., K. Oshima, T. Kuboyama, H. Nishigawa, H. Jung, T. Sawayanagi, T. Tsuchizaki, S. Miyata, M. Ugaki, et S. Namba. 2001. « Cloning and Expression Analysis of Phytoplasma Protein Translocation Genes ». *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI* 14 (9): 1043-50. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2001.14.9.1043>.
- Kaufmann, Kerstin, Jose Muiño, Ruy Jauregui, Chiara Airoidi, Cezary Smaczniak, Pawel Krajewski, et Gerco Angenent. 2009. « Target Genes of the MADS Transcription Factor SEPALLATA3: Integration of Developmental and Hormonal Pathways in the *Arabidopsis* Flower ». *PLoS biology* 7 (mai): e1000090. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000090>.
- Kitazawa, Yugo, Nozomu Iwabuchi, Misako Himeno, Momoka Sasano, Hiroaki Koinuma, Takamichi Nijo, Tatsuya Tomomitsu, et al. 2017. « Phytoplasma-conserved phyllogen proteins induce phyllody across the Plantae by degrading floral MADS domain proteins ». *Journal of Experimental Botany* 68 (11): 2799-2811. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx158>.
- Koornneef, M., C. J. Hanhart, et J. H. van der Veen. 1991. « A Genetic and Physiological Analysis of Late Flowering Mutants in *Arabidopsis Thaliana* ». *Molecular & General Genetics: MGG* 229 (1): 57-66. <https://doi.org/10.1007/BF00264213>.

- Kosugi, Shunichi, et Yuko Ohashi. 2002. « DNA Binding and Dimerization Specificity and Potential Targets for the TCP Protein Family ». *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 30 (3): 337-48. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2002.01294.x>.
- Krizek, B A, et E M Meyerowitz. 1996. « Mapping the protein regions responsible for the functional specificities of the Arabidopsis MADS domain organ-identity proteins. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (9): 4063-70.
- Kunkel, L. O. 1926. « Studies on Aster Yellows ». *American Journal of Botany* 13 (10): 646-705. <https://doi.org/10.2307/2435474>.
- Kunst, F., N. Ogasawara, I. Moszer, A. M. Albertini, G. Alloni, V. Azevedo, M. G. Bertero, et al. 1997. « The Complete Genome Sequence of the Gram-Positive Bacterium *Bacillus Subtilis* ». *Nature* 390 (6657): 249-56. <https://doi.org/10.1038/36786>.
- Kuske, C. R., et B. C. Kirkpatrick. 1992. « Phylogenetic Relationships between the Western Aster Yellows Mycoplasma-like Organism and Other Prokaryotes Established by 16S rRNA Gene Sequence ». *International Journal of Systematic Bacteriology* 42 (2): 226-33. <https://doi.org/10.1099/00207713-42-2-226>.
- Lai, Xuelei, Hussein Daher, Antonin Galien, Veronique Hugouvieux, et Chloe Zubieta. 2019. « Structural Basis for Plant MADS Transcription Factor Oligomerization ». *Computational and Structural Biotechnology Journal* 17 (juin): 946-53. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2019.06.014>.
- Lai, Xuelei, Rosario Vega-Léon, Veronique Hugouvieux, Romain Blanc-Mathieu, Froukje van der Wal, Jérémy Lucas, Catarina S. Silva, et al. 2021. « The intervening domain is required for DNA-binding and functional identity of plant MADS transcription factors ». *Nature Communications* 12 (août): 4760. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24978-w>.
- Lamb, Rebecca S., Theresa A. Hill, Queenie K.-G. Tan, et Vivian F. Irish. 2002. « Regulation of APETALA3 Floral Homeotic Gene Expression by Meristem Identity Genes ». *Development (Cambridge, England)* 129 (9): 2079-86.
- Landschulz, W. H., P. F. Johnson, et S. L. McKnight. 1988. « The Leucine Zipper: A Hypothetical Structure Common to a New Class of DNA Binding Proteins ». *Science (New York, N.Y.)* 240 (4860): 1759-64. <https://doi.org/10.1126/science.3289117>.
- Lee, Jeong Hwan, Soo Hyun Park, Jong Seob Lee, et Ji Hoon Ahn. 2007. « A Conserved Role of SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP) in Controlling Flowering Time of Brassica Plants ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 1769 (7): 455-61. <https://doi.org/10.1016/j.bbaexp.2007.05.001>.
- Lee, Jungeun, Mijin Oh, Hanna Park, et Ilha Lee. 2008. « SOC1 Translocated to the Nucleus by Interaction with AGL24 Directly Regulates Leafy ». *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 55 (5): 832-43. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03552.x>.
- Liao, Yi-Ting, Shih-Shun Lin, Shin-Jen Lin, Wan-Ting Sun, Bing-Nan Shen, Han-Pin Cheng, Chan-Pin Lin, Tzu-Ping Ko, Yi-Fan Chen, et Hao-Ching Wang. 2019. « Structural Insights into the Interaction between Phytoplasmal Effector Causing Phyllody 1 and MADS Transcription Factors ». *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 100 (4): 706-19. <https://doi.org/10.1111/tpj.14463>.
- Liljgren, S. J., C. Gustafson-Brown, A. Pinyopich, G. S. Ditta, et M. F. Yanofsky. 1999. « Interactions among APETALA1, LEAFY, and TERMINAL FLOWER1 Specify Meristem Fate ». *The Plant Cell* 11 (6): 1007-18. <https://doi.org/10.1105/tpc.11.6.1007>.

- Lim, P O, et B B Sears. 1989. « 16S rRNA sequence indicates that plant-pathogenic mycoplasma-like organisms are evolutionarily distinct from animal mycoplasmas. » *Journal of Bacteriology* 171 (11): 5901-6.
- MacLean, Allyson M., Zigmunds Orlovskis, Krissana Kowitwanich, Anna M. Zdziarska, Gerco C. Angenent, Richard G. H. Immink, et Saskia A. Hogenhout. 2014. « Phytoplasma Effector SAP54 Hijacks Plant Reproduction by Degrading MADS-box Proteins and Promotes Insect Colonization in a RAD23-Dependent Manner ». *PLoS Biology* 12 (4). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001835>.
- MacLean, Allyson M., Akiko Sugio, Olga V. Makarova, Kim C. Findlay, Victoria M. Grieve, Réka Tóth, Mogens Nicolaisen, et Saskia A. Hogenhout. 2011. « Phytoplasma Effector SAP54 Induces Indeterminate Leaf-Like Flower Development in Arabidopsis Plants1[C][W][OA] ». *Plant Physiology* 157 (2): 831-41. <https://doi.org/10.1104/pp.111.181586>.
- Maejima, Kensaku, Ryo Iwai, Misako Himeno, Ken Komatsu, Yugo Kitazawa, Naoko Fujita, Kazuya Ishikawa, et al. 2014. « Recognition of floral homeotic MADS domain transcription factors by a phytoplasmal effector, phyllogen, induces phyllody ». *The Plant Journal* 78 (4): 541-54. <https://doi.org/10.1111/tpj.12495>.
- Maejima, Kensaku, Yugo Kitazawa, Tatsuya Tomomitsu, Akira Yusa, Yutaro Neriya, Misako Himeno, Yasuyuki Yamaji, Kenro Oshima, et Shigetou Namba. 2015. « Degradation of Class E MADS-Domain Transcription Factors in Arabidopsis by a Phytoplasmal Effector, Phyllogen ». *Plant Signaling & Behavior* 10 (8): e1042635. <https://doi.org/10.1080/15592324.2015.1042635>.
- Mandel, M. A., et Martin F. Yanofsky. 1998. « The Arabidopsis AGL9 MADS Box Gene Is Expressed in Young Flower Primordia ». *Sexual Plant Reproduction* 11 (1): 22-28. <https://doi.org/10.1007/s004970050116>.
- Mandel, M., Cindy Gustafson-Brown, Beth Savidge, et Martin F. Yanofsky. 1992. « Molecular Characterization of the Arabidopsis Floral Homeotic Gene APETALA1 ». *Nature* 360 (6401): 273-77. <https://doi.org/10.1038/360273a0>.
- Maramorosch, Karl, Eishiro Shikata, et Robert R. Granados. 1968. « Division of Microbiology: Structures Resembling Mycoplasma in Diseased Plants and in Insect Vectors\* ». *Transactions of the New York Academy of Sciences* 30 (6 Series II): 841-55. <https://doi.org/10.1111/j.2164-0947.1968.tb02527.x>.
- Marrero, Miguel Correa, Sylvain Capdevielle, Weijie Huang, Marco Busscher, Jacqueline Busscher-Lange, Dick de Ridder, Aalt D. J. van Dijk, Saskia A. Hogenhout, et Richard G. H. Immink. 2020. « Widespread Targeting of Development-Related Host Transcription Factors by Phytoplasma Effectors ». <https://doi.org/10.1101/2020.02.13.946517>.
- Masiero, Simona, Lucia Colombo, Paul E Grini, Arp Schnittger, et Martin M Kater. 2011. « The Emerging Importance of Type I MADS Box Transcription Factors for Plant Reproduction ». *The Plant Cell* 23 (3): 865-72. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.081737>.
- McDermott, J C, M C Cardoso, Y T Yu, V Andres, D Leifer, D Krainc, S A Lipton, et B Nadal-Ginard. 1993. « hMEF2C gene encodes skeletal muscle- and brain-specific transcription factors. » *Molecular and Cellular Biology* 13 (4): 2564-77.
- Melzer, Rainer, et Günter Theißen. 2009. « Reconstitution of 'floral quartets' in vitro involving class B and class E floral homeotic proteins ». *Nucleic Acids Research* 37 (8): 2723-36. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp129>.

- Melzer, Rainer, Wim Verelst, et Günter Theißen. 2009. « The class E floral homeotic protein SEPALLATA3 is sufficient to loop DNA in 'floral quartet'-like complexes in vitro ». *Nucleic Acids Research* 37 (1): 144-57. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn900>.
- Michaels, S. D., et R. M. Amasino. 1999. « FLOWERING LOCUS C Encodes a Novel MADS Domain Protein That Acts as a Repressor of Flowering ». *The Plant Cell* 11 (5): 949-56. <https://doi.org/10.1105/tpc.11.5.949>.
- Minato, Nami, Misako Himeno, Ayaka Hoshi, Kensaku Maejima, Ken Komatsu, Yumiko Takebayashi, Hiroyuki Kasahara, et al. 2014. « The Phytoplasmal Virulence Factor TENGU Causes Plant Sterility by Downregulating of the Jasmonic Acid and Auxin Pathways ». *Scientific Reports* 4 (décembre): 7399. <https://doi.org/10.1038/srep07399>.
- Mizukami, Y., et H. Ma. 1997. « Determination of Arabidopsis Floral Meristem Identity by AGAMOUS ». *The Plant Cell* 9 (3): 393-408. <https://doi.org/10.1105/tpc.9.3.393>.
- Mizukami, Yukiko, et Hong Ma. 1992. « Ectopic Expression of the Floral Homeotic Gene AGAMOUS in Transgenic Arabidopsis Plants Alters Floral Organ Identity ». *Cell* 71 (1): 119-31. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90271-D](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90271-D).
- Müller, Andreas. 1961. « Zur Charakterisierung der Blüten und Infloreszenzen von Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. ». *Die Kulturpflanze* 9 (1): 364-93. <https://doi.org/10.1007/BF02095757>.
- Murrall, Debra J., Lowell R. Nault, Casey W. Hoy, Laurence V. Madden, et Sally A. Miller. 1996. « Effects of Temperature and Vector Age on Transmission of Two Ohio Strains of Aster Yellows Phytoplasma by the Aster Leafhopper (Homoptera: Cicadellidae) ». *Journal of Economic Entomology* 89 (5): 1223-32. <https://doi.org/10.1093/jee/89.5.1223>.
- Namba, Shigetou. 2019. « Molecular and biological properties of phytoplasmas ». *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences* 95 (7): 401-18. <https://doi.org/10.2183/pjab.95.028>.
- Nault, L. R. 1997. « Arthropod Transmission of Plant Viruses: A New Synthesis ». *Annals of the Entomological Society of America* 90 (5): 521-41. <https://doi.org/10.1093/aesa/90.5.521>.
- Ng, M., et M. F. Yanofsky. 2001. « Activation of the Arabidopsis B Class Homeotic Genes by APETALA1 ». *The Plant Cell* 13 (4): 739-53. <https://doi.org/10.1105/tpc.13.4.739>.
- Norman, C., M. Runswick, R. Pollock, et R. Treisman. 1988. « Isolation and Properties of cDNA Clones Encoding SRF, a Transcription Factor That Binds to the c-Fos Serum Response Element ». *Cell* 55 (6): 989-1003. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90244-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90244-9).
- O'Shea, Erin K., Kevin J. Lumb, et Peter S. Kim. 1993. « Peptide 'Velcro': Design of a Heterodimeric Coiled Coil ». *Current Biology* 3 (10): 658-67. [https://doi.org/10.1016/0960-9822\(93\)90063-T](https://doi.org/10.1016/0960-9822(93)90063-T).
- Oshima, K., T. Shiomi, T. Kuboyama, T. Sawayanagi, H. Nishigawa, S. Kakizawa, S. Miyata, M. Ugaki, et S. Namba. 2001. « Isolation and Characterization of Derivative Lines of the Onion Yellows Phytoplasma That Do Not Cause Stunting or Phloem Hyperplasia ». *Phytopathology* 91 (11): 1024-29. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2001.91.11.1024>.
- Oshima, Kenro, Shigeyuki Kakizawa, Ryo Arashida, Yoshiko Ishii, Ayaka Hoshi, Yuki Hayashi, Satoshi Kagiwada, et Shigetou Namba. 2007. « Presence of Two Glycolytic Gene Clusters in a Severe Pathogenic Line of Candidatus Phytoplasma Asteris ». *Molecular Plant Pathology* 8 (4): 481-89. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00408.x>.
- Oshima, Kenro, Shigeyuki Kakizawa, Hisashi Nishigawa, Hee-Young Jung, Wei Wei, Shiho Suzuki, Ryo Arashida, et al. 2004. « Reductive Evolution Suggested from the Complete

- Genome Sequence of a Plant-Pathogenic Phytoplasma ». *Nature Genetics* 36 (1): 27-29. <https://doi.org/10.1038/ng1277>.
- Oshima, Kenro, Shin-ichi Miyata, Toshimi SAWAYANAGI, Shigeyuki KAKIZAWA, Hisashi NISHIGAWA, Hee-Young JUNG, Ken-ichiro FURUKI, et al. 2002. « Minimal Set of Metabolic Pathways Suggested from the Genome of Onion Yellow's Phytoplasma ». *Journal of General Plant Pathology* 68 (3): 225-36. <https://doi.org/10.1007/PL00013081>.
- Özbek, Elvan, Sally A Miller, Tea Meulia, et Saskia A Hogenhout. 2003. « Infection and Replication Sites of Spiroplasma Kunkelii (Class: Mollicutes) in Midgut and Malpighian Tubules of the Leafhopper Dalbulus Maidis ». *Journal of Invertebrate Pathology* 82 (3): 167-75. [https://doi.org/10.1016/S0022-2011\(03\)00031-4](https://doi.org/10.1016/S0022-2011(03)00031-4).
- Pagliari, Laura, Marta Martini, Alberto Loschi, et Rita Musetti. 2016. « Looking inside Phytoplasma-Infected Sieve Elements: A Combined Microscopy Approach Using Arabidopsis Thaliana as a Model Plant ». *Micron (Oxford, England: 1993)* 89 (octobre): 87-97. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2016.07.007>.
- Paque, Sebastien, et Dolf Weijers. 2016. « Q&A: Auxin: the plant molecule that influences almost anything ». *BMC Biology* 14 (1): 67. <https://doi.org/10.1186/s12915-016-0291-0>.
- Parcy, F., O. Nilsson, M. A. Busch, I. Lee, et D. Weigel. 1998. « A Genetic Framework for Floral Patterning ». *Nature* 395 (6702): 561-66. <https://doi.org/10.1038/26903>.
- Pařenicová, Lucie, Stefan de Folter, Martin Kieffer, David S. Horner, Cristina Favalli, Jacqueline Busscher, Holly E. Cook, et al. 2003. « Molecular and Phylogenetic Analyses of the Complete MADS-Box Transcription Factor Family in Arabidopsis : New Openings to the MADS World[W] ». *The Plant Cell* 15 (7): 1538-51. <https://doi.org/10.1105/tpc.011544>.
- Pauling, Linus, et Robert B. Corey. 1953. « Compound Helical Configurations of Polypeptide Chains: Structure of Proteins of the  $\alpha$ -Keratin Type ». *Nature* 171 (4341): 59-61. <https://doi.org/10.1038/171059a0>.
- Payne, Thomas, Susan D. Johnson, et Anna M. Koltunow. 2004. « KNUCKLES (KNU) encodes a C2H2 zinc-finger protein that regulates development of basal pattern elements of the Arabidopsis gynoecium ». *Development* 131 (15): 3737-49. <https://doi.org/10.1242/dev.01216>.
- Pelaz, S., G. S. Ditta, E. Baumann, E. Wisman, et M. F. Yanofsky. 2000. « B and C Floral Organ Identity Functions Require SEPALLATA MADS-Box Genes ». *Nature* 405 (6783): 200-203. <https://doi.org/10.1038/35012103>.
- Pelaz, S., Cindy Gustafson-Brown, Susanne E. Kohalmi, William L. Crosby, et Martin F. Yanofsky. 2001. « APETALA1 and SEPALLATA3 Interact to Promote Flower Development ». *The Plant Journal* 26 (4): 385-94. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2001.2641042.x>.
- Pellegrini, L., S. Tan, et T. J. Richmond. 1995. « Structure of Serum Response Factor Core Bound to DNA ». *Nature* 376 (6540): 490-98. <https://doi.org/10.1038/376490a0>.
- Pérez-López, Edel, Mauricio Luna-Rodríguez, Chrystel Y. Olivier, et Tim J. Dumonceaux. 2016. « The Underestimated Diversity of Phytoplasmas in Latin America ». *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 66 (1): 492-513. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000726>.
- Petrásek, Jan, Jozef Mravec, Rodolphe Bouchard, Joshua J. Blakeslee, Melinda Abas, Daniela Seifertová, Justyna Wisniewska, et al. 2006. « PIN Proteins Perform a Rate-Limiting

- Function in Cellular Auxin Efflux ». *Science (New York, N.Y.)* 312 (5775): 914-18. <https://doi.org/10.1126/science.1123542>.
- Piwarzyk, Eileen, Yingzhen Yang, et Thomas Jack. 2007. « Conserved C-Terminal Motifs of the Arabidopsis Proteins APETALA3 and PISTILLATA Are Dispensable for Floral Organ Identity Function ». *Plant Physiology* 145 (4): 1495-1505. <https://doi.org/10.1104/pp.107.105346>.
- Puranik, Sriharsha, Samira Acajjaoui, Simon Conn, Luca Costa, Vanessa Conn, Anthony Vial, Romain Marcellin, et al. 2014. « Structural Basis for the Oligomerization of the MADS Domain Transcription Factor SEPALLATA3 in Arabidopsis ». *The Plant Cell* 26 (9): 3603-15. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.127910>.
- Putterill, J., F. Robson, K. Lee, R. Simon, et G. Coupland. 1995. « The CONSTANS Gene of Arabidopsis Promotes Flowering and Encodes a Protein Showing Similarities to Zinc Finger Transcription Factors ». *Cell* 80 (6): 847-57. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90288-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90288-0).
- Reeves, Paul H., Christine M. Ellis, Sara E. Ploense, Miin-Feng Wu, Vandana Yadav, Dorothea Tholl, Aurore Chételat, et al. 2012. « A Regulatory Network for Coordinated Flower Maturation ». *PLOS Genetics* 8 (2): e1002506. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002506>.
- Riechmann, J. L., B. A. Krizek, et E. M. Meyerowitz. 1996. « Dimerization Specificity of Arabidopsis MADS Domain Homeotic Proteins APETALA1, APETALA3, PISTILLATA, and AGAMOUS ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (10): 4793-98. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.10.4793>.
- Riechmann, J L, et E M Meyerowitz. 1997. « Determination of floral organ identity by Arabidopsis MADS domain homeotic proteins AP1, AP3, PI, and AG is independent of their DNA-binding specificity. » *Molecular Biology of the Cell* 8 (7): 1243-59.
- Rümppler, Florian, Lydia Gramzow, Günter Theißen, et Rainer Melzer. 2015. « Did Convergent Protein Evolution Enable Phytoplasmas to Generate “Zombie Plants”? » *Trends in Plant Science* 20 (12): 798-806. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.08.004>.
- Rümppler, Florian, Günter Theißen, et Rainer Melzer. 2018. « A conserved leucine zipper-like motif accounts for strong tetramerization capabilities of SEPALLATA-like MADS-domain transcription factors ». *Journal of Experimental Botany* 69 (8): 1943-54. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery063>.
- Schommer, Carla, Javier F. Palatnik, Pooja Aggarwal, Aurore Chételat, Pilar Cubas, Edward E. Farmer, Utpal Nath, et Detlef Weigel. 2008. « Control of Jasmonate Biosynthesis and Senescence by MiR319 Targets ». *PLoS Biology* 6 (9): e230. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060230>.
- Schwarz-Sommer, Z., P. Huijser, W. Nacken, H. Saedler, et H. Sommer. 1990. « Genetic Control of Flower Development by Homeotic Genes in *Antirrhinum Majus* ». *Science (New York, N.Y.)* 250 (4983): 931-36. <https://doi.org/10.1126/science.250.4983.931>.
- Shikata, Eishiro, Wen-Sheng Teng, et Takashi Matsumoto. 1969. « Mycoplasma or PLT Like Micro Organisms Detected in Leaves of Sugarcane Plants Infected with White-Leaf Disease and the Suppression of the Disease Symptoms by the Antibiotics of Tetracycline Group », 16.
- Shiomi, Toshiki, Minoru Tanaka, Toshimi Sawayanagi, Shinichi Yamamoto, Tsuneo Tsuchizaki, et Shigetou Namba. 1998. « A Symptomatic Mutant of Onion Yellow's Phytoplasma Derived from a Greenhouse-Maintained Isolate ». *Japanese Journal of Phytopathology* 64 (5): 501-5. <https://doi.org/10.3186/jjphytopath.64.501>.

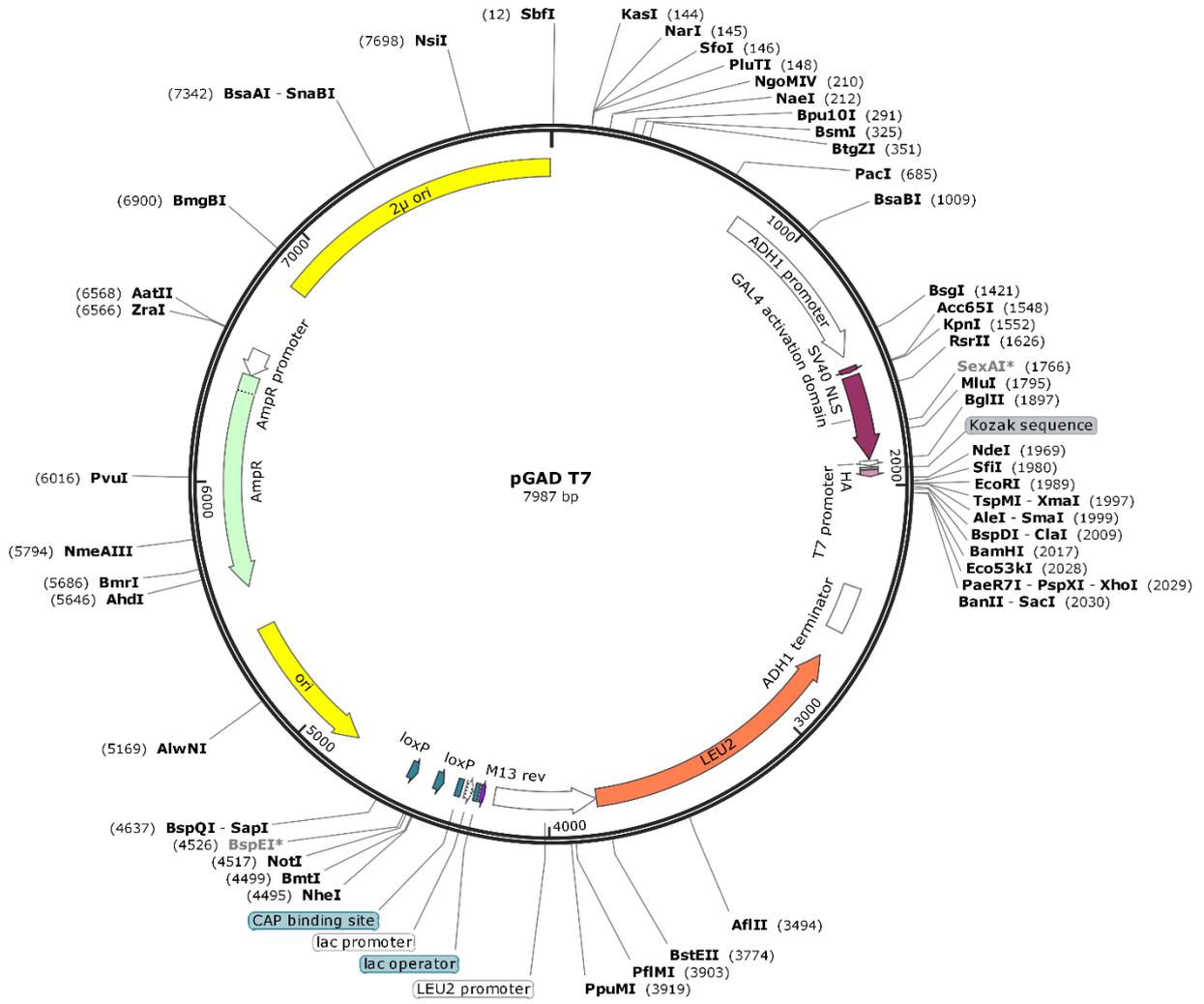
- Shore, P., et A. D. Sharrocks. 1995. « The MADS-Box Family of Transcription Factors ». *European Journal of Biochemistry* 229 (1): 1-13. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1995.tb20430.x>.
- Silva, Catarina S., Sriharsha Puranik, Adam Round, Martha Brennich, Agnès Jourdain, François Parcy, Veronique Hugouvieux, et Chloe Zubieta. 2016. « Evolution of the Plant Reproduction Master Regulators LFY and the MADS Transcription Factors: The Role of Protein Structure in the Evolutionary Development of the Flower ». *Frontiers in Plant Science* 6: 1193. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01193>.
- Simpson, A. J. G., F. C. Reinach, P. Arruda, F. A. Abreu, M. Acencio, R. Alvarenga, L. M. C. Alves, et al. 2000. « The Genome Sequence of the Plant Pathogen Xylella Fastidiosa ». *Nature* 406 (6792): 151-57. <https://doi.org/10.1038/35018003>.
- Smaczniak, Cezary, Richard G. H. Immink, Gerco C. Angenent, et Kerstin Kaufmann. 2012. « Developmental and evolutionary diversity of plant MADS-domain factors: insights from recent studies ». *Development* 139 (17): 3081-98. <https://doi.org/10.1242/dev.074674>.
- Smaczniak, Cezary, Richard G. H. Immink, Jose M. Muiño, Robert Blanvillain, Marco Busscher, Jacqueline Busscher-Lange, Q. D. Peter Dinh, et al. 2012. « Characterization of MADS-Domain Transcription Factor Complexes in Arabidopsis Flower Development ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (5): 1560-65. <https://doi.org/10.1073/pnas.1112871109>.
- Some, Daniel, Hadar Amartely, Ayala Tsadok, et Mario Lebediker. 2019. « Characterization of Proteins by Size-Exclusion Chromatography Coupled to Multi-Angle Light Scattering (SEC-MALS) ». *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, n° 148 (juin). <https://doi.org/10.3791/59615>.
- Sommer, H., J. P. Beltrán, P. Huijser, H. Pape, W. E. Lönnig, H. Saedler, et Z. Schwarz-Sommer. 1990. « Deficiens, a Homeotic Gene Involved in the Control of Flower Morphogenesis in Antirrhinum Majus: The Protein Shows Homology to Transcription Factors ». *The EMBO Journal* 9 (3): 605-13.
- Sridhar, Vaniyambadi V., Anandkumar Surendrarao, et Zhongchi Liu. 2006. « APETALA1 and SEPALLATA3 Interact with SEUSS to Mediate Transcription Repression during Flower Development ». *Development (Cambridge, England)* 133 (16): 3159-66. <https://doi.org/10.1242/dev.02498>.
- Sugawara, Kyoko, Youhei Honma, Ken Komatsu, Misako Himeno, Kenro Oshima, et Shigetou Namba. 2013. « The Alteration of Plant Morphology by Small Peptides Released from the Proteolytic Processing of the Bacterial Peptide TENGU1[W] ». *Plant Physiology* 162 (4): 2005-14. <https://doi.org/10.1104/pp.113.218586>.
- Sugio, Akiko, et Saskia A Hogenhout. 2012. « The Genome Biology of Phytoplasma: Modulators of Plants and Insects ». *Current Opinion in Microbiology, Ecology and industrial microbiology/Special section: Microbial proteomics*, 15 (3): 247-54. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2012.04.002>.
- Sugio, Akiko, Heather N. Kingdom, Allyson M. MacLean, Victoria M. Grieve, et Saskia A. Hogenhout. 2011. « Phytoplasma protein effector SAP11 enhances insect vector reproduction by manipulating plant development and defense hormone biosynthesis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (48): E1254-63. <https://doi.org/10.1073/pnas.1105664108>.
- Sugio, Akiko, Allyson M MacLean, et Saskia A Hogenhout. 2014. « The small phytoplasma virulence effector SAP11 contains distinct domains required for nuclear targeting and

- CIN-TCP binding and destabilization ». *The New Phytologist* 202 (3): 838-48. <https://doi.org/10.1111/nph.12721>.
- Sugio, Akiko, Allyson M. MacLean, Heather N. Kingdom, Victoria M. Grieve, R. Manimekalai, et Saskia A. Hogenhout. 2011. « Diverse Targets of Phytoplasma Effectors: From Plant Development to Defense Against Insects ». *Annual Review of Phytopathology* 49 (1): 175-95. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-072910-095323>.
- Sun, Bo, Yifeng Xu, Kian-Hong Ng, et Toshiro Ito. 2009. « A timing mechanism for stem cell maintenance and differentiation in the Arabidopsis floral meristem ». *Genes & Development* 23 (15): 1791-1804. <https://doi.org/10.1101/gad.1800409>.
- Thangavel, Gokilavani, et Saraswati Nayar. 2018. « A Survey of MIKC Type MADS-Box Genes in Non-seed Plants: Algae, Bryophytes, Lycophytes and Ferns ». *Frontiers in Plant Science* 9 (avril). <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00510>.
- Theissen, G., A. Becker, A. Di Rosa, A. Kanno, J. T. Kim, T. Münster, K. U. Winter, et H. Saedler. 2000. « A Short History of MADS-Box Genes in Plants ». *Plant Molecular Biology* 42 (1): 115-49.
- Theißen, Günter, Rainer Melzer, et Florian Rümpler. 2016. « MADS-Domain Transcription Factors and the Floral Quartet Model of Flower Development: Linking Plant Development and Evolution ». *Development* 143 (18): 3259-71. <https://doi.org/10.1242/dev.134080>.
- Theißen, Günter, et Heinz Saedler. 2001. « Floral Quartets ». *Nature* 409 (6819): 469-71. <https://doi.org/10.1038/35054172>.
- Thomma, B. P., K. Eggermont, K. F. Tierens, et W. F. Broekaert. 1999. « Requirement of Functional Ethylene-Insensitive 2 Gene for Efficient Resistance of Arabidopsis to Infection by Botrytis Cinerea ». *Plant Physiology* 121 (4): 1093-1102. <https://doi.org/10.1104/pp.121.4.1093>.
- Tilly, J.J., D.W. Allen, et T. Jack. 1998. « The CArG boxes in the promoter of the Arabidopsis floral organ identity gene APETALA3 mediate diverse regulatory effects ». *Development* 125 (9): 1647-57. <https://doi.org/10.1242/dev.125.9.1647>.
- Trachtenberg, Shlomo. 1998. « Mollicutes—Wall-Less Bacteria with Internal Cytoskeletons ». *Journal of Structural Biology* 124 (2): 244-56. <https://doi.org/10.1006/jsbi.1998.4063>.
- Wagner, D., R. W. Sablowski, et E. M. Meyerowitz. 1999. « Transcriptional Activation of APETALA1 by LEAFY ». *Science (New York, N.Y.)* 285 (5427): 582-84. <https://doi.org/10.1126/science.285.5427.582>.
- Wang, M. Q., et Karl Maramorosch. 1998. « Earliest Historical Record of a Tree Mycoplasma Disease: Beneficial Effect of Mycoplasma-Like Organisms on Peonies ». In *Mycoplasma Diseases of Crops: Basic and Applied Aspects*, édité par Karl Maramorosch et S. P. Raychaudhuri, 349-56. New York, NY: Springer. [https://doi.org/10.1007/978-1-4612-3808-9\\_19](https://doi.org/10.1007/978-1-4612-3808-9_19).
- Wang, Nan, Y. Li, W. Chen, H. Yang, P. Zhang, et Y. Wu. 2017. « Identification of wheat blue dwarf phytoplasma effectors targeting plant proliferation and defence responses ». *Plant Pathology* 67 (septembre). <https://doi.org/10.1111/ppa.12786>.
- Wang, Nan, Haizhen Yang, Zhiyuan Yin, Wenting Liu, Liying Sun, et Yunfeng Wu. 2018. « Phytoplasma effector SWP1 induces witches' broom symptom by destabilizing the TCP transcription factor BRANCHED1 ». *Molecular Plant Pathology* 19 (12): 2623-34. <https://doi.org/10.1111/mpp.12733>.

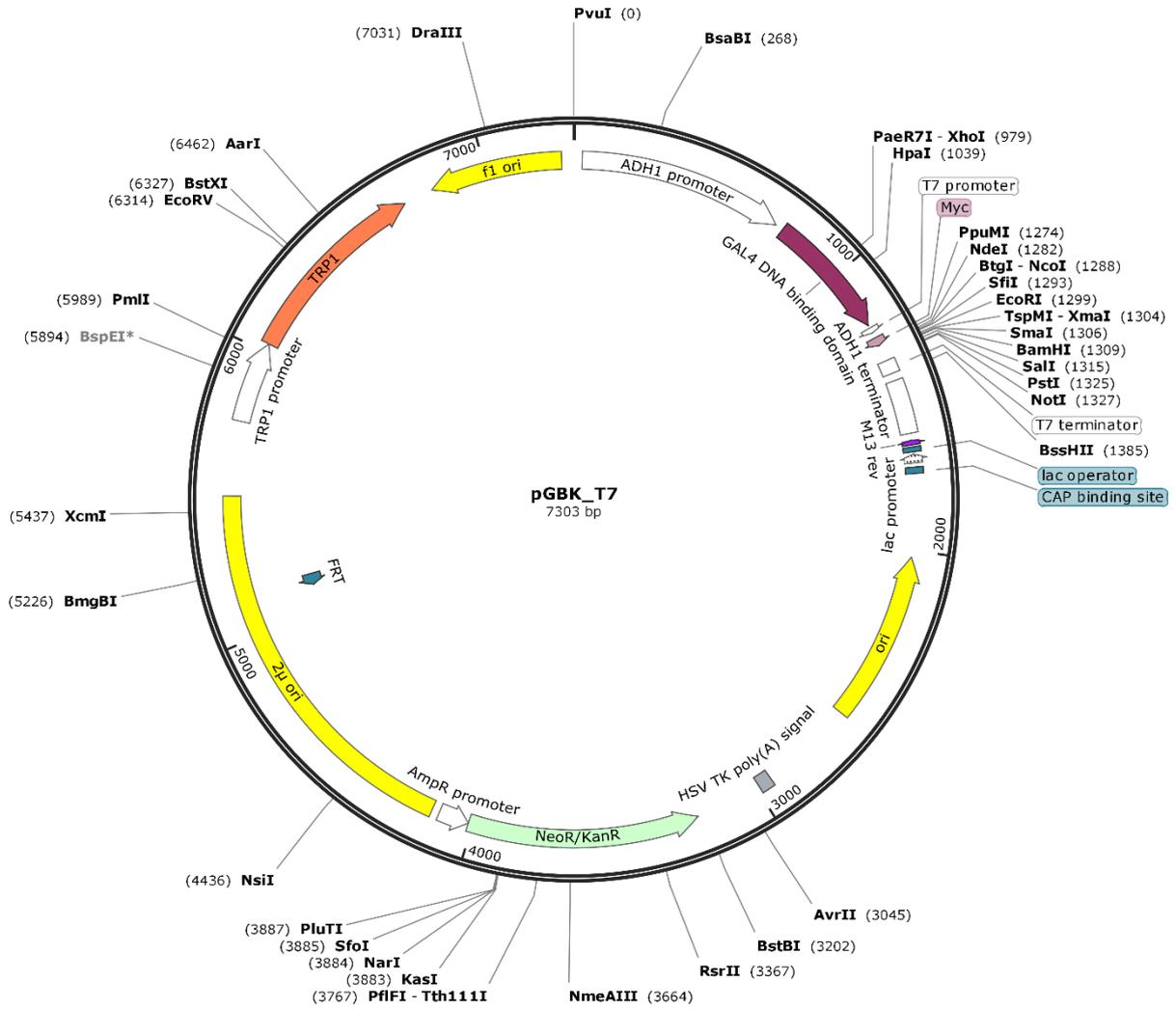
- Weintraub, Phyllis G., et LeAnn Beanland. 2006. « Insect Vectors of Phytoplasmas ». *Annual Review of Entomology* 51 (1): 91-111. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.151039>.
- Whitcomb, R. F., D. D. Jensen, et Jean Richardson. 1966. « The Infection of Leafhoppers by Western X-Disease Virus: I. Frequency of Transmission after Injection or Acquisition Feeding ». *Virology* 28 (3): 448-53. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(66\)90057-2](https://doi.org/10.1016/0042-6822(66)90057-2).
- Wigge, Philip A., Min Chul Kim, Katja E. Jaeger, Wolfgang Busch, Markus Schmid, Jan U. Lohmann, et Detlef Weigel. 2005. « Integration of Spatial and Temporal Information during Floral Induction in Arabidopsis ». *Science (New York, N.Y.)* 309 (5737): 1056-59. <https://doi.org/10.1126/science.1114358>.
- Winter, Cara M., Ryan S. Austin, Servane Blanvillain-Baufumé, Maxwell A. Reback, Marie Monniaux, Miin-Feng Wu, Yi Sang, et al. 2011. « LEAFY Target Genes Reveal Floral Regulatory Logic, Cis Motifs, and a Link to Biotic Stimulus Response ». *Developmental Cell* 20 (4): 430-43. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.03.019>.
- Wu, Miin-Feng, Yi Sang, Staver Bezhani, Nobutoshi Yamaguchi, Soon-Ki Han, Zhenteng Li, Yanhui Su, Thomas L. Slewinski, et Doris Wagner. 2012. « SWI2/SNF2 chromatin remodeling ATPases overcome polycomb repression and control floral organ identity with the LEAFY and SEPALLATA3 transcription factors ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (9): 3576-81. <https://doi.org/10.1073/pnas.1113409109>.
- Yang, Chiao-Yin, Yu-Hsin Huang, Chan-Pin Lin, Yen-Yu Lin, Hao-Chun Hsu, Chun-Neng Wang, Li-Yu Daisy Liu, Bing-Nan Shen, et Shih-Shun Lin. 2015. « MicroRNA396-Targeted SHORT VEGETATIVE PHASE Is Required to Repress Flowering and Is Related to the Development of Abnormal Flower Symptoms by the Phyllody Symptoms1 Effector ». *Plant Physiology* 168 (4): 1702-16. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00307>.
- Yang, Yingzhen, Laura Fanning, et Thomas Jack. 2003. « The K Domain Mediates Heterodimerization of the Arabidopsis Floral Organ Identity Proteins, APETALA3 and PISTILLATA ». *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 33 (1): 47-59. <https://doi.org/10.1046/j.0960-7412.2003.01473.x>.
- Yang, Yingzhen, et Thomas Jack. 2004. « Defining Subdomains of the K Domain Important for Protein-Protein Interactions of Plant MADS Proteins ». *Plant Molecular Biology* 55 (1): 45-59. <https://doi.org/10.1007/s11103-004-0416-7>.
- Yanofsky, M. F., H. Ma, J. L. Bowman, G. N. Drews, K. A. Feldmann, et E. M. Meyerowitz. 1990. « The Protein Encoded by the Arabidopsis Homeotic Gene *Agamous* Resembles Transcription Factors ». *Nature* 346 (6279): 35-39. <https://doi.org/10.1038/346035a0>.
- Yin, Zhou, Mischa Machius, Eric J. Nestler, et Gabby Rudenko. 2017. « Activator Protein-1: Redox Switch Controlling Structure and DNA-Binding ». *Nucleic Acids Research* 45 (19): 11425-36. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx795>.
- Zhao, Kate Qin, Robin Hurst, Michael R. Slater, et Robert F. Balleit. 2007. « Functional Protein Expression from a DNA Based Wheat Germ Cell-Free System ». *Journal of Structural and Functional Genomics* 8 (4): 199-208. <https://doi.org/10.1007/s10969-007-9035-2>.
- Zhao, Li, Kate Q. Zhao, Robin Hurst, Michael R. Slater, Thomas B. Acton, G. V. T. Swapna, Ritu Shastry, Gregory J. Kornhaber, et Gaetano T. Montelione. 2010. « Engineering of a Wheat Germ Expression System to Provide Compatibility with a High Throughput PET-Based Cloning Platform ». *Journal of Structural and Functional Genomics* 11 (3): 201-9. <https://doi.org/10.1007/s10969-010-9093-8>.

- Zhao, Yan, et Robert E. YR 2016 Davis. 2016. « Criteria for phytoplasma 16Sr group/subgroup delineation and the need of a platform for proper registration of new groups and subgroups ». *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 66 (5): 2121-23. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000999>.
- Zhu, Yang, Samantha Klasfeld, Cheol Woong Jeong, Run Jin, Koji Goto, Nobutoshi Yamaguchi, et Doris Wagner. 2020. « TERMINAL FLOWER 1-FD complex target genes and competition with FLOWERING LOCUS T ». *Nature Communications* 11 (octobre): 5118. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18782-1>.

# Annexes



Annexe 1 : Carte du vecteur pGAD-T7.

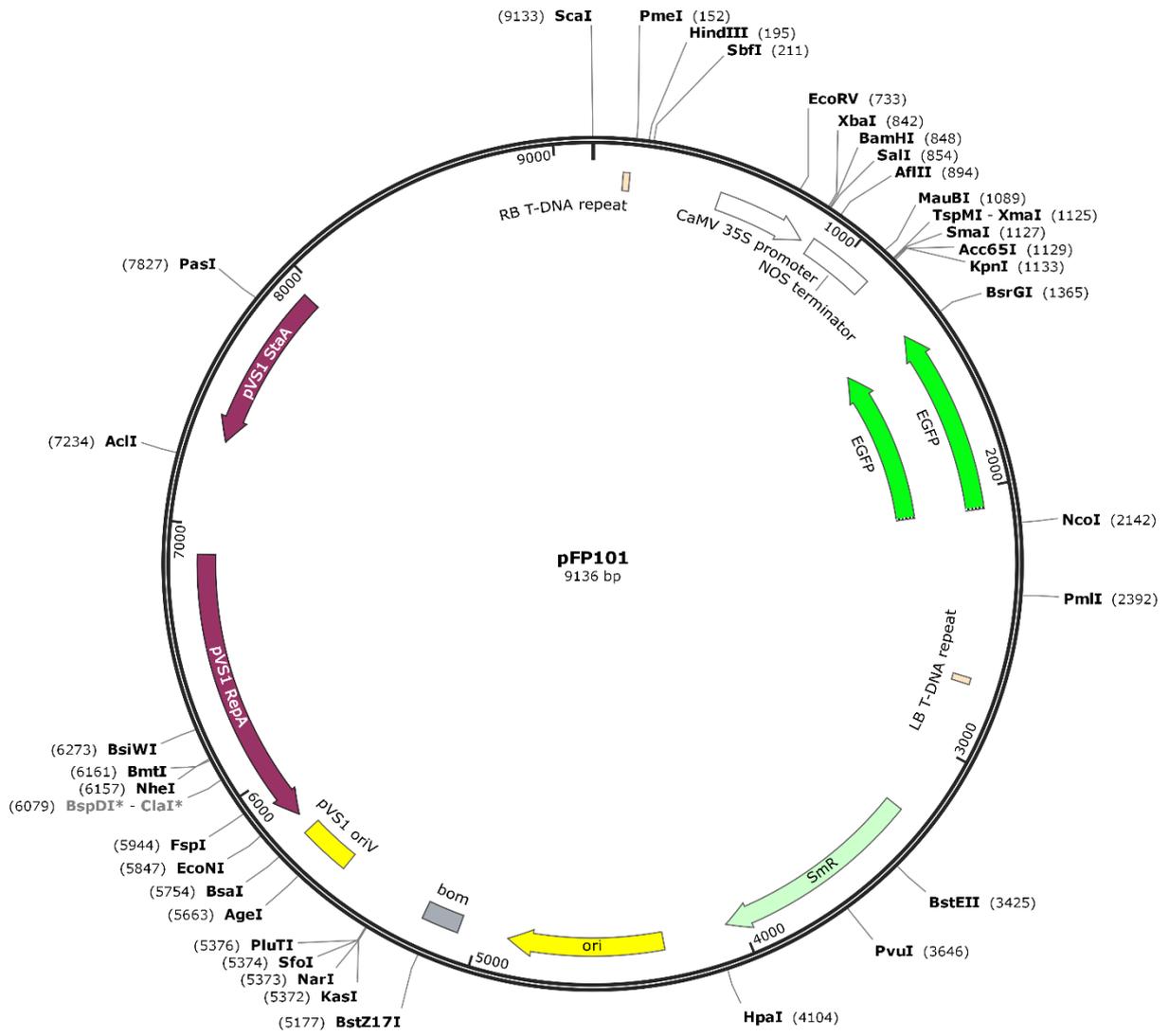


Annexe 2 : Carte du vecteur pGBK-T7.

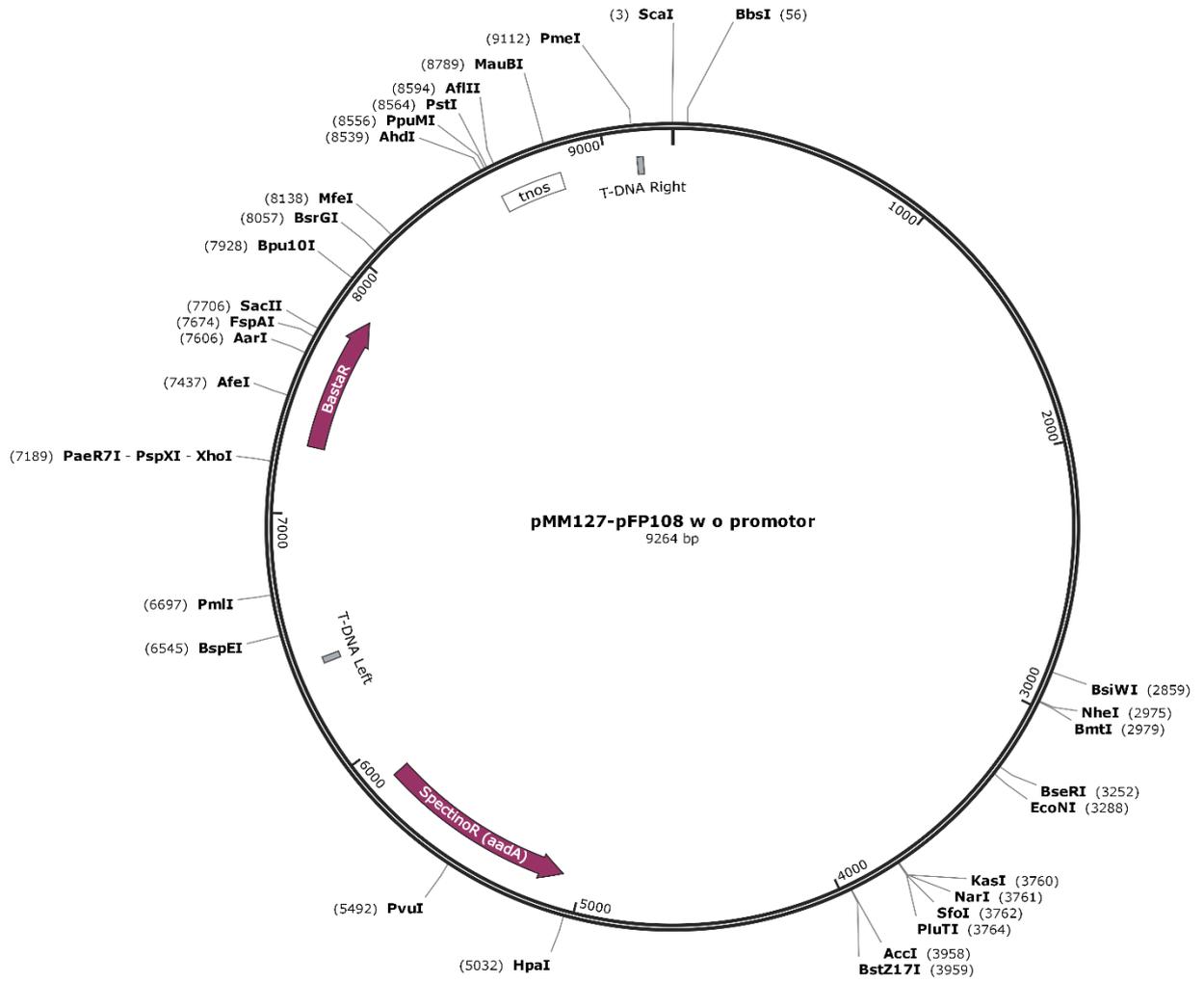
Numéro d'amorces	F ou R	Séquence	Température pour la PCR (en °C)	Utilisation
1	F	tatggccatggaggccagtgAAATGGGAAGAGGAGTAGAGCTG	66,6	Amplification de <i>SEP1</i> pour pGAD-T7
	R	atcgatgccaccgggtggTCAGAGCATCCACCCCGG		
2	F	tatggccatggaggccagtgAAATGGGAAGAGGAGTAGAGC	63,8	Amplification de <i>SEP2</i> pour pGAD-T7
	R	atcgatgccaccgggtggTCACAGCATCCAGCCAGG		
3	F	tatggccatggaggccagtgAAATGGGAAGAGGAAAG	58	Amplification de <i>SEP4</i> pour pGAD-T7
	R	atcgatgccaccgggtggTCAGACCATCCATCCAGG		
4	F	tatggccatggaggccagtgAAATGGGAAGAGGGAGAG	58,5	Amplification de <i>SEP3</i> pour pGAD-T7
	R	atcgatgccaccgggtggTCAATAGAGTTGGTGCATAAG		
5	F	gcatatggccatggaggccgAAATGAACAAAGACATCGCATC	60,9	Amplification de <i>PHYL1<sub>OR</sub></i> pour pGBK-T7
	R	caggtcgacggatccccgggTAAATTGTTTTTCATTCAGCGTTTTTC		
6	F	GGACACAGTTTGCTCTTGACCAGCTC	55	Mutagenèse <i>SEP3</i> <sup>M150A</sup>
	R	GAGCTGGTCAAGAGCAAAGTGTGCC		
7	F	GCTTGACCAGGCTAACGATCTTC	55	Mutagenèse <i>SEP3</i> <sup>L154A</sup>
	R	GAAGATCGTTAGCCTGGTCAAGC		
8	F	CAGCTCAACGATGCTCAGAGTAAGG	55	Mutagenèse <i>SEP3</i> <sup>L157A</sup>
	R	CCTTACTGAGCATCGTTGAGCTG		
9	F	GAAGCATGgcGACTGAGACAAAT	55	Mutagenèse <i>SEP3</i> <sup>L164A</sup>
	R	ATTTGTCTCAGTgcCATGCGTTC		
10	F	acaAATAAACTgcAAGACTAAGGTTA	55	Mutagenèse <i>SEP3</i> <sup>L171A</sup>
	R	TAACTTAGTCTTgcAGTTTTATtgt		
11	F	AGGACACAGTTTGCTCTTGACCAGGCTAACGAT	55	Mutagenèse <i>SEP3</i> <sup>M150A+L154A</sup>
	R	ATCGTTAGCCTGGTCAAGAGCAAAGTGTCTCT		
12	F	CAGATCGAGACCCTCAAGAAAAGAAC	55	Mutagenèse <i>AP3</i> <sup>T150L</sup>
	R	GTTCTTTTCTTGAGGGTCTCGATCTG		
13	F	AAGAACAAAAGTCTACAAGACATACAA	55	Mutagenèse <i>AP3</i> <sup>Q157L</sup>
	R	TTGTATGTCTGTAGACTTTTGTCTT		
14	F	acaagctgactctagagATGAACAAAGACATCGCATCG	60,9	Amplification de <i>PHYL1<sub>OR</sub></i> pour pFP101
	R	atctgcaggtcgacgTAAATTGTTTTTCATTCAGCGTTTTTC		
15	F	cctgcaggtcgactctagaggaattcaacatgtagcatag	59	Amplification de promoteur de <i>SEP3</i> pour pFP100
	R	ctttgttcatTTTCTTTTTCTTCTCTCTCCC		
16	F	gcatgcctgcaggtcgactctagagcgtggtgtagaagatagc	59,5	Amplification de promoteur de <i>AP1</i> pour pFP100
	R	ctttgttcatTTTTGATCCTTTTTAAGAAACTTCTTAC		
17	F	gaaaaagaaaATGAACAAAGACATCGCATCG	60,9	Amplification de <i>PHYL1<sub>OR</sub></i> pour <i>SEP3::pFP100</i>
	R	ttgaacgatTAAATTGTTTTTCATTCAGCGTTTTTC		
18	F	aggatcaaaaATGAACAAAGACATCGCATCG	60,9	Amplification de <i>PHYL1<sub>OR</sub></i> pour <i>AP1::pFP100</i>
17	R	ttgaacgatTAAATTGTTTTTCATTCAGCGTTTTTC		
19	F	aaacaattaaGATCGTTCAAACATTTGGCAATAAAG	57	Amplification de tNOS pour pFP100
	R	aaaatccagtggtaccgggGATCTAGTAACATAGATGACACCG		

### Annexe 3 : Liste des amorces utilisées dans cette thèse (suite ci-dessous).

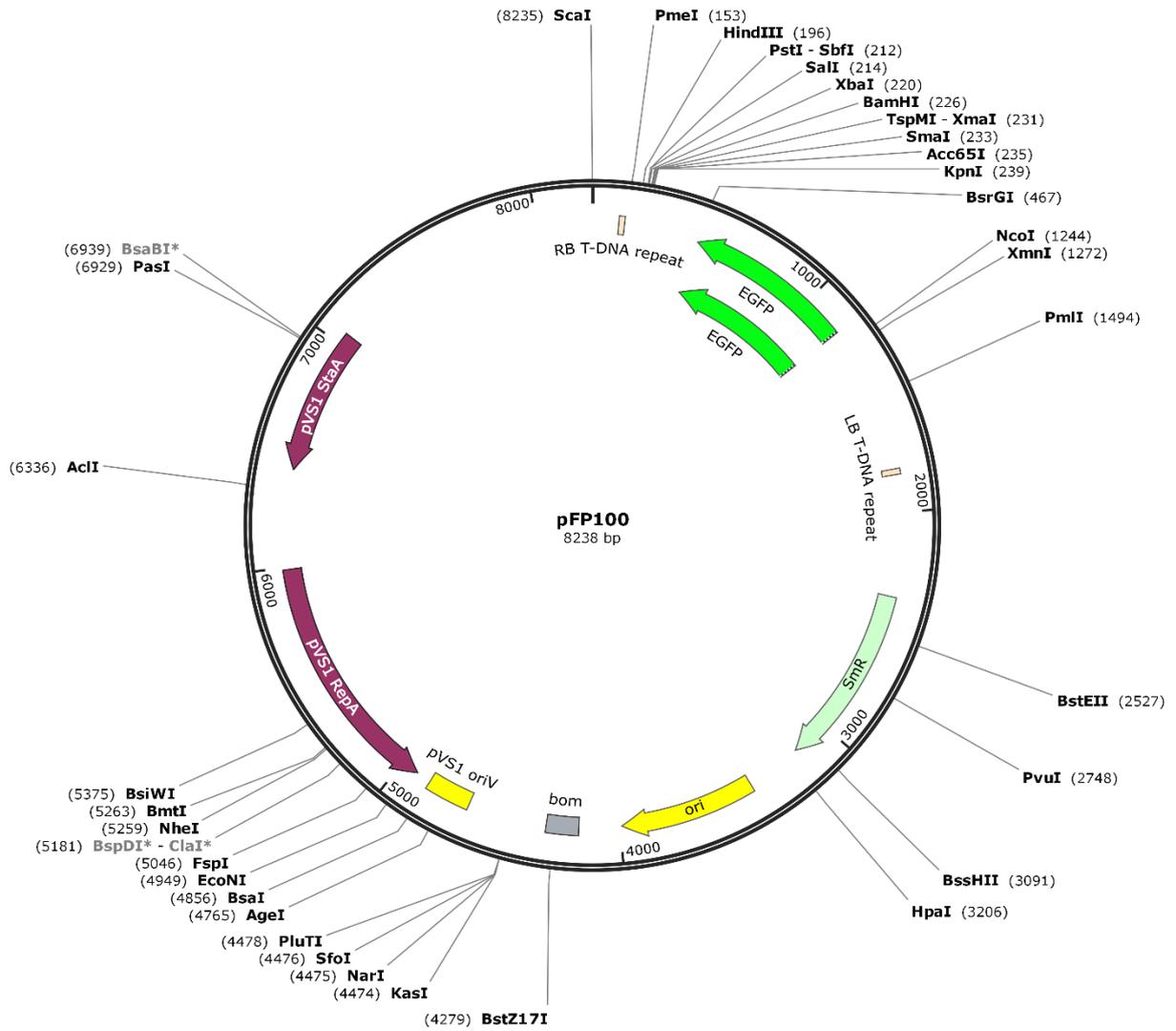
Numéro d'amorces	F ou R	Séquence	Température pour la PCR (en °C)	Utilisation
20	F	CGTACGTACGTGTTCTATCATATC	60	Génotypage des plantes : version sauvage <i>SEP3</i>
	R	CACTCTCTGAAGGTAGCTGAAG		
21	F	CGTACGTACGTGTTCTATCATATC	58	Génotypage des plantes : version mutante <i>sep3</i>
20	R	GAAAGATTCAAATAGAGTTGGTGTC		
22	F	ttttcagggacgtcgaATGAACAAGACATCGCATCG	60,9	Amplification de <i>PHYL1<sub>0Y</sub></i> pour pESPRIT2
	R	tccggatgcattctcaTTAATTGTTTTTCATCATTAGCGTTTTTC		
23	F	TGAGAATGCATCCGGAATG	55	Linéarisation de pESPRIT2
	R	TCGACGTCCTGAAAATAC		
24	F	AATGATGAAAACAATgtTAATGAGAATGC	55	Mutagenèse dirigée : ajout de Cys en C-terminal de <i>PHYL1<sub>0Y</sub></i>
	R	GCATTCTCATTaacaATTGTTTTTCATCATT		
25	F	ggagatataccatgggcTATGGAGCACCAGAACCC	58,9	Déletion du tag 6xHis et site TEV de <i>SEP3</i> <sup>[75-178]</sup>
	R	TCTGGTGCTCCATAGCCCATGGTATATCTCCTTcttaag		
26	F	AAGAAGGAGATATACATCATCACCATCACCATCACCCATGAAAATCGAAG	55	Mutagenèse dirigée pour inclure le tag 6xHis d'AG <sup>[90-189]</sup>
	R	CTTCGATTTTCATGGGGTGATGGTGATGGTGATGATGATATATCTCCTTCTT		
27	F	ggagatataccatgggcTAGGCATAATGCTTAAGTCGAAC	55	Mutagenèse dirigée pour retirer la séquence de <i>SEP3</i> <sup>[75-178]</sup>
	R	TCTGGTGCTCCATAGCCCATGGTATATCTCCTTcttaag		
28	F	caggtcgactctagagATGGGAAGAGGGAGAGTAG	58,8	Amplification de <i>SEP3</i> pour pSP64
	R	gggagctgccccgggTCAAATAGAGTTGGTGTCATAAGG		
29	F	GACGATAACTCCATCTTTCTATTTTG	50	Sonde 52pb pour les EMSAs
	R	CGTAATGGGAAGGGACCTC		
29	F	GACGATAACTCCATCTTTCTATTTTG	50	Sonde 103pb pour les EMSAs
30	R	GAACCGTTGGATTAATCTGC		



Annexe 4 : Carte du vecteur pFP101.

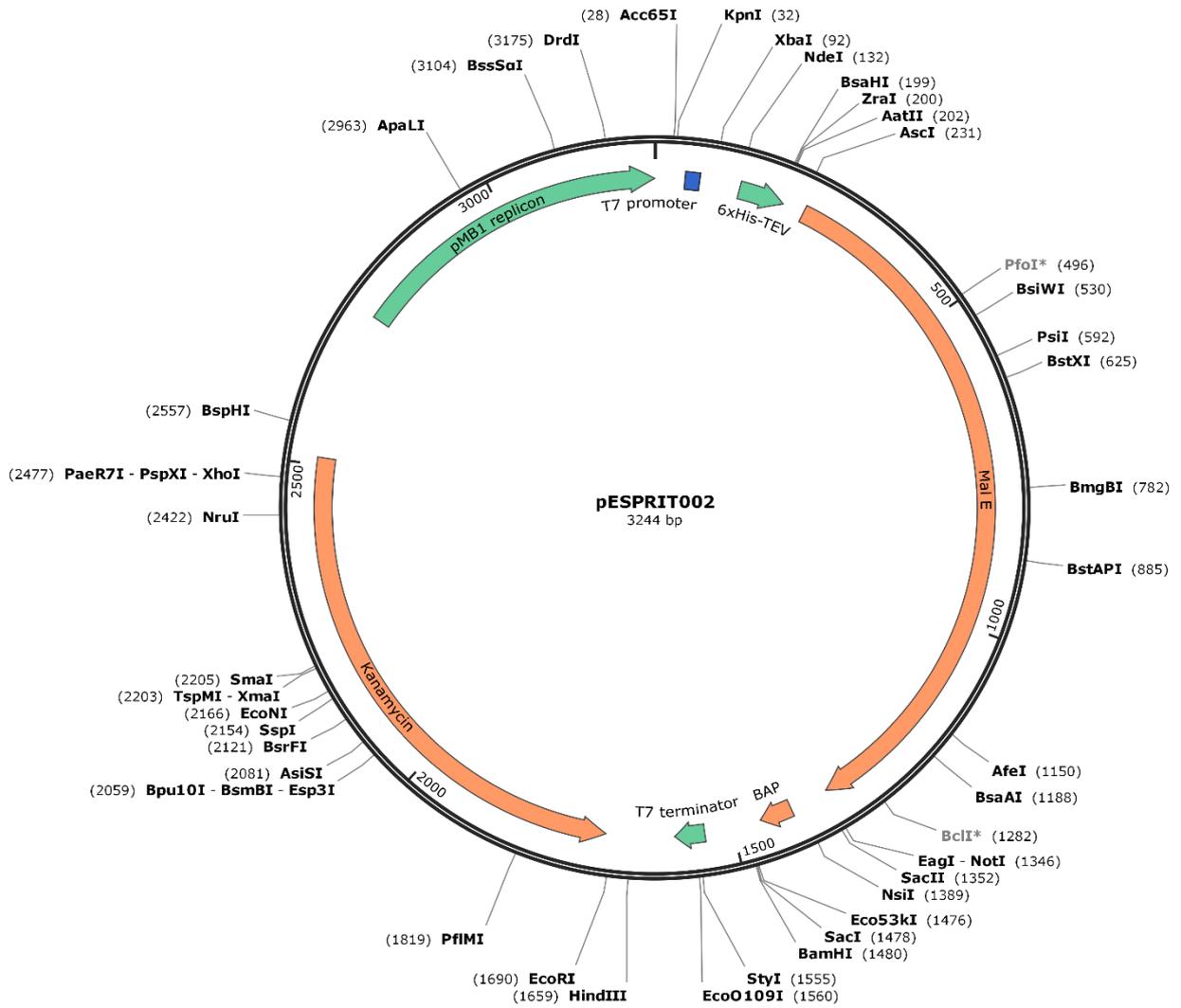


Annexe 5 : Carte du vecteur pMM127.

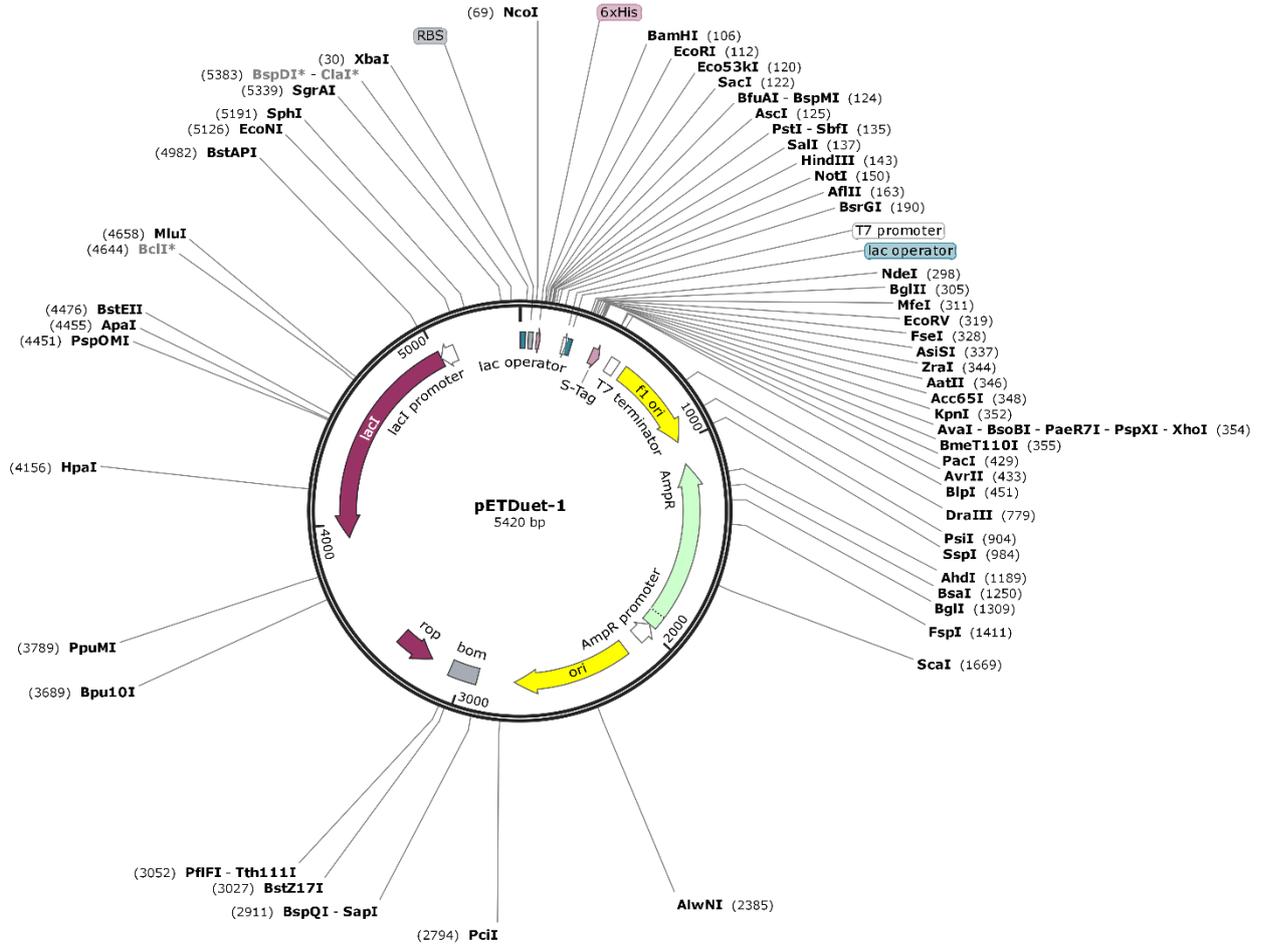


Annexe 6 : Carte du vecteur pFP100.

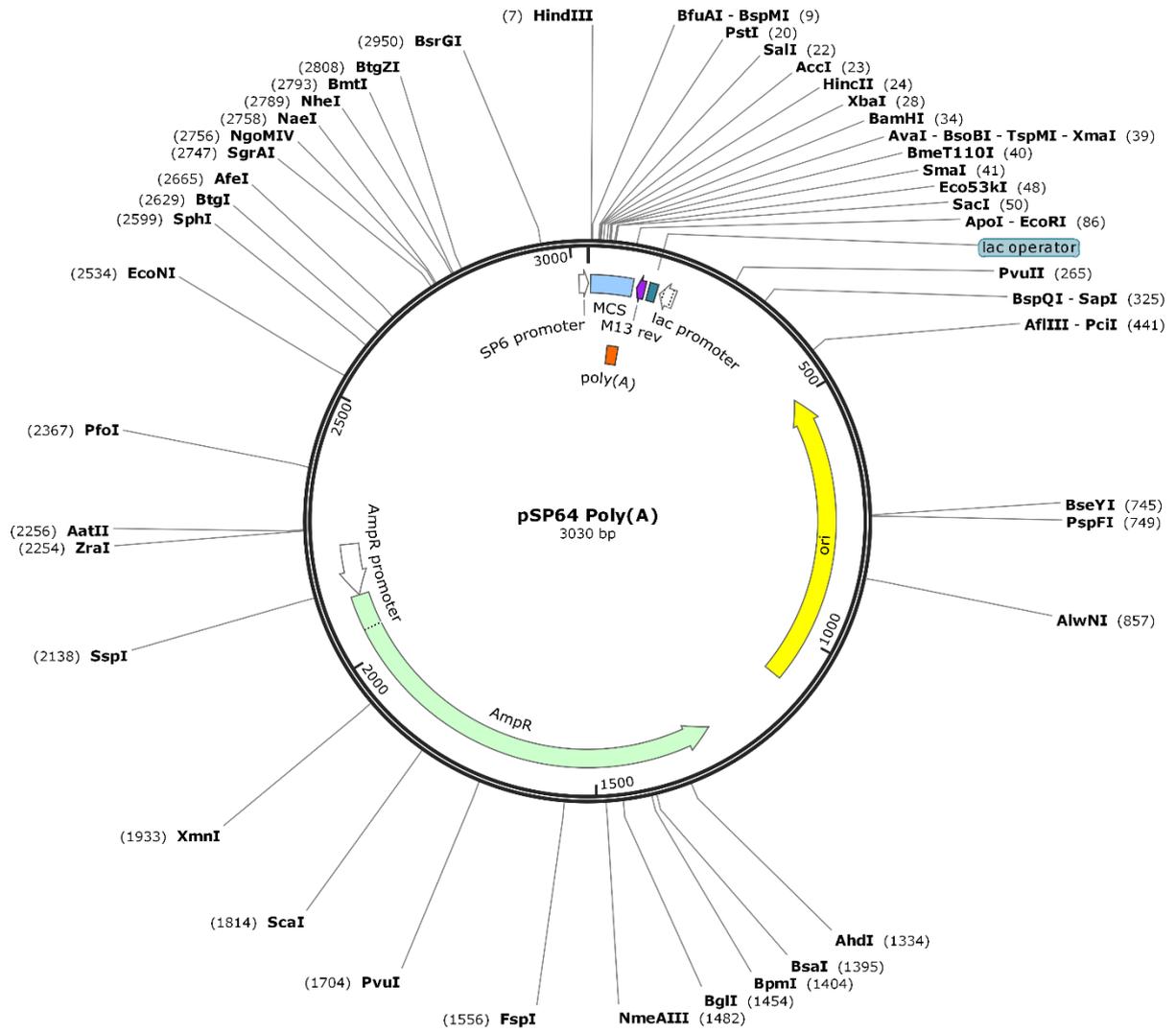




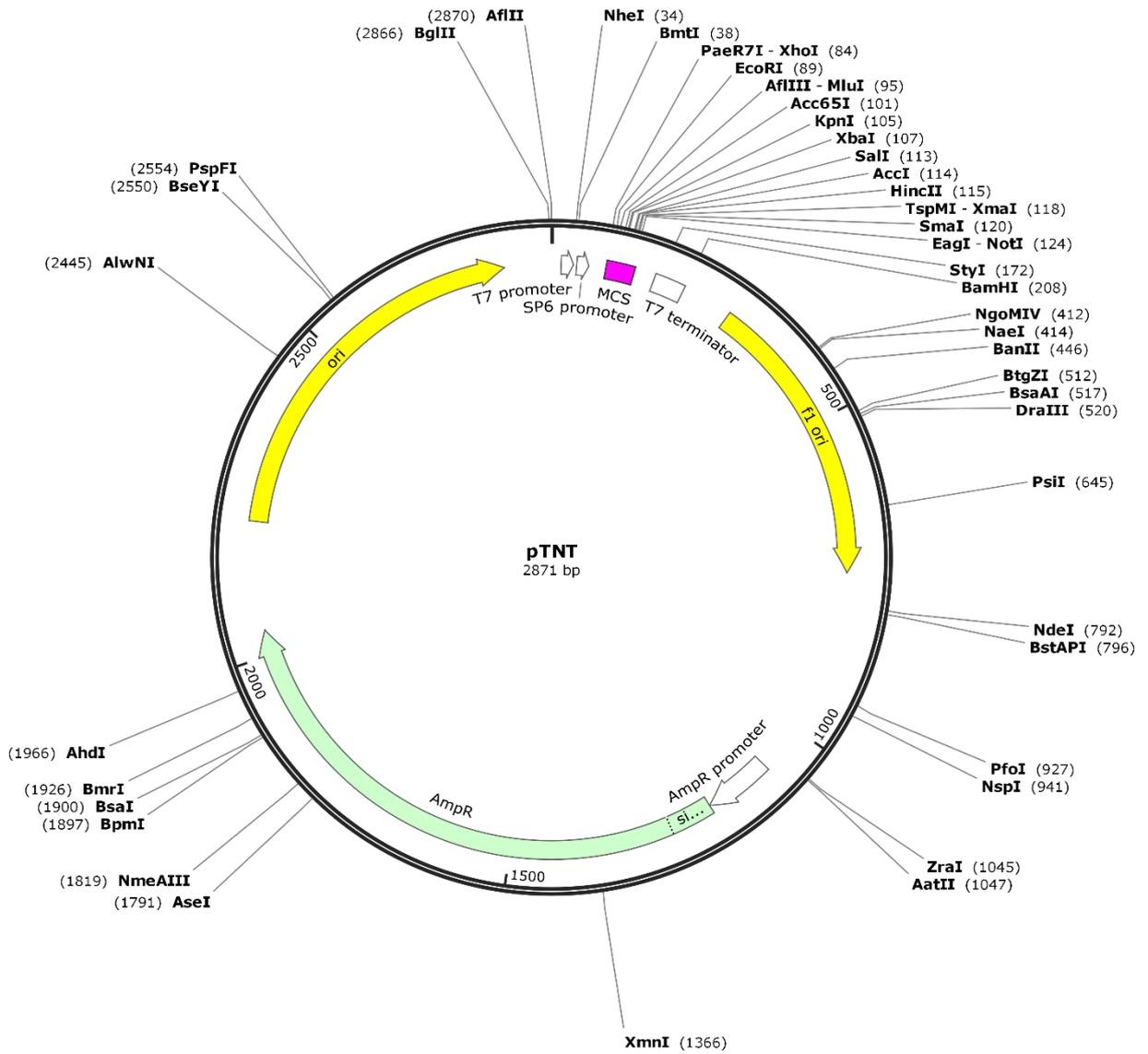
Annexe 8 : Carte du vecteur pESPRIT2.



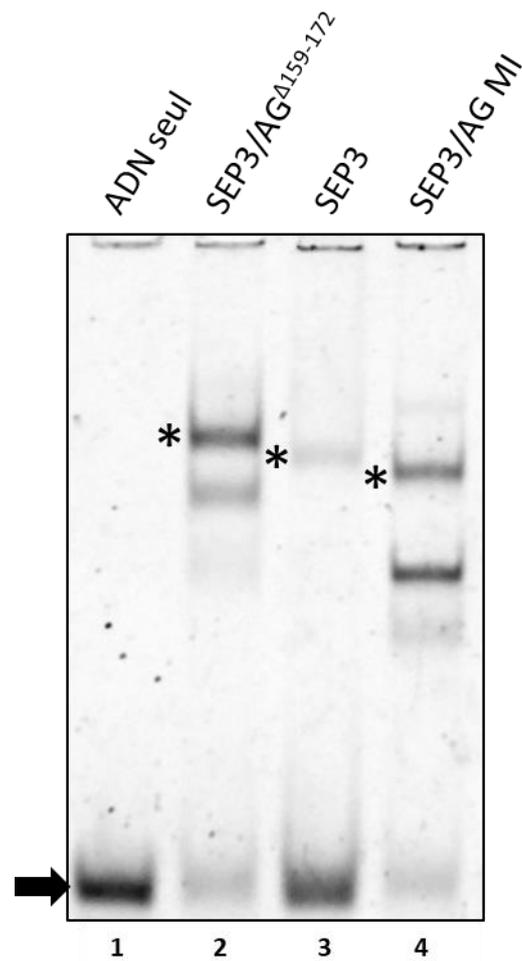
Annexe 9 : Carte du vecteur pETDUET-1.



Annexe 10 : Carte du vecteur pSP64 PolyA.



Annexe 11 : Carte du vecteur pTNT.



**Annexe 12 : Différence de migration entre un complexe SEP3/AG<sup>Δ159-172</sup>/GST-PHYL1<sub>0Y</sub>, un complexe SEP3/SEP3/GST-PHYL1<sub>0Y</sub> et un complexe SEP3/AG MI/GST-PHYL1<sub>0Y</sub>.** Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) de SEP3/AG<sup>Δ159-172</sup>, SEP3/SEP3 et SEP3/AG MI mis en contact avec GST-PHYL1<sub>0Y</sub> avec de l'ADN marqué du promoteur de SEP3 contenant une CARG-box. La protéine GST-PHYL1<sub>0Y</sub> est ajoutée à 667nM. Les complexes sont annotés par des astérisques et la flèche noire représente l'ADN libre.

(retour aux résultats ici → Figure 68)

## Résumé :

Les phytoplasmes sont des bactéries pathogènes obligatoires de plantes qui se propagent par les insectes et infectent les cellules du phloème des plantes. Les infections par les phytoplasmes peuvent entraîner la maladie du « balai de sorcière », le nanisme et la phyllodie qui est la transformation homéotique des organes floraux en structures semblables à des feuilles. Les pertes économiques dues à l'infection de cultures agronomiques par les phytoplasmes sont très importantes et il n'existe aucun traitement efficace contre les phytoplasmes. Il est donc essentiel de comprendre comment ils interagissent avec et modifient les voies de développement de la plante hôte pour comprendre les phénotypes induits et développer des stratégies et des traitements efficaces.

Des études récentes ont montré que les phytoplasmes produisent des facteurs de virulence causant la phyllodie, appelés phyllogènes. Les phyllogènes sont de petites protéines alpha-hélicoïdales qui interagissent avec les facteurs de transcription (TFs) MADS de la plante hôte. Les MADS-TFs forment différents tétramères hétéromériques et chaque tétramère régule un ensemble distinct de gènes cibles importants pour le développement des organes floraux. Les phyllogènes interagissent avec les MADS-TFs et entraînent leur dégradation par le protéasome de la plante ce qui empêche la formation des organes floraux.

Les mécanismes par lesquels les phyllogènes interagissent avec seulement certains des MADS-TFs floraux n'ont pas été élucidés. Pour caractériser ces mécanismes, nous avons étudié les homocomplexes et hétérocomplexe des MADS-TFs, SEPALLATA3 et AGAMOUS, et leur interaction avec le phyllogène, PHYL1<sub>OY</sub> de la souche "Candidatus *Phytoplasma asteris*" d'Onion Yellow. En utilisant des techniques *in vitro*, *in vivo* et d'études structurales, nous avons déterminé que PHYL1<sub>OY</sub> cible l'interface de tétramérisation des TFs MADS et se lie en monomère à deux protéines MADS via la surface hydrophobe nécessaire à la tétramérisation. La liaison nécessite la présence de leucines hautement conservées présentes dans un sous-ensemble de MADS-TFs. Ces expériences définissent les interactions protéine-protéine nécessaires aux interactions de PHYL1<sub>OY</sub> avec les MADS-TFs et montrent le mimétisme structural d'une protéine bactérienne.

## Abstract :

Phytoplasmas are obligate plant pathogenic bacteria that spread by insects and infect plant phloem cells. Phytoplasma infections can result in witch's broom, dwarfism and phyllody, the homeotic conversion of floral organs to leaf-like structures. The economic loss due to phytoplasma infections of crop plants is already very important and there are no effective treatments. Thus, understanding how phytoplasmas interact with the host plant and rewire developmental pathways is key to both understanding the phytoplasma-induced phenotypes and developing strategies and successful treatments for phytoplasma-infected plants.

Recent studies have demonstrated that phytoplasmas produce virulence factors responsible for phyllody, called phyllogens. Phyllogens are small alpha-helical proteins that interact with host plant MADS transcription factors (TFs). MADS TFs form different heteromeric tetramers and each tetramer regulates a distinct set of target genes important for flowering and floral organ development. Phyllogen binding to MADS TFs results in the proteasomal degradation of the host MADS TFs and prevents the formation of flowers.

How phyllogens interact with only a subset of floral MADS TFs is unclear. To understand this, we studied the homocomplexes and heterocomplex of the MADS TFs, SEPALLATA3 and AGAMOUS, and their interactions with the phyllogen, PHYL1<sub>OY</sub> of "Candidatus *Phytoplasma asteris*" Onion Yellow's strain. Using a combination of *in vitro* techniques, *in vivo* assays and structural studies, we have determined that PHYL1<sub>OY</sub> targets the tetramerization interface of the MADS TFs. The monomer PHYL1<sub>OY</sub> binds to a dimer of MADS proteins via the hydrophobic surface needed for tetramerization and requires the presence of highly conserved leucine residues present in a subset MADS TFs. These experiments define the protein-protein interactions necessary for PHYL1<sub>OY</sub> interactions with MADS TFs and demonstrate the elegant use of structural mimicry by a bacterial protein.