



**HAL**  
open science

# La régulation transcriptionnelle dépendant de l'éthylène

Fabiola Jaimes-Miranda

► **To cite this version:**

Fabiola Jaimes-Miranda. La régulation transcriptionnelle dépendant de l'éthylène: Caractérisation fonctionnelle d'un cofacteur transcriptionnel du type MBF1 et d'un facteur de transcription de la famille des ERF chez la tomate. Physiologie [q-bio.TO]. Institut National Polytechnique (Toulouse), 2006. Français. NNT : 2006INPT001A . tel-04577424

**HAL Id: tel-04577424**

**<https://ut3-toulouseinp.hal.science/tel-04577424>**

Submitted on 16 May 2024

**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.

N° d'ordre : 2320

# THESE

présentée

pour obtenir

**LE TITRE DE DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE TOULOUSE**

**École doctorale: Sciences Agronomiques**

Spécialité : Biologie moléculaire et physiologie végétale

Par Mlle. Fabiola JAIMES MIRANDA

La régulation transcriptionnelle dépendant de l'éthylène. Caractérisation fonctionnelle d'un cofacteur transcriptionnel du type MBF1 et d'un facteur de transcription de la famille des ERF chez la tomate.

Soutenue le 27 Janvier 2006 devant le jury composé de :

M.	Jean-Claude PECH .....	Président
Mme.	Jacqueline GRIMA PETTENATI ...	Rapporteur
M.	Guy ALBAGNAC .....	Rapporteur
M.	Saïd HAMDI .....	Rapporteur
M.	Farid REGAD .....	Membre
M.	Mondher BOUZAYEN .....	Directeur de thèse

## **Remerciements**

Je tiens à remercier tout d'abord l'ensemble du groupe génomique et biotechnologie des fruits. Merci pour toutes ces heures de partage de convivialité, pour toutes ces discussions et toutes les solutions que nous avons trouvé ensemble.

Je remercie en particulier Farid Regad, Isabelle Mila, Simone Albert, Julien Pirrello, Maite Sánchez et Mondher Bouzayen pour leur participation enthousiaste et courageuse qui a fait que ce travail soit aujourd'hui entre vos mains.

Je remercie de tout mon cœur à Ricardo Chávez Montes pour tout son soutien et pour m'avoir encouragé à commencer et à poursuivre cette aventure.

Cependant, cette histoire commence il y a longtemps (mais pas trop longtemps non plus) avec l'appui inconditionnel de mes parents Felisa Miranda et Jaime Jaimes et de ma grand-mère Felisa Pérez Miranda, auxquels je remercie énormément. Et il ne faut surtout pas oublier ma sœur Verónica et mon frère Jaime.

Ce travail définitivement n'aurait été possible sans le financement des gouvernements mexicain et français à travers une bourse CONACyT-SFERE numéro 138471.

## Publications réalisées au cours de la thèse

---

Jaimes-Miranda F<sup>1</sup>, Sanchez-Ballesta MT<sup>1</sup>, Tournier B, Zegzouti H, Mila I, Latche A, Pech JC, Regad F, and Bouzayen M.

**Functional characterisation of LeMBF1/ER24 a distinct member of the tomato MBF1-like gene family of transcriptional coactivator.**

*1: These authors contributed equally to this work.*

Pirrello J<sup>1</sup>, Jaimes-Miranda F<sup>1</sup>, Sanchez-Ballesta MT, Tournier B, Khalil-Ahmad Q, Latche A, Pech JC, Regad . and Bouzayen M

**LeERF2, a tomato Ethylene Response Factor involved in ethylene response and seed germination.**

*1: These authors contributed equally to this work*

## Posters

---

Jaimes-Miranda F, Sanchez-Ballesta MT, Regad F, Mila I, Bouzayen M. (2004).

**Functional characterisation of a tomato MBF1-like gene family encoding a new type of plant transcriptional regulators.** 14th FESPB Congress, Cracow, Poland. Acta Physiologiae Plantarum, 26 (3 suppl): 23.

# Sommaire

---

<b>Introduction au sujet de thèse</b> .....	1
<b>OBJECTIFS DES TRAVAUX ET PRINCIPALES ACQUISITIONS</b> .....	1
<b>Contexte scientifique général</b> .....	1
<b>Les régulateurs transcriptionnels, éléments essentiels de la signalisation hormonale</b> .....	2
<b>Le modèle végétal et les approches méthodologiques</b> .....	2
<b>Le contrôle de l'expression génique dépendant de l'éthylène au niveau transcriptionnel</b> .....	3
<b>La famille des MBF1 de la tomate, un nouveau type de régulateurs transcriptionnels</b> .....	3
<b>Chapitre 1</b> .....	7
<b>Revue bibliographique</b> .....	7
<b>1.1 Les hormones végétales</b> .....	7
1.1.1 L'auxine.....	9
1.1.2 Les cytokinines.....	13
1.1.3 L'acide abscissique.....	15
1.1.4 Les gibbérellines.....	17
1.1.5 L'éthylène.....	21
<b>1.2 Perception de l'éthylène et transduction du signal</b> .....	23
<b>1.3 L'éthylène et les stress</b> .....	29
1.3.1 Le froid.....	29
1.3.2 Les hautes températures.....	29
1.3.3 Les stress mécaniques.....	29
1.3.4 Les stress chimiques.....	30
1.3.5 La résistance aux pathogènes.....	31
<b>1.4 L'éthylène et la germination</b> .....	31
<b>1.5 L'éthylène et la maturation des fruits</b> .....	33
1.5.1 Les gènes associés à la maturation des fruits et leur régulation par l'éthylène.....	35
1.5.2 Stress oxydatif et maturation des fruits.....	37
<b>1.6 Le complexe transcriptionnel et le contrôle de l'expression génique</b> .....	39
1.6.1 Les facteurs de transcription.....	42
1.6.2 Les cofacteurs transcriptionnels.....	43
<b>Chapitre 2</b> .....	49
<b>Caractérisation fonctionnelle de la famille des MBF1 chez la tomate. Un nouveau type de régulateurs transcriptionnels chez les plantes</b> .....	49
<b>2.1 Le cofacteur de la transcription MBF1</b> .....	49
<b>2.2 Article 1</b> .....	57
<b>Abstract</b> .....	59
<b>Introduction</b> .....	60
<b>Results</b> .....	63
<b>Discussion</b> .....	77
<b>Materials and Methods</b> .....	80
<b>References</b> .....	85
<b>2.3 Résultats complémentaires</b> .....	89

Chapitre 3.....	99
3.1 ERF2, Un facteur de transcription de la famille AP2/ERF impliqué dans la réponse à l'éthylène et la germination des graines.....	99
chez la tomate .....	99
3.1.1 Les facteurs de transcription ERF .....	99
3.2 Article 2 .....	103
LeERF2, a tomato Ethylene Response Factor involved in ethylene response and seed germination.....	105
ABSTRACT .....	105
INTRODUCTION .....	106
METHODS .....	107
RESULTS .....	111
DISCUSSION.....	121
REFERENCES .....	123
Discussion générale et perspective du travail.....	129
Supplément de Matériel et Méthodes.....	135
Matériel végétal.....	135
Clonage de MBF1a-c et ER24 .....	135
Ligation, clonage dans E.Coli .....	135
Isolement des clones génomiques.....	135
Isolement du promoteur LeMBF1a .....	135
Extraction des ARN totaux et synthèse d'ADNc.....	135
Constructions.....	135
Transformation génétique.....	140
<i>Arabidopsis thaliana</i> .....	140
Analyse des descendance (R1, R2...) .....	140
Les stress abiotiques .....	141
L'éthylène.....	141
Le méthyl jasmonate.....	141
L'acide salicylique .....	142
La blessure .....	142
MCP + blessure .....	142
Température .....	142
Paraquat .....	142
Expression transitoire d'une protéine de fusion LeMBF1::GFP .....	143
Double hybride.....	143
Références bibliographiques.....	145

## Abréviations

---

ABA	Acide Abscissique
ABAR	ABA Receptor (Récepteur à l'ABA)
ABRE	ABA Response Element (Elément de réponse à l'ABA)
ACC	1-aminocyclopropane-1-acide carboxilique
ACO	ACC oxydase
ACS	ACC synthase
AHP	Arabidopsis histidine phosphotransfer protein
AP2	APETALA 2
ARF	Auxin Response Factor (Facteur de réponse à l'auxine)
ARR	Arabidopsis response regulator
ASA	Ascorbic Acid (Acide ascorbique)
ATP	Adénosine triphosphate
AuxRE	Auxin Response Element (Elément de réponse à l'auxine)
DMAPP	Diméthylallyl pyrophosphate
DPA	days post anthesis
CTR1	Constitutive triple réponse 1
ERE	Ethylene Response Element (Elément de réponse à l'éthylène)
ERF	Ethylene Responsive Factor (Facteur de réponse à l'éthylène)
GA	Gibbérélines
HTH	Hélice-tour-hélice
IPP	Isopentényl pyrophosphate

JA	Jasmonate
MBF1	Multiprotein bridging factor1
AtMBF1	<i>Arabidopsis thaliana</i> MBF1
BmMBF1	<i>Bombix mori</i> MBF1
DmMBF1	<i>Drosophila melanogaster</i> MBF1
HsMBF1	<i>Homo sapiens</i> MBF1
MmMBF1	<i>Mus musculus</i> MBF1
RrMBF1	<i>Retama raetam</i> MBF1
ScMBF1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> MBF1
StMBF1	<i>Solanum tuberosum</i> MBF1
MCP	1-Methylcyclopropène
MTA	5'-methyl-thioadenosine
PG	Polygalacturonase
PR	Pathogenesis-related
ROS	Reactive oxygen species (Espèces réactives d'oxygène)
SA	Salicylic Acid (Acide salicylique)
SAM	S-adenosine-méthionine
TAF	TBP associated Factors (Facteurs associés à la TBP)
TBP	TATA binding protein
TF	Transcription Factor (Facteur de transcription)
WIPK	Wound inducible protein kinase (Protéine Kinase induite par la blessure)



## Introduction au sujet de thèse

---

### OBJECTIFS DES TRAVAUX ET PRINCIPALES ACQUISITIONS

#### ***Contexte scientifique général***

Le développement des fruits, comme l'ensemble des processus de développement des plantes, correspond à un programme génétique dont le déroulement est coordonné par un jeu complexe d'hormones. Ainsi par exemple, le rôle déterminant de l'éthylène au cours de la maturation des fruits de type climactérique comme la tomate, est maintenant bien démontré. Le projet de thèse s'inscrit dans un champ de recherche plus large qui vise à identifier le jeu de signaux hormonaux qui orchestrent le développement et la maturation du fruit. En effet, alors même que les hormones exercent des effets pléiotropiques, les mécanismes qui conduisent à une réponse spécifique du processus de maturation demeurent peu connus.

Les fruits peuvent être divisés en deux catégories, climactériques et non-climactériques, en fonction de la présence ou non d'une crise respiratoire et d'une stimulation de la synthèse d'éthylène. Les mécanismes de base selon lesquels l'éthylène initie et coordonne la maturation des fruits climactériques commencent à être connus. Dans la phase pré-climactérique le fruit acquiert la capacité, à la fois, à répondre à l'éthylène et à synthétiser des quantités importantes de cette hormone. Il est probable que d'autres hormones (auxines, ABA...) dont les niveaux se trouvent modifiés au cours de la maturation jouent également un rôle déterminant dans le processus d'acquisition de la compétence à mûrir. Au laboratoire de génomique et Biotechnologie des Fruits où j'ai réalisé ma thèse, le rôle de la signalisation hormonale dans le contrôle du développement et de la maturation des fruits est abordé ici à travers l'étude de la régulation transcriptionnelle.

### ***Les régulateurs transcriptionnels, éléments essentiels de la signalisation hormonale.***

L'action des hormones s'exerce à travers la modulation de l'expression génique qui est assurée en partie au niveau transcriptionnel par les facteurs de transcription. Ces éléments clés permettent l'amplification, la diversification et la sélectivité de la réponse hormonale. La régulation transcriptionnelle constitue un niveau privilégié où peuvent s'opérer des dialogues entre plusieurs voies de signalisation. Etant donné l'importance des facteurs de transcription dans la mise en place du programme génétique spécifique au développement et à la maturation des fruits, une partie importante du projet scientifique de mon laboratoire d'accueil est consacrée à ces éléments de régulation. Mon projet de thèse s'insère dans ce contexte thématique et se focalise sur les médiateurs transcriptionnels de l'action de l'éthylène. En particulier, deux gènes ont fait l'objet d'une caractérisation fonctionnelle au cours du projet de recherche qui m'a été confié, le premier code un facteur de transcription de type ERF (Ethylene Response Factor) impliqué dans la réponse à l'éthylène et le deuxième code pour un co-activateur transcriptionnel de type MBF1 (Multiprotein Bridging Factor 1) induit par l'éthylène.

### ***Le modèle végétal et les approches méthodologiques***

La tomate (*Lycopersicon esculentum*) est considérée par l'ensemble de la communauté scientifique comme la plante modèle pour l'étude des fruits charnus. Le choix de ce modèle tomate est justifié par la disponibilité de nombreuses ressources génétiques et de génomiques sur cette espèce. L'avantage de cette espèce en tant que modèle expérimental réside également dans sa facilité de culture (3 à 4 générations par an) et de transformation génétique. Bien que les études de génétique moléculaire sur la plante modèle *Arabidopsis thaliana* aient permis de décrypter les voies de transduction de plusieurs hormones, les mécanismes qui canalisent ces voies de signalisation vers l'activation du processus de maturation des fruits restent totalement inconnus. De plus, *Arabidopsis* est un modèle inadapté à l'étude des fruits charnus qui constituent l'essentiel de la production fruitière mondiale.

La caractérisation fonctionnelle des gènes ERF et MBF1 a été réalisée par des approches de génétique inverse consistant à réprimer ou à surexprimer ces gènes dans la tomate ou dans la plante modèle Arabidopsis.

***Le contrôle de l'expression génique dépendant de l'éthylène au niveau transcriptionnel.***

Quatre nouveaux membres de la famille des ERF (Ethylene Response Factor) de la tomate ont été isolés au laboratoire et leur capacité à se lier de façon spécifique à la boîte GCC qui se trouve dans les promoteurs des gènes répondant à l'éthylène a été démontrée *in vitro*. Les études phylogénétiques indiquent que LeERF2 appartient à une nouvelle classe des ERF dont les membres sont caractérisés par la présence d'un motif hautement conservé mais de fonction encore inconnue. LeERF2 est spécifiquement exprimé au cours de la maturation des fruits ce qui suggère qu'il joue un rôle actif au cours de ce processus. La surexpression de LeERF2 chez la tomate entraîne une altération de la réponse à l'éthylène chez les plantes transgéniques et engendre un phénotype de germination précoce des graines. Au cours de ma thèse, j'ai pu démontrer que LeERF2 stimule la germination à travers l'activation du gène codant pour la *mannanase2*.

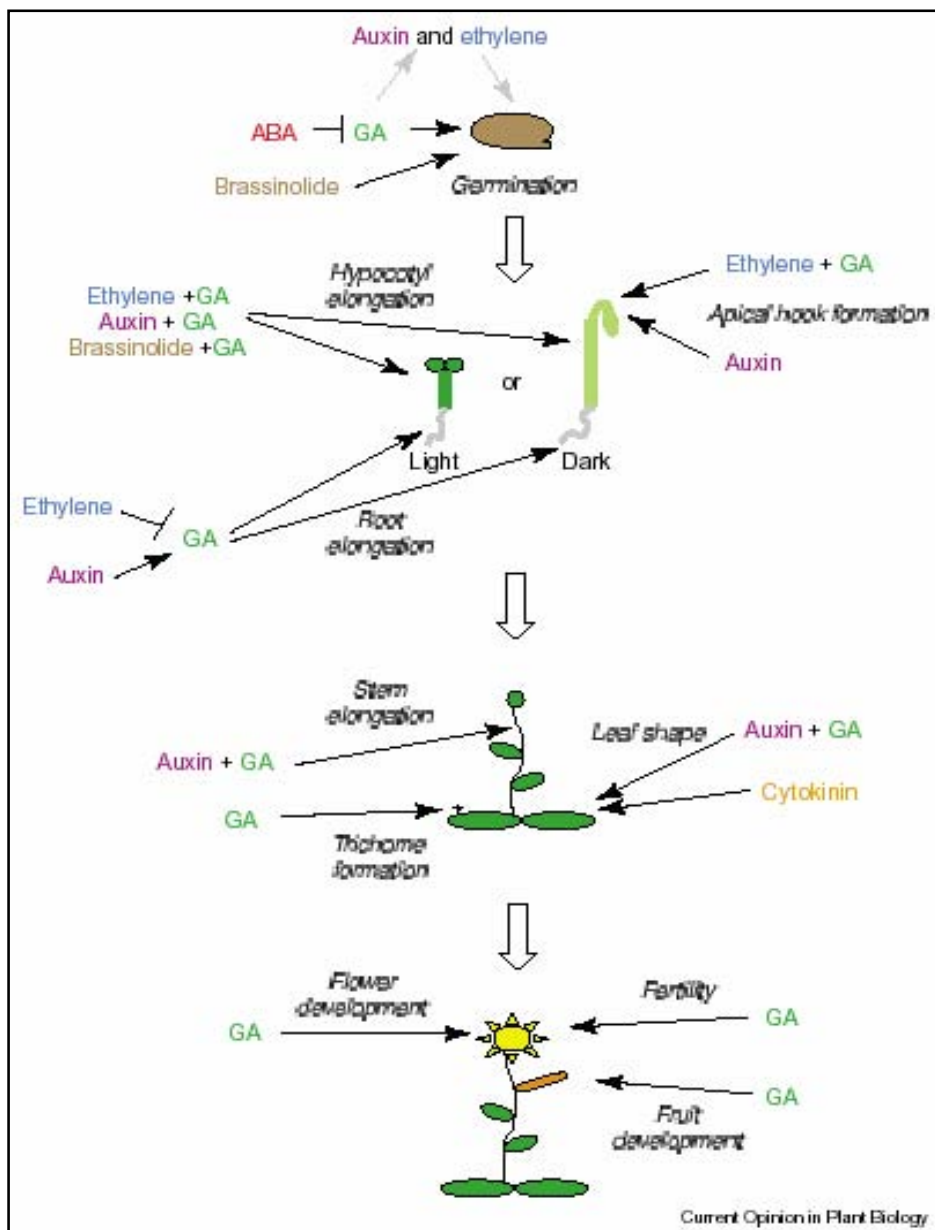
***La famille des MBF1 de la tomate, un nouveau type de régulateurs transcriptionnels.***

Le gène ER24 est le premier régulateur transcriptionnel de type MBF1 (Multiprotein Bridging Factor 1) isolé chez les plantes. Il a été isolé au laboratoire comme un gène de réponse précoce à l'éthylène. Il code pour un composant potentiel du complexe transcriptionnel TAF qui s'associe d'une part à la TBP (TATA-Box Binding Protein) et d'autre part à des facteurs transcriptionnels classiques pour moduler l'activité transcriptionnelle de gènes cibles. Au cours de ma thèse j'ai isolé trois nouveaux membres de cette famille de gènes chez la tomate dont j'ai pu montrer par test de complémentarité de la souche de levure mutante MBF1-déficiente ( $\Delta mbf1$ ) qu'ils codent pour des activateurs transcriptionnels fonctionnels. Les quatre protéines MBF1 de la tomate sont capables de se lier à la TBP et le criblage par double hybride de la levure a permis l'isolement d'un grand nombre de partenaires potentiels dont plusieurs

sont associés soit au stress soit à la maturation des fruits. Les études d'expression révèlent un profil distinctif pour *LeMBF1/ER24* qui suggère un rôle spécifique pour ce gène dans la réponse à l'éthylène, aux stress et au cours de la maturation. Ces gènes peuvent constituer le lieu d'intégration de plusieurs voies de signalisation et permettre un niveau de régulation complexe de l'expression génique en sélectionnant les facteurs de transcription classiques de manière tissu-spécifique.

# **Chapitre 1**

## **Revue bibliographique**



**Figure 1.** Le rôle des hormones au cours du développement de la plante. D'après Fleet and Sun, 2005

# Chapitre 1

## Revue bibliographique

---

### Les hormones végétales

Les hormones végétales ou phytohormones, sont des substances organiques qui jouent un rôle fondamental dans la régulation de la croissance des plantes (Fig. 1). Le terme hormone dérive du grec *hormein*, qui signifie "mettre en mouvement" mais il est clair actuellement que certaines hormones ont des effets inhibiteurs, donc il est préférable de les considérer comme des régulateurs chimiques.

Traditionnellement, cinq classes d'hormones végétales ont retenu l'intérêt des chercheurs: Les auxines, les cytokinines, l'éthylène, l'acide abscissique et les gibbérellines.

On a constaté plus récemment que les plantes disposent également d'autres signaux chimiques intervenant dans le contrôle de leur développement. Ainsi, les brassinolides, molécules apparentées aux stéroïdes animaux stimulent la division et l'élongation des cellules et les mutants d'*Arabidopsis* incapables de synthétiser ces brassinostéroïdes produisent des plantes naines. L'acide salicylique, une autre molécule signal chez les

plantes, intervient dans les réactions de défense contre les agents pathogènes. On sait aujourd'hui que le jasmonate contrôle la germination des graines, la croissance des racines, l'accumulation de protéines de réserve et la synthèse de protéines de défense. La tomate utilise la systémine, un petit peptide, comme signal à longue distance pour activer les défenses chimiques à l'égard des herbivores. Alors que le nombre de substances jouant un rôle hormonal chez les plantes a considérablement augmenté au cours des dernières décennies, il apparaît aujourd'hui que les végétaux disposent d'un répertoire de signaux chimiques internes beaucoup plus riche que ce qui était admis jusqu'alors (Raven, 1992).

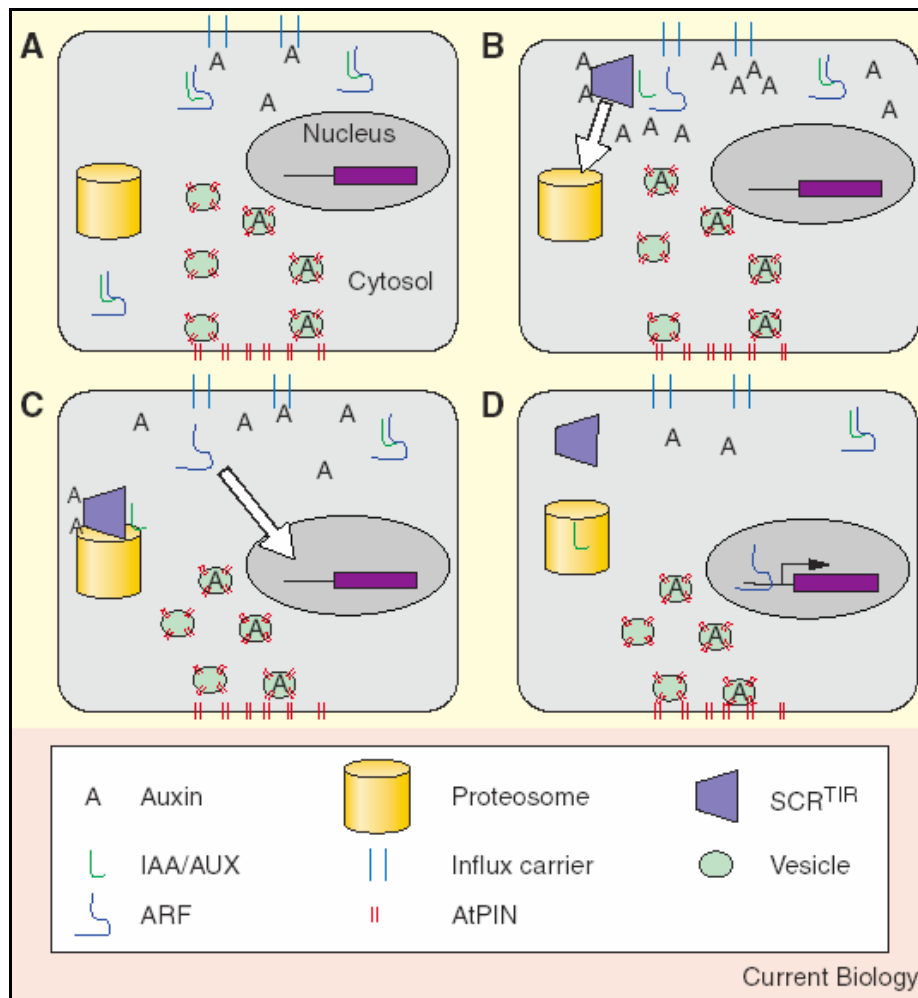


## L'auxine

Au sens strict l'auxine correspond à l'acide indole-3-acétique (AIA). Le terme d'auxine a été ensuite élargi à un ensemble de substances possédant des propriétés physiologiques voisines et une conformation chimique apparentée. La synthèse de l'auxine s'effectue dans les apex des tiges, les zones méristématiques, les jeunes feuilles des bourgeons terminaux et les graines en développement. La migration est primordiale dans le cas de l'auxine: synthétisée dans les apex et les entre-nœuds des tiges et des rameaux, cette hormone doit être distribuée dans tous les tissus, y compris dans les racines où elle s'accumule. L'auxine se déplace préférentiellement dans le phloème selon un mode de transport unidirectionnel dit polaire. Sa conduction polarisée s'effectue plus facilement de l'apex vers la base de l'organe. Ce transport polarisé de l'auxine a des conséquences sur l'organogenèse et intervient dans les phénomènes de tropisme caractéristique des plantes.

Les auxines jouent un rôle important dans le développement des plantes. Au niveau cellulaire, l'hormone est impliquée dans la division, l'élongation et la différenciation alors qu'au niveau des tissus elle est impliquée dans l'élongation des racines et la sénescence. Les auxines sont à l'origine de nombreux autres effets sur la plante dont les principaux concernent la dominance apicale, la réponse tropique, la différenciation des tissus conducteurs, la promotion de l'activité cambiale, l'induction des racines adventives, l'inhibition de l'abscission des feuilles et des fruits, la stimulation de la synthèse d'éthylène, l'inhibition ou la promotion de la floraison (chez l'ananas) et la stimulation du développement des fruits.

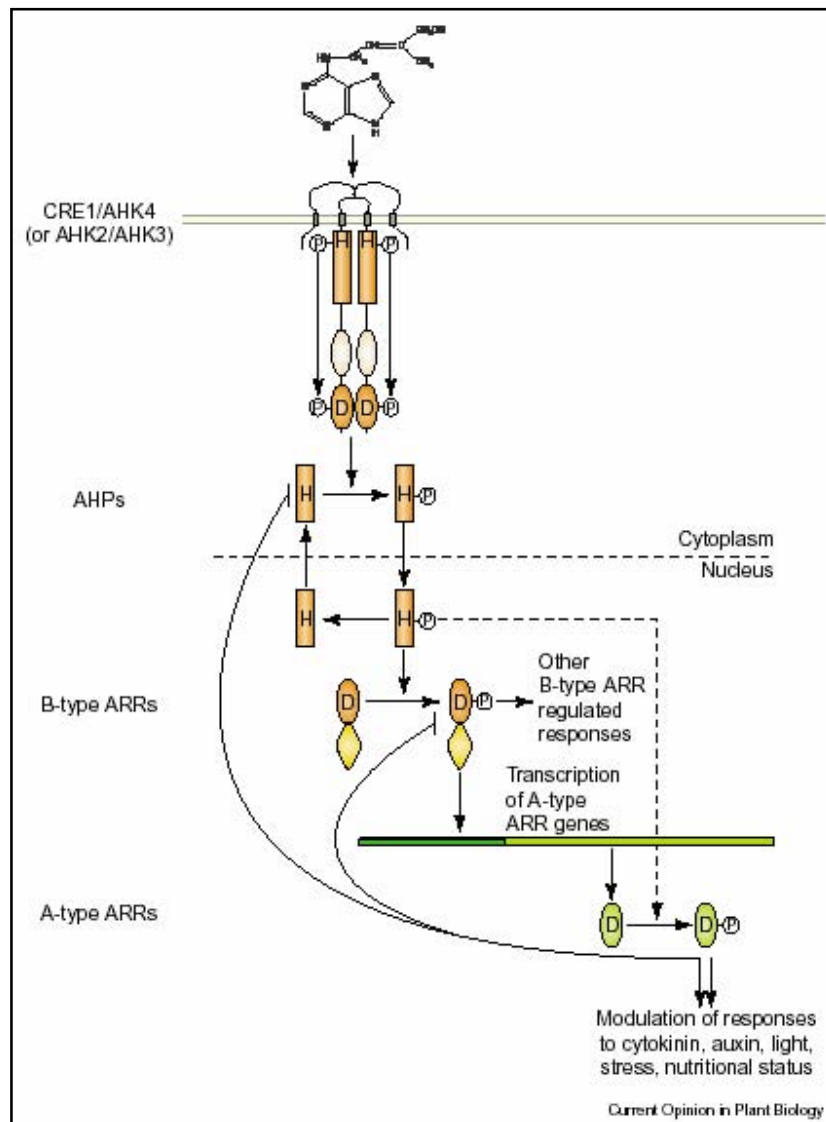
Dans tous ces processus l'auxine agit à travers la modulation de l'expression de gènes cibles. On a identifié chez les gènes de réponse à l'auxine des séquences *cis*-régulatrices appelées "Auxin Response Elements" (AuxRE) qui se caractérisent par la présence d'un motif conservé TGTCTC (Guilfoyle *et al.*, 1998). Les protéines qui se lient à ces domaines régulateurs appartiennent à la famille multigénique de facteurs de transcription de type "Auxin-Response Factor" (ARF). Toutes les protéines ARF ont un domaine N-terminal conservé de liaison à l'ADN et un domaine C-terminal de dimérisation, excepté ARF3 qui contient seulement le domaine de dimérisation.



**Figure 2.** Modèle de l'action de l'auxine. **(A)** L'auxine entre par les canaux de transport (en bleu) qui se trouvent dans la membrane apicale puis elle est transportée par des vésicules vers la membrane basale. Les protéines AtPIN (en rouge), qui sont de possibles transporteurs d'auxine, sont localisées dans la membrane et dans des vésicules endocytotiques. Les facteurs de transcription AUX/IAA (vert) se trouvent unis aux ARF (bleu foncé), empêchant leur activité. **(B)** Un stimulus entraîne une augmentation de la concentration d'auxine. L'excès d'auxine augmente l'affinité de SCR<sup>TIR</sup> (pourpre) pour les AUX/IAA. **(C)** Les AUX/IAA sont marqués pour leur dégradation par le protéosome (jaune). Les ARFs ainsi libérés peuvent s'unir à l'ADN. **(D)** Les ARFs activent l'expression des gènes et les AUX/IAA sont dégradées par le protéosome. D'après Benfey, 2002.

Il a été démontré que les ARF régulent l'activité transcriptionnelle des gènes de réponse précoce à l'auxine (Saur, GH3 et Aux/IAA) en se liant aux éléments *cis*-régulateurs de type AuxRE présents au niveau des promoteurs de ces gènes cibles (Ulmasov *et al.*, 1999).

Une deuxième famille de gènes de réponse à l'auxine code pour les protéines nucléaires de type Aux/IAA qui se caractérisent par une demi-vie courte et une réponse très rapide à l'auxine. Les protéines Aux/IAA présentent 4 domaines conservés caractéristiques de cette famille. Les Aux/IAA sont homologues dans leur partie C-terminale au domaine de dimérisation des ARF mais elles sont dépourvues de domaine de liaison à l'ADN. En effet il a été montré que ces protéines peuvent former des hétérodimères avec les ARFs, ce qui entraîne l'inhibition de ces dernières et confère de ce fait aux Aux/IAA un rôle répresseur de la réponse à l'auxine. Le domaine I des Aux/IAA contient un motif fonctionnel répresseur alors que le domaine II permet l'interaction avec le complexe de dégradation ubiquitine-protéasome qui constitue le mécanisme central de fonctionnement de la signalisation auxinique (Fig.2; Møller and Chua, 1999; Reed, 2001). La découverte récente que TIR1, une protéine de type F-box, est un récepteur fonctionnel de l'auxine qui se lie aux Aux/IAA en présence d'auxine constitue un progrès considérable dans la compréhension du mode d'action de cette hormone (Kepinski and Leyser 2005, Dharmasiri *et al.*, 2005).



**Figure 3.** Modèle de la voie de signalisation des cytokinines. L'union du ligand induit la dimérisation et l'autophosphorylation du récepteur. Le groupe phosphate est transféré par les AHP, lesquelles transportent le signal du cytoplasme aux ARR de type B dans le noyau. Les ARR du type B induisent la transcription des ARR de type A. Les AAR de type A régulent la réponse à la cytokinine par un "feedback" négatif. D'après Heyl and Schmölling 2003.

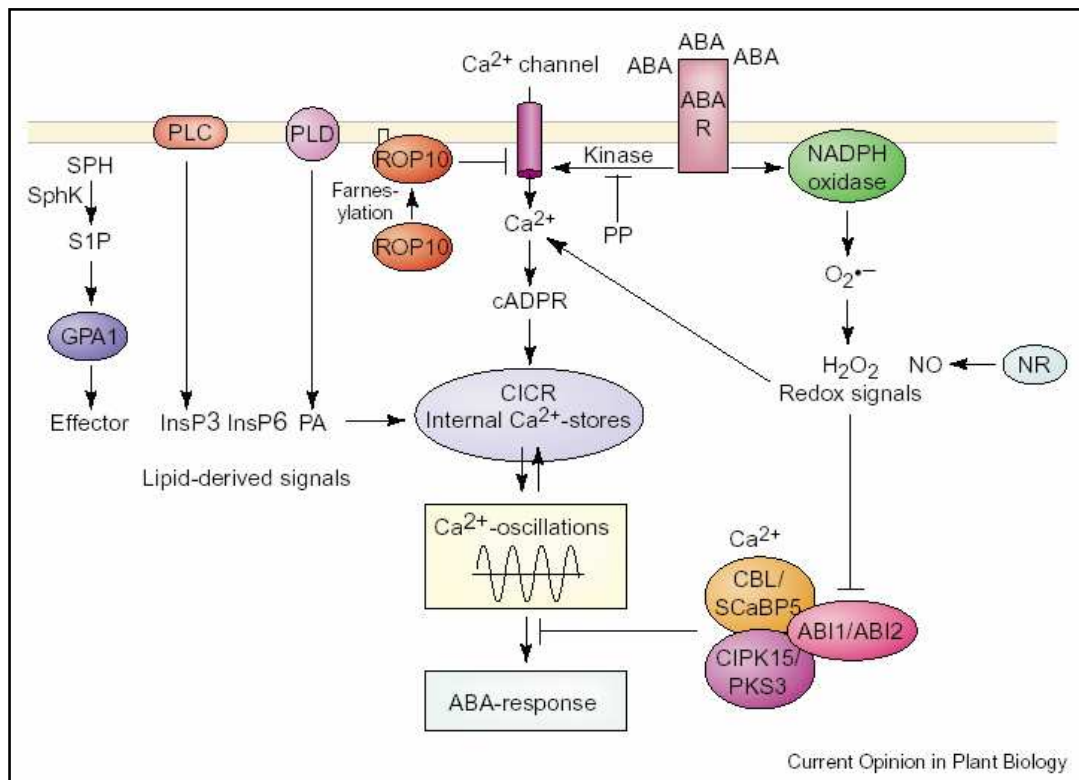
## Les cytokinines

Les cytokinines sont des composés phényl-urée dérivés de la *N*-adénine. La zéatine est la cytokinine la plus commune chez les plantes. Le site de synthèse des cytokinines serait principalement localisé dans la pointe des racines. Les cytokinines sont transportées par le xylème depuis les racines jusqu'aux tiges et feuilles.

Les cytokinines jouent un rôle très important dans différents processus physiologiques et de développement des plantes comme la division cellulaire, la régulation de la croissance des racines et des boutons, la sénescence et la réponse aux stress et aux pathogènes (Mok and Mok, 2001). Les cytokinines sont impliquées dans la division cellulaire, elles retardent la sénescence des feuilles et l'application de cytokinines peut libérer les bourgeons latéraux de la dormance apicale (Raven, 1992).

L'histidine kinase CRE1/AHK4 a été le premier récepteur de cytokinines identifié (Inoue *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2001; Ueguchi *et al.*, 2001). Avec le séquençage du génome d'*Arabidopsis* deux autres récepteurs de cytokinines ont été identifiés, AHK2 et AHK3, qui sont des protéines de transmission du signal connues comme "*Arabidopsis* histidine phosphotransfer proteins" (AHP) et régulateurs de réponse (ARR). La kinase réceptrice se localise dans la membrane avec un domaine extra cellulaire de reconnaissance ou senseur. Ce senseur se dimérise quand le ligand est présent puis s'autophosphoryle en une histidine du domaine cytoplasmique, qui est le domaine transmetteur (Sheen, 2002). Les protéines AHP transmettent le signal du récepteur aux ARR (Fig.3).

Les ARR sont classés en type A et type B. Les gènes du type A sont rapidement induits en présence de cytokinines (D'Agostino *et al.* 2000). L'expression du type B n'est pas influencée par les cytokinines et le type B se trouve en amont du type A dans la voie de signalisation (Fig. 3; Heyl and Schmülling, 2003). Une fois le signal des cytokinines détecté, certains ARR sont localisés spécifiquement et transitoirement dans le noyau, ce qui suggère qu'il s'agit de protéines cytoplasme-noyau fonctionnant comme des navettes ou "shuttles" (Hwang and Sheen, 2001). Il existe dans le génome d'*Arabidopsis* 22 gènes ARR.



**Figure 4.** Voie de signalisation de l'ABA. Dans ce modèle l'ABA est détecté par un récepteur et induit l'activation des canaux de Ca<sup>2+</sup>. Le signal de Ca<sup>2+</sup> active une ADP ribose cyclase, qui catalyse la formation de cADP ribose à partir de NAD. Le cADPR induit une mobilisation du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire et une oscillation de sa concentration. Cette mobilisation est contrôlée aussi par d'autres messagers intracellulaires comme l'inositol 1,4,5-triphosphate (InsP<sub>3</sub>) et le myo-inositol hexakisphosphate (InsP<sub>6</sub>) qui sont produits par l'action des phospholipases C (PLC) et D (PLD). D'après Himmelbach *et al.*, 2003.

## L'acide abscissique

L'acide abscissique (ABA), appartient à la grande famille des isoprénoïdes. Ces molécules ont pour origine commune la polymérisation de deux précurseurs à cinq atomes de carbone : l'isopentényl phosphate (IPP) et son isomère, le diméthylallyl pyrophosphate (DMAPP). Ainsi l'IPP est une molécule centrale du métabolisme. Elle est le précurseur de nombreux composés comme les caroténoïdes, les quinones, les chaînes de chlorophylles, les GA, les stérols ou les cytokinines (Cunningham and Gantt, 1998). L'ABA est synthétisée dans les feuilles adultes, particulièrement en réponse à un stress hydrique. L'ABA est transporté par le phloème depuis les feuilles. Les effets de l'ABA sont divers : fermeture des stomates; induction du transport des produits de la photosynthèse des feuilles vers les graines en développement; induction de la synthèse des protéines de réserve dans les graines; embryogenèse; peut affecter l'induction et maintien de la dormance dans les grains et des bourgeons de certaines espèces (Raven, 1992). L'ABA intervient dans le développement optimal de la plante, est induit par différentes conditions environnementales: sécheresse, concentrations élevées de sels et basses températures. Des plantes soumises à des conditions de sécheresse et de stress osmotique produisent de l'ABA comme un signal endogène de réponse adaptative au stress (Zhu, 2002). Une analyse de l'expression des gènes qui répondent à un stress osmotique montre que ces gènes sont activés par des voies dépendantes et indépendantes de l'ABA (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 1997). L'ABA est détecté par un récepteur inconnu (ABAR) qui transmet le signal aux canaux de  $\text{Ca}^{2+}$  présents dans la membrane plasmique via une protéine kinase associée à la membrane (Fig.4). L'ABA induit aussi un signal redox par l'activation du NADPH oxydase et la nitrate réductase (NR) en produisant respectivement du  $\text{H}_2\text{O}_2$  et du NO. Par exemple, il y a une augmentation de la concentration de  $\text{H}_2\text{O}_2$  et de NO dans les cellules de garde avant la fermeture des stomates induite par ABA. Il est intéressant de noter que ces deux messagers, NO et  $\text{H}_2\text{O}_2$ , sont présents aussi durant les interactions plante-pathogène et quand la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  cytoplasmique augmente. Ceci veut dire qu'il existe une convergence entre les différents signaux au niveau des flux de  $\text{Ca}^{2+}$  (Himmelbach *et al.*, 2003). Les gènes induits par l'ABA sont régulés par des protéines bZIP et des facteurs de transcription de la famille d'APETALA2. Les protéines bZIP interagissent avec les éléments de réponse aux ABA (ABRE) et les APETALA2 dans le promoteur.





## Les gibbérellines

Les gibbérellines (GA) sont des composants diterpénoïdes tétracycliques et forment une grande famille de régulateurs de croissance chez les plantes. Au total, près de 126 gibbérellines différentes ont été identifiées jusqu'à présent chez les plantes supérieures, les bactéries et les champignons. Cette hormone est associée à différents processus de développement des plantes comme la germination, l'élongation des tiges, la floraison, le développement du fruit et la régulation de l'expression génique dans l'aleurone des céréales.

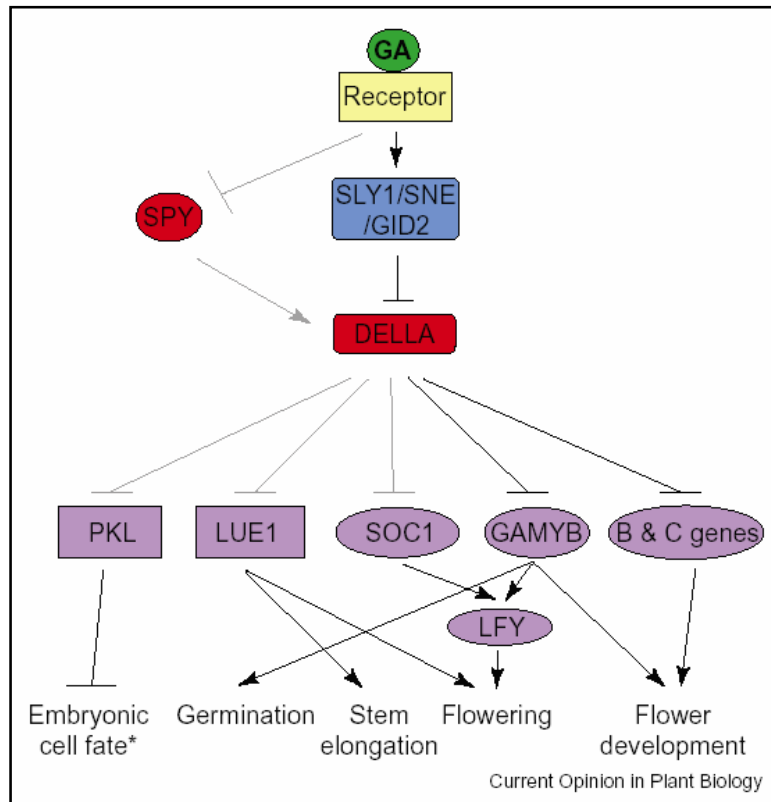
Des études récentes montrent que l'éthylène, les auxines et les brassinolides ont un effet synergique avec le GA sur l'élongation cellulaire et la taille de l'hypocotyle.

Les GA sont synthétisées à partir d'acide mévalonique. Les gibbérellines sont synthétisées dans les tissus jeunes de la tige et les graines en développement.

Il est possible que les gibbérellines soient synthétisées sur le site de leur perception. Des études récentes chez le riz ont montré que les GA synthétisées par les anthères et dans les embryons en développement sont transportées pour contrôler la croissance d'autres organes floraux et des fruits (Kaneko *et al.*, 2003). De façon similaire, les GA produites dans l'embryon pendant la germination doivent être transmises aux cellules de l'aleurone pour induire l'expression des enzymes hydrolytiques (Ogawa *et al.*, 2003). Les GA sont des antagonistes de la fonction de l'ABA dans les graines. Des analyses du transcriptome de la germination d'*Arabidopsis* suggèrent que les GA diminuent l'expression des ABRE et par conséquent, induisent la germination (Ogawa *et al.* 2003). Chez la tomate, les GA induisent la sortie de la radicule à travers la graine et induisent l'expression des expansines et des gènes de modification de la paroi cellulaire (Peng and Harberd, 2002).

La transmission du signal des GA vers le noyau dépend directement de la présence ou de l'absence de protéines appelées DELLA, lesquelles sont considérées comme des "switch" moléculaires de la signalisation des GA.

Les protéines DELLA sont des régulateurs transcriptionnels localisées dans le noyau où elle suppriment la continuation du signal GA et sont rapidement dégradées en présence de ce signal (Dill *et al.*, 2001; Gluber *et al.*, 2002).



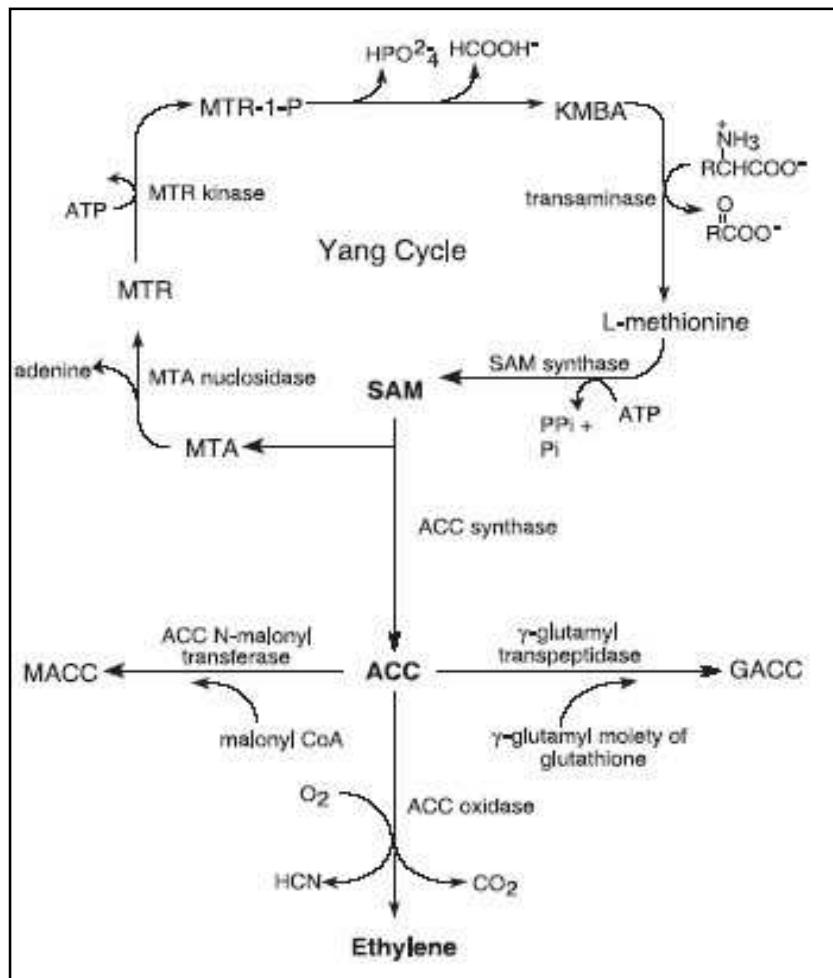
**Figure 5.** Modèle de la voie de signalisation de GA. Les facteurs de transcription sont représentés par des cercles ou des carrés, les flèches et T bars représentent une activation (directe ou indirecte) ou une inhibition. D'après Fleet and Sun, 2005.

Les protéines kinase spécifiques pour les sites de phosphorylation de DELLA n'ont pas encore été identifiées. Les protéines DELLA semblent ne pas avoir des domaines d'interaction avec l'ADN mais il semblerait qu'elles fonctionnent comme des facteurs *trans*-activateurs, ce qui implique qu'il doit sûrement exister d'autres facteurs qui interagissent avec ces protéines et qui contiennent un motif de liaison à l'ADN.

Les protéines GAMYB sont de facteurs de transcription régulés par les GA et ont été définis comme des activateurs de l'expression de la  $\alpha$ -amylase dans les cellules d'avoine mais on a observé que leur fonction ne s'arrête pas là et qu'elles interviennent aussi dans le développement des anthères.

Une interaction directe entre les protéines DELLA et les GAMYB n'a pas été montrée jusqu'à présent. Il est possible que d'autres protéines soient nécessaires pour la transmission du signal de DELLA jusqu'à GAMYB (Fig.5).

La nature des récepteurs primaires de GA reste encore à élucider. Gomi and Matsuoka en 2003, ont émis une hypothèse reposant sur l'existence de deux types de récepteurs de GA dans les cellules; un récepteur plasmique et un récepteur cytoplasmique.



**Figure 6.** Cycle de Yang de production de l'éthylène. SAM: S-adenosyl-L-méthionine, ACC: 1-aminocyclopropane-1-acide carboxylique; KMBA, 2-keto-4-méthylthiobutyrate, MACC: malonyl-ACC, MTA: 5'-méthylthioadenosine, MTR: 5'-méthylthioribose, MTR-1-P: MTR-1 phosphate. D'après Yang and Hoffman 1984.

## L'éthylène

L'éthylène est un gaz synthétisé à partir de la méthionine, il est capable de se déplacer par diffusion à partir de son site de synthèse. La production d'éthylène est induite dans la plupart des tissus durant plusieurs stades du développement, tels que la maturation des fruits, la germination, la sénescence et l'abscission. Il est aussi induit en réponse aux stress comme les blessures, l'anaérobiose, l'infection virale, le traitement par l'auxine, le froid, la sécheresse, et par la présence d'ions comme le  $\text{Cd}^{2+}$  et le  $\text{Li}^+$  (Abeles, 1992; Yang and Hoffman, 1984). La quantité d'éthylène produite dans les tissus végétaux est de l'ordre de  $500 \text{ nL.g}^{-1}.\text{hr}^{-1}$  et l'hormone est biologiquement active à partir de concentrations voisines de 10 à 100 nL/L d'air.

L'effet de l'éthylène le plus décrit est l'induction de la maturation des fruits et en particulier chez les fruits climatériques. D'autres effets incluent la sénescence des feuilles et des fleurs; l'abscission des feuilles et des fruits; l'inhibition de la croissance; l'épinastie; l'accélération de l'activité respiratoire; la nodulation des racines; la modification de la pigmentation des feuilles et des fruits; la germination. L'éthylène intervient également dans l'apoptose, l'attaque par les pathogènes et la triple réponse (Bleecker and Kende, 2000; Johnson and Ecker, 1998). La triple réponse est caractérisée par une réponse à l'éthylène des plantules étiolées incluant une inhibition de l'élongation de l'hypocotyle et de la racine, un grossissement de l'hypocotyle et une courbure exagérée du crochet apical.

La voie de biosynthèse de l'éthylène est bien connue. Elle débute par la transformation de la méthionine, qui réagit avec l'ATP pour produire la S-adenosine-méthionine (SAM) qui est ensuite scindée par l'ACC synthase en deux molécules différentes, dont l'une est le 1-aminocyclopropane-1-acide carboxylique (ACC). Cette réaction est considérée comme la partie limitante de la biosynthèse de l'éthylène (Fig 6). La dernière réaction est l'oxydation de l'ACC en éthylène par l'ACC oxydase, en libérant de l'HCN et du  $\text{CO}_2$  (Bleecker and Kende, 2000).

La synthèse d'éthylène est très efficace à partir de faibles quantités de méthionine. Cette optimisation est possible par le recyclage de la 5'-méthyl-thioadénosine (MTA) en

méthionine. Le squelette de la méthionine provient de l'ATP, le groupe méthylthiol est conservé dans le cycle pour continuer la régénération de la méthionine. Donc avec un pool initial limité de méthylthiol et d'ATP une grande quantité d'éthylène peut être produite (Fig.6; Yang and Hoffman, 1984).

Il a été montré que le cycle de Yang est le seul responsable de la production d'éthylène durant la maturation et que l'éthylène est une molécule régulatrice clé pour la maturation des fruits et la sénescence (Theologis, 1992).

L'ACC synthase (ACS) est codé par une famille multigénique. Il a été montré chez la tomate que la production d'éthylène au cours du développement du fruit met en jeu quatre ACS régulés différemment: LeACS4 est sous le contrôle de l'éthylène et facilite la production autocatalytique d'éthylène en réponse à l'activité de LeACS1 et LeACS2. LeACS6 est responsable de la production d'éthylène durant l'étape de pré-maturation et son expression est inhibée par la production d'éthylène au cours de la maturation du fruit (Barry *et al.*, 2000).

A l'instar des gènes ACS, les gènes ACO sont codés par une famille multigénique dont trois membres au moins existent chez la tomate, chacun d'entre eux ayant un profil d'expression spécifique (Barry *et al.*, 1996 ; Bidonde *et al.*, 1998).

L'étude de plantes transgéniques de tomate altérées pour la voie de biosynthèse de l'éthylène a permis de mieux comprendre le rôle physiologique de l'éthylène dans le développement des plantes. Par exemple, des tomate antisens pour les ACO ou les ACS présentant une forte inhibition de la synthèse de l'éthylène (environ 99%) sont fortement altérées dans le processus de maturation des fruits avec un déficit de coloration rouge, de ramollissement et de production d'arôme (Hamilton *et al.*, 1990, Oeller *et al.*, 1991).

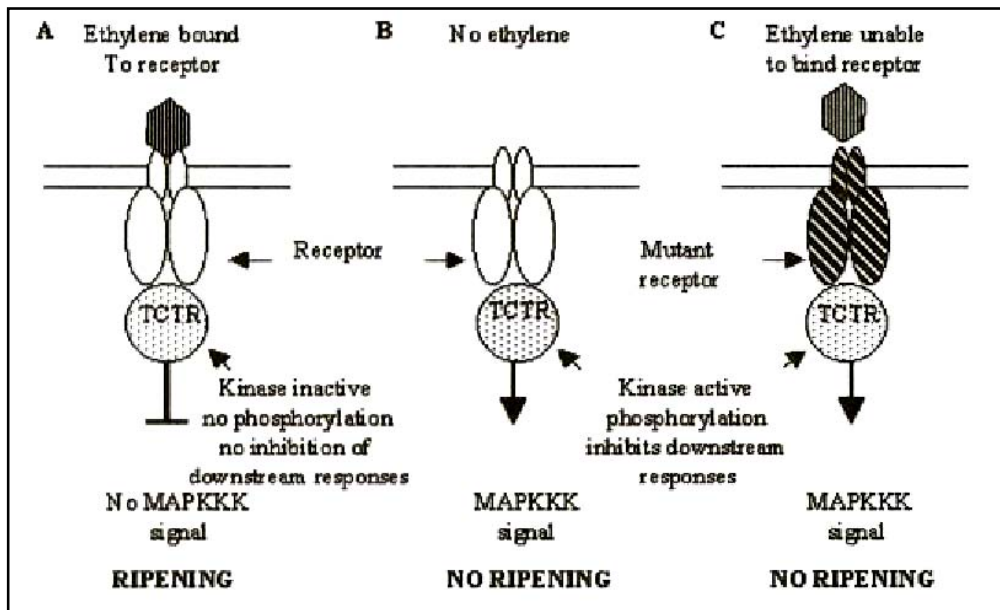
## Perception de l'éthylène et transduction du signal

La voie de transduction du signal éthylène a été décrite comme une voie linéaire qui va des récepteurs, associés au réticulum endoplasmique (Chen *et al.*, 2002), jusqu'à des facteurs de transcription présents dans le noyau (Guo and Ecker, 2004).

Les récepteurs d'éthylène sont semblables aux récepteurs bactériens à deux composantes. Ces récepteurs consistent en une protéine senseur et une protéine indépendante qui est un régulateur de la réponse, les deux fonctionnant ensemble. Tous les récepteurs d'éthylène ont un domaine senseur qui est subdivisé en un domaine transmembranaire et un domaine GAF, un domaine histidine kinase et un domaine de réponse. La fonction du domaine GAF est encore inconnue.

Les récepteurs sont tous des régulateurs négatifs du signal éthylène et leur activité est inhibée par la fixation de la molécule d'éthylène. Plus il y a de récepteurs, plus il faut d'éthylène pour les inactiver et donc moins la plante est sensible à l'éthylène (Cancel and Larsen, 2002).

Chez *Arabidopsis* il existe cinq récepteurs d'éthylène répartis en deux sous-familles. Les protéines de la sous-famille 1 (ETR1 et ERS1) contiennent les cinq domaines fonctionnels caractéristiques des protéines du type histidine-kinase (His-kinase). Les membres de la sous-famille 2 (ETR2, EIN4 et ERS2) ont des séquences divergentes et contiennent seulement un ou deux de ces domaines (Schaller and Bleecker, 1995; Hall *et al.*, 2000). Par des études de mutagenèse il a été montré que, ni le domaine histidine kinase, ni l'activité sérine/thréonine kinase (Ser/Thr kinase) ne sont essentiels pour la perception du signal éthylène et qu'il est possible que ces récepteurs transmettent le signal par un mécanisme autre qu'une activité kinase (Guo and Ecker, 2004). Par contre, le domaine histidine-kinase semble être nécessaire pour une répression efficace de la réponse à l'éthylène (Qu and Schaller, 2004) et tous les récepteurs possèdent une activité Ser/Thr kinase. Chez des mutants qui n'expriment pas de récepteurs, la réponse à l'éthylène devient constitutive, indiquant qu'en absence d'hormone les récepteurs sont sous leur forme active (Hua and Meyerowitz, 1998).



**Figure 7.** Modèle de la transmission du signal éthylène du récepteur à CTR. Les récepteurs d'éthylène et les CTR sont des régulateurs négatifs du signal. ETR1 est fonctionnel en absence d'éthylène et active le répresseur CTR1. Lorsque l'éthylène se lie à ETR1, CTR1 est inactivé. (D'après Alexander and Grierson 2002)

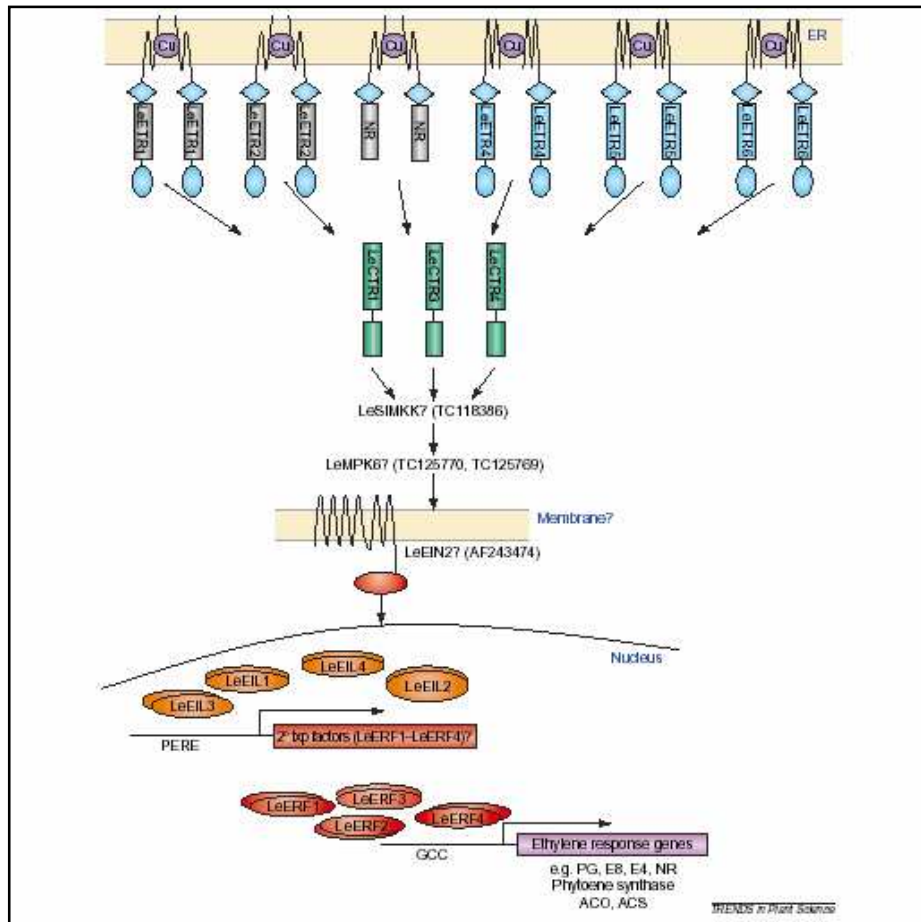


Les récepteurs activent une protéine « Raf-like » appelée Constitutive Triple Réponse 1 (CTR1), avec une activité Ser/Thr kinase qui est aussi, comme pour les récepteurs, un régulateur négatif de la transduction du signal.

Chez la tomate il existe au moins six récepteurs d'éthylène. LeETR1, LeETR2, s'expriment constitutivement durant le développement (Zhou *et al.*, 1996; Lashbrook *et al.*, 1998). Le récepteur NR est régulé positivement durant l'anthèse (Wilkinson *et al.*, 1995; Payton *et al.*, 1996). LeERT4 et NR sont régulés au cours de la maturation, la sénescence et l'abscission et durant une attaque par les pathogènes. LeETR5 est exprimé dans les fruits, les fleurs et aussi durant une attaque par pathogènes (Tieman and Klee, 1999) et LeETR6 (Ciardi and Klee, 2001). Chaque récepteur a un profil d'expression spatio-temporel différent selon le stade de développement ou le stimulus perçu par la plante.

La présence d'éthylène entraîne la phosphorylation de certaines protéines *in vivo*. CTR1 est une protéine kinase homologue aux protéines de la famille Raf kinase (MAP3K) et a été identifiée comme le composant qui intervient immédiatement à la suite du récepteur dans la transduction du signal de l'éthylène (Kieber *et al.*, 1993). Il a été montré chez *Arabidopsis* que les récepteurs ETR1 et ERS1 interagissent avec la partie N-terminale de CTR1 (Clark *et al.*, 1998; Gao *et al.*, 2003). Des mutants de CTR1 incapables d'interagir avec les récepteurs d'éthylène présentent une réponse constitutive à l'éthylène même en l'absence de l'hormone. L'union de l'éthylène avec son récepteur inactive CRT1 qui devient incapable de bloquer la voie de transduction, ce qui permet d'activer la voie de signalisation de l'éthylène (Bleecker *et al.*, 1998; Fig.7).

Les différents éléments de la voie de transduction du signal éthylène ne sont pas tous élucidés mais certains ont été identifiés comme LeCTR1 initialement nommé ER50 (Zegzouti *et al.*, 1999, Leclercq *et al.* 2002) et CTR3 et CTR4 (Adams-Phillips *et al.*, 2004). Alors que LeCTR1, LeCTR3 et LeCTR4 codent pour des protéines toutes capables de compléter les mutants *ctr1* d'*Arabidopsis*, seul le gène LeCTR1 est régulée positivement en réponse à l'éthylène et durant la maturation. Un autre gène LeCTR2 code pour une protéine constitutive présentant 41% d'homologie avec LeCTR1, mais dont la similitude de fonction avec les protéines CTR n'a jamais pu être démontrée (Lin *et al.*, 1998).



**Figure 8.** Perception de l'éthylène chez la tomate. L'éthylène est détecté par une famille de récepteurs (LeETR1, LeETR2, NR, LeETR4, LeETR5 et LeETR6) qui interagissent avec les protéines LeCTR1, LeCTR3, LeCTR4. Suite à l'inhibition des CTR une cascade hypothétique de MAPK (LeSIMMK et LeMPK6) est activée qui aboutit par l'activation de LeEIN2, localisé probablement dans la membrane nucléaire, et les protéines EIN3-“like”. Les protéines EIN induisent l'expression des LeEIL qui probablement activent à leur tour un deuxième groupe de facteurs de transcription (LeERF1-LeERF4) lesquels activent divers gènes de réponse à l'éthylène. D'après Adams-Phillips *et al.*, 2004.

L'éthylène induit l'activité des MAPK et puisque CTR1 a été identifiée comme une MAPKKK-like, il a été proposé que des signalisations positives et négatives puissent être contrôlées par les protéines MAPK dans la voie de signalisation de l'éthylène. Pourtant, des études génétiques exhaustives n'ont pas encore permis de trouver une voie de signalisation de MAPK associée au signal de l'éthylène.

Des études récentes chez *Medicago* ont permis d'identifier des MAPK kinase qui répondent aux stress biotiques et abiotiques. Deux protéines intéressantes, SIMK "SALT-STRESS-INDUCIBLE MAPK" et MMK3 sont activées par une MAPKK (SIMK kinase [SIMKK]) en réponse au stress salin et aux traitements avec un éliciteur de pathogène (Ouaked *et al.*, 2003). Par des traitements avec de l'ACC l'activation de SIMK et MMK3 se fait en quelques minutes via SIMKK. Chez *Arabidopsis* l'éthylène induit l'activation de MPK6, protéine orthologue à SIMK (MAPK group, 2002). Des études biochimiques ont permis de suggérer que SIMKK et SIMK/MPK6 sont des protéines qui interviennent dans la voie de signalisation de l'éthylène en aval de CTR1. Cependant, la connexion biochimique entre CTR1 et SIMKK n'est pas encore établie (Guo and Ecker, 2004).

L'analyse de la signalisation de la triple réponse chez des mutants d'*Arabidopsis* a permis l'identification d'autres protéines, EIN2, EIN3, EIN5 et EIN6, lesquelles sont des régulateurs positifs dans la voie de signalisation de l'éthylène (Fig.8).

EIN2 est une protéine intra-membranaire nécessaire à la signalisation de l'éthylène, avec un domaine N-terminal similaire à une protéine de mammifère, NRAMP, qui est un transporteur d'ions métalliques (Alonso *et al.*, 1999). La surexpression de la partie C-terminale d'EIN2 peut restaurer partiellement la réponse au jasmonate et au paraquat mais pas à l'éthylène, indiquant que cette protéine peut fonctionner dans au moins deux voies de signalisation.

EIN3 et les protéines EIN3-"like" (EIL) sont une famille de facteurs de transcription qui fonctionnent en aval de EIN2 dans la voie de signalisation (Alonso *et al.*, 1999; Fig.8). EIN3, EIL1 et EIL2 se lient de façon spécifique au premier élément de réponse à l'éthylène (PERE) au sein du promoteur du gène ERF1. ERF1 est un gène induit par l'éthylène appartenant à la famille des facteurs de transcription du type « Ethylene Response Factors » (ERF). ERF1 active la transcription d'une variété de gènes de réponse à l'éthylène et aux pathogènes par son interaction avec un *cis*-élément appelé

GCC-box (Ohme-takagi and Shinshi, 1995). ERF1 régule aussi la réponse à d'autres hormones, particulièrement au jasmonate (JA).

Chez la tomate trois gènes EIL ont été isolés et la redondance de leur fonctionnalité a été démontrée. Les trois gènes régulent de multiples réponses à l'éthylène durant le développement de la plante (Tieman *et al.*, 2001). Un quatrième gène EIL est régulé pendant la maturation du fruit. On pense que les protéines LeEIL régulent la transcription des ERF, mais les données expérimentales restent peu abondantes à ce sujet.

Quatre membres de la famille des ERF (LeERF1-LeERF4) ont été isolés au laboratoire et leur niveau d'expression caractérisé durant différents états de développement et en réponse à différents traitements. Seul ERF2 présente une expression différentielle au cours de la maturation du fruit chez la tomate (Tournier *et al.*, 2003).

## L'éthylène et les stress

### Le froid

Un stress par le froid a lieu quand des plantes sensibles sont exposées à des températures inférieures à 12°C. En général, les plantes sensibles sont les plantes tropicales. Quand les plantes retournent à leur température normale de développement on observe une production d'éthylène. Chez la tomate un stress froid au stade "vert mature" augmente la quantité d'éthylène mais elle la diminue si le stress est appliqué au stade fruit mûr (Abeles *et al.*, 1992).

Le stress par le froid peut avoir deux effets sur la production d'éthylène. Le premier est la stimulation de la synthèse de la protéine ACC synthétase et dans le cas d'un stress sévère, il y a une détérioration des membranes et une réduction de l'activité ACC oxydase (Abeles *et al.*, 1992).

### Les hautes températures

Des plantes exposées à des températures élevées peuvent augmenter leur production d'éthylène. Par exemple, l'immersion de plantules de concombre dans un bain marie à 50°C pendant 40 secondes donne comme résultat une augmentation de deux fois la quantité d'éthylène, 6 heures après le traitement (Abeles *et al.*, 1992).

### Les stress mécaniques

La production d'éthylène peut être induite par différents types de stimuli mécaniques tels que la séparation d'organes, la pression ou la friction (Abeles *et al.*, 1992). La blessure des plantes est connue pour stimuler la synthèse du jasmonate (JA), lequel induit l'expression des gènes de réponse à la blessure comme l'inhibiteur de protéases *PI-II*. Chez le tabac un des événements après la blessure est l'activation d'une protéine kinase "wound-inducible protein kinase" (WIPK), une protéine de la famille des MAP

kinase (Seo *et al.* 1999). Des plantes de tabac transformées avec WIPK-antisens n'accumulent pas de JA après une blessure. De même, des plantes qui surexpriment WIPK produisent de trois à quatre fois plus de JA et ont une expression constitutive de *PII*.

En réponse aux blessures les plantes produisent de l'éthylène par induction des facteurs de transcription qui régulent les gènes de la voie de biosynthèse de cette hormone. Il a été proposé que l'éthylène augmente le signal de la systémine, un peptide associé à la réponse à la blessure locale et systémique.

La systémine augmente les niveaux de JA et d'ABA. On assume que les acides gras perdus par la membrane au moment de la blessure sont un "checkpoint" de la biosynthèse du JA.

Peu de temps après la blessure il y a une production locale et systémique d'espèces réactives d'oxygène (ROS), comme l'anion superoxyde et le peroxyde d'oxygène. La production de superoxyde est maximale quelques minutes après la blessure. Pour le peroxyde d'hydrogène le maximum de production est entre 4-6 heures après la blessure.

Il a été suggéré que la séquence blessure-systémine-oligogalacturonides (ces derniers provenant de la paroi cellulaire endommagée)-ROS fait partie d'un même signal (Møller and Chua, 1999).

## Les stress chimiques

La production d'éthylène est induite par des composants organiques comme l'ammoniaque, le bisulfite, le methyl-bromide, l'ozone, le salicylate, le dioxyde de sulfure et l'acide trichloroacétique. Les métaux comme le cadmium, le cuivre, le fer, le lithium, l'argent et le zinc induisent aussi la production d'éthylène (Abeles *et al.*, 1992).

Chez la tomate une production d'éthylène et le développement de nécroses ont été observés sur la tige après un traitement avec un fertilisant à base d'ammoniaque (Abeles *et al.*, 1992). Un déficit en calcium, magnésium ou potassium accompagné par une nécrose stimule la production d'éthylène chez la tomate. Quelques pesticides tels que l'endothal, le paraquat et le glyphosate induisent aussi la production de l'éthylène. Il a été rapporté que le haut niveau d'éthylène présent dans des zones polluées est à

l'origine de la diminution de la résistance à la chaleur et à la sécheresse chez des arbres "holm oak" et il a été suggéré que ce phénomène est associé à une altération de la réponse antioxydative (Munné-Bosch *et al.* 2004).

## La résistance aux pathogènes

Chez *Arabidopsis* l'attaque par les pathogènes déclenche deux voies de signalisation permettant la mise en place de mécanismes de défense (Knoester *et al.*, 1998). Une des voies est médiée par l'acide salicylique (SA) et aboutit à l'activation des protéines *PR1*, *PR2* et *PR5* ce qui confère une résistance à *Peronospora parasitica* et à *Pseudomonas syringae (P.v) maculicola*. Cette voie de signalisation requiert le produit du gène *NPR-1* (non-expression of PR genes) et est bloquée chez des plantes transgéniques NahG, lesquelles expriment une enzyme qui dégrade le SA. L'autre voie de signalisation, indépendante de SA, nécessite l'action concertée du JA et de l'éthylène. Cette signalisation permet l'expression de la protéine *PR3* (une chitinase basique), *PR4* et *PDF1.2* (une défensine) (Lorenzo *et al.*, 2003) et limite la lésion par *Alternaria brassicicola*, *Botrytis cinerea* et *P. parasitica noco2* (Møller and Chua, 1999). Les promoteurs des gènes des protéines PR induites par l'éthylène contiennent un domaine appelé « GCC box » (Eyal *et al.*, 1993). Tel est le cas de la  $\beta$ -1,3-glucanase, de la *PRB-1b* et de l'osmotine. Les protéines ERF interagissent avec cette boîte GCC qui fonctionne comme un élément de réponse à l'éthylène nécessaire et suffisant pour la régulation transcriptionnelle par éthylène chez le tabac (Ohme-Takagi and Shinshi, 1995).

Des études portant sur l'infection de la tomate par *P. syringae* montrent que les lésions primaires présentes dans la plante après une infection sont indépendantes de l'éthylène. Par contre, l'éthylène intervient dans les symptômes postérieurs comme la nécrose et le flétrissement (Lund *et al.*, 1998).

## L'éthylène et la germination

La germination, par définition, commence avec l'entrée de l'eau dans la graine (l'imbibition) et finit avec la sortie de la radicule. Ce processus est régulé par divers facteurs de croissance dont l'éthylène (Bewley and Black, 1994). Il a été démontré que l'application d'éthylène exogène ou de son précurseur immédiat l'ACC (Adams and Yang, 1979) est capable de stimuler la germination dans plusieurs espèces (Kepczynski et Kepczynska, 1997). Il a été prouvé chez l'avoine qu'en présence d'inhibiteurs de la perception d'éthylène la quantité de graines germées diminue par rapport aux graines non traitées. Ce résultat montre la relation directe entre l'éthylène et la germination (Locke *et al.*, 2000). Il a été également rapporté que des graines d'*Arabidopsis* portant une double mutation dans les récepteurs d'éthylène (*etr1-2*), qui ont de ce fait un phénotype d'insensibilité à l'éthylène, présentent une proportion de graines dormantes plus importante que chez des graines sauvages (Beaudoin *et al.*, 2000).

Une relation entre l'ABA et l'éthylène a aussi été démontrée. La mutation du gène *ein2* chez *Arabidopsis* diminue la sensibilité à l'éthylène et augmente la sensibilité à l'ABA. Des graines d'*Arabidopsis* ayant un phénotype d'insensibilité à l'ABA (*abi1*) se sont avérées mutées sur le gène *CTR1* et cette mutation augmente le phénotype d'insensibilité durant la germination (Ghassemian *et al.*, 2000 ; Beaudoin *et al.*, 2000). Ces résultats montrent l'influence de l'éthylène dans la sensibilité des graines à l'ABA. Des expériences chez le riz ont montré que l'éthylène joue un rôle en tant que régulateur négatif de la synthèse d'ABA (Kende *et al.* 1998).

Plus récemment, une étude a mis en exergue la relation entre l'éthylène et d'autres facteurs de croissance durant la dormance des graines d'*Arabidopsis*. Dans cette étude, les auteurs montrent que la mutation *etr1-2* permet une accumulation d'ABA durant le développement de la graine ce qui entraîne des niveaux plus élevés que la normale d'ABA dans la graine sèche (Chiwocha *et al.*, 2005). Ils montrent qu'une voie de signalisation altérée de l'éthylène modifie le métabolisme et le catabolisme de l'IAA, que l'éthylène permet l'accumulation de cytokinines actives dans les graines et, finalement, que la production de GA est probablement régulée par l'éthylène (Chiwocha *et al.*, 2005). Ces résultats montrent d'évidence l'importance de l'éthylène durant le processus de germination et de dormance de la graine.

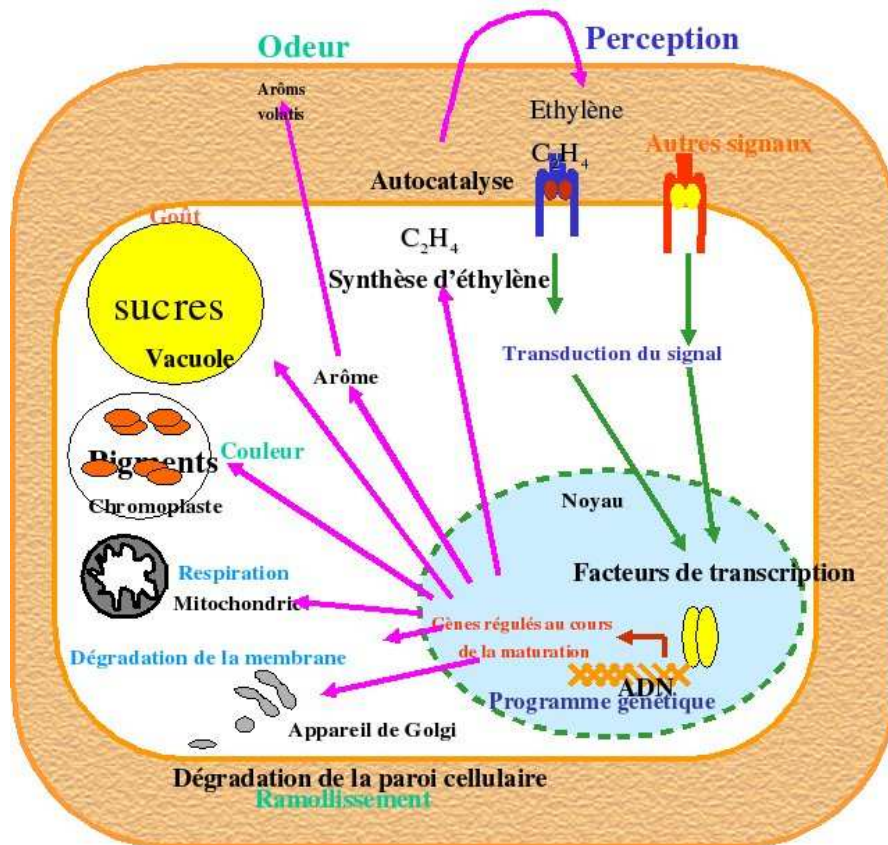


## L'éthylène et la maturation des fruits

La maturation des fruits correspond à un processus génétiquement programmé. C'est au cours de cette phase que s'élaborent en grande partie les qualités organoleptiques et nutritionnelles des fruits. Les fruits ont été divisés en deux groupes selon leur mécanisme de maturation: les fruits climactériques, où la maturation est accompagnée par un pic de respiration et une production d'éthylène importante et les fruits non climactériques, où le niveau d'éthylène est très bas et la respiration n'est pas altérée.

L'éthylène est le déclencheur dominant de la maturation d'un fruit climactérique. De plus, le stade de développement du fruit est déterminant pour sa capacité à mûrir. En effet, des fruits immatures sont incapables de mûrir même en présence d'éthylène exogène.

Deux systèmes de régulation de la biosynthèse de l'éthylène ont été proposés chez les plantes climactériques (Lelièvre *et al.*, 1997). Le système 1 est fonctionnel durant la croissance végétative normale et est contrôlé négativement par l'éthylène. Le système 2 fonctionne durant la maturation des fruits et la sénescence des pétales. Il est contrôlé positivement par l'éthylène et nécessite l'expression des gènes *ACS* et *ACO* (synthèse auto-catalytique). Les mécanismes de régulation conduisant à l'expression de ces gènes sont encore inconnus mais il est possible qu'il existe une combinaison de facteurs, dépendants de l'éthylène et dépendants du développement du fruit (Picton *et al.* 1993), qui interviennent de concert. Chez la tomate, le système 1 est actif tout au long du développement du fruit jusqu'à une phase de transition, correspondant au stade où le fruit acquiert la compétence à mûrir. Au cours des stades ultérieurs qui débouchent sur l'avènement de la compétence à mûrir, le système 2 se met en place (Barry *et al.*, 2000).



**Figure 9.** Modèle récapitulatif des mécanismes généraux de la maturation des fruits.

La tomate est le modèle par excellence adapté à l'étude des fruits dits climactériques. Elle constitue également une cible agronomique importante. Son fruit, habituellement classé parmi les légumes, est le second légume consommé en Europe, après la pomme de terre. L'amélioration de la tomate s'est pendant longtemps adaptée aux besoins des producteurs (variétés productives, aptes à la production en serre hivernale, résistantes aux maladies) ainsi qu'à ceux des distributeurs (fruits fermes, ayant une bonne durée de conservation et d'apparence attractive). Afin de répondre aux souhaits des consommateurs, l'amélioration de la qualité organoleptique du fruit est devenue un nouvel enjeu pour les sélectionneurs. La qualité des fruits est un caractère composite (aspect externe et interne du fruit, saveurs, arômes, texture), fortement influencé par les conditions environnementales en particulier au cours de la maturation. Cette phase de développement du fruit est un phénomène génétiquement programmé correspondant à l'expression de gènes responsables des changements biochimiques, physiologiques et structuraux qui rendent le fruit comestible. Durant le processus de maturation les chloroplastes sont transformés en chromoplastes, la chlorophylle est dégradée, des caroténoïdes s'accumulent et la couleur du fruit change passant du vert au rouge. La texture est aussi modifiée car durant la maturation diverses enzymes sont actives dans la paroi cellulaire. L'arôme d'un fruit mûr est dû à la production de composés volatils spécifiques et son goût résulte d'un équilibre des concentrations d'acides organiques et de sucres présents (Alexander and Grierson, 2002, Fig.9).

## Les gènes associés à la maturation des fruits et leur régulation par l'éthylène

Le développement du fruit nécessite la mise en place de l'expression de nombreux gènes spécifiquement régulés. L'expression d'un gène peut être contrôlée au niveau de la transcription de son ARNm, de sa maturation ou de sa stabilité mais également au niveau de la traduction en protéine ou encore au niveau post-traductionnel. De tous ces niveaux de régulation, c'est la régulation transcriptionnelle qui a été la plus étudiée au cours du développement du fruit. Les promoteurs de quelques gènes ayant une forte induction de leur transcription au cours de la maturation ont été clonés et disséqués pour identifier les éléments *cis*-régulateurs.

Les données accumulées au cours des deux dernières décennies concernant les mécanismes présidant à l'expression des gènes associés à la maturation des fruits font ressortir deux formes de régulation, l'une dépendante de l'éthylène et l'autre indépendante de l'éthylène. La caractérisation de promoteurs de gènes exprimés pendant la maturation commence à fournir des données permettant de mieux comprendre le rôle de l'éthylène et son mode d'intervention. Une séquence identifiée, un motif de 8 pb A(A/T)TTCAAA, est le domaine appelé « ethylene responsive element » (ERE), (Montgomery *et al.*, 1993; Itzhaki *et al.*, 1994).

La recherche de gènes induits au cours de la maturation a conduit au clonage d'un grand nombre de gènes. Parmi eux, E4 et E8 sont régulés par l'éthylène (Lincoln *et al.* 1987), leur expression est stimulée au cours de la maturation des fruits et est absente ou fortement diminuée dans les mutants de la maturation *rin* et *nor*. L'expression de E4, mais non de E8, est stimulée par éthylène dans les feuilles, indiquant que l'expression du gène E8 est tissu-spécifique ou déterminée par le développement (Lincoln and Fischer, 1988). Les différentes analyses du promoteur E8 montrent que les séquences nécessaires pour la régulation par l'éthylène et celles responsables de l'expression spécifique dans le fruit sont différentes (Deikman *et al.*, 1998). Les fonctions des protéines E4 et E8 restent encore inconnues mais les séquences des protéines codées par ces deux gènes montrent une similitude significative avec la méthionine sulphydrylase pour E4 et avec une dioxygénase pour E8 (Montgomery *et al.*, 1993 ; Deikman *et al.*, 1998).

La suppression du gène E8 provoque une augmentation de la production d'éthylène indiquant que E8 pourrait participer à la régulation de la production auto-catalytique d'éthylène (Kneissl and Deikman, 1996). Les analyses du promoteur du gène E4 montrent que la réponse à l'éthylène requiert comme minimum deux *cis*-éléments coopératifs. Une protéine ERF qui interagit avec un de ces *cis*-éléments n'est présente que dans le fruit immature. Ce résultat suggère que cette protéine ERF fonctionne comme un répresseur de la transcription de E4 et que soit son activité soit son expression est probablement inhibée par l'éthylène (Montgomery *et al.*, 1993). Un autre protéine, E4/E8BP, interagit avec les promoteurs de E4 et de E8 (Cordes *et al.*, 1989). L'expression de E4/E8BP est importante dans le fruit et augmente durant la maturation suggérant que cette protéine joue un rôle dans la régulation transcriptionnelle au cours

de ce processus (Coupe and Deikman, 1997). L'analyse du promoteur de la polygalacturonase (PG) a révélé l'existence de régions de réponse à l'éthylène similaires à celles trouvées dans les promoteurs E4 et E8. (Nicholass *et al.*, 1995)

Le gène 2a11, qui demeure lui aussi de fonction inconnue, s'exprime fortement et préférentiellement dans le fruit. L'analyse détaillée de son promoteur a permis de mettre en évidence des régions de régulation négative et positive et des études de délétion du promoteur suggèrent l'existence de quatre régions fruit-spécifiques (Van Haaren and Houck, 1993).

### Stress oxydatif et maturation des fruits

Les processus métaboliques aérobies comme la respiration et la photosynthèse produisent des espèces réactives d'oxygène (ROS) dans la mitochondrie, les chloroplastes et les peroxysomes. Les différents types de ROS sont connus pour leur capacité à endommager l'ADN, les protéines et les lipides. Cette caractéristique cytotoxique explique la complexité des mécanismes enzymatiques et non enzymatiques pour la détoxification des cellules. Néanmoins, il a été montré que les ROS fonctionnent aussi comme des molécules signal dans la régulation du développement et la réponse aux pathogènes.

Trois mécanismes pour la régulation de l'expression des gènes par les ROS sont avancés:

- 1- Les ROS sont identifiés par un senseur qui transmet le signal via une cascade de signalisation
- 2- Les ROS modifient certains composants d'une voie de signalisation
- 3- Les ROS modifient directement certains facteurs de transcription

Lors d'une attaque par les pathogènes, la concentration de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> augmente et ce composé diffuse alors dans les cellules et active des réponses de défense comme par exemple la mort cellulaire programmée. Cette augmentation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est contrôlée indirectement par l'acide salicylique (SA) puisque le SA supprime les enzymes détoxifiantes, catalase et ascorbate peroxydase (Klessig *et al.* 2000). Chez la tomate le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a été décrit comme un messenger secondaire intervenant dans l'expression de gènes de défense.

Une augmentation de la concentration des ROS peut être déclenchée aussi bien par des stress biotiques et que par des stress abiotiques comme la lumière, les hautes et les basses températures et par les stress mécaniques. Mais le rôle des ROS semblerait être différent dans ce cas, où il existe une augmentation des enzymes de détoxification pour diminuer la concentration de ROS dans la cellule (Apel and Hirt, 2004).

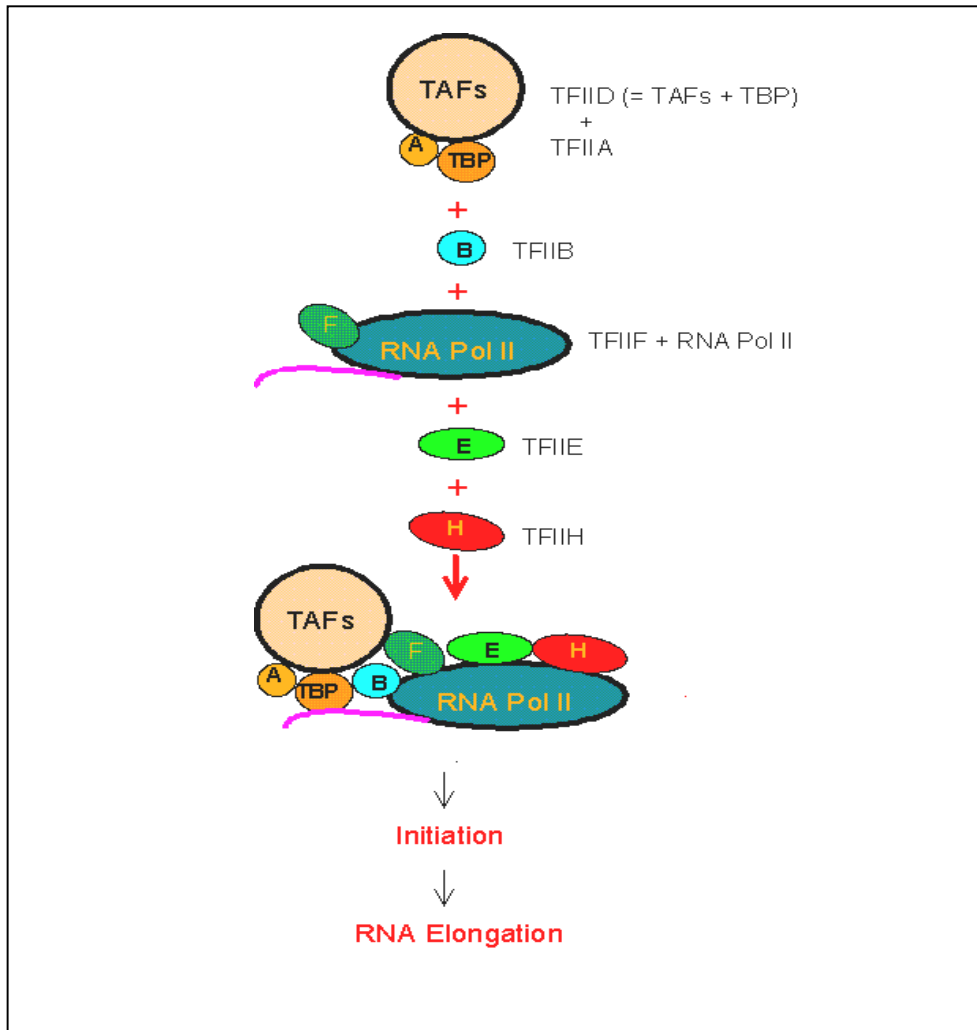
La maturation des fruits a été assimilée à un phénomène de stress oxydatif (Brennan and Frenkel 1977) lequel requiert d'une augmentation des ROS (Hamilton, 1974). Il existe un équilibre entre la production de ROS et le système antioxydatif de la cellule. L'acide ascorbique (ASA) est un des plus forts antioxydants pour l'élimination des ROS (Asada, 1994). Il a été suggéré que la maturation des fruits climatériques est initiée par l'éthylène mais qu'il n'est pas le seul facteur (Picton *et al* 1993). L'éthylène est synthétisé à partir de S-adénosine méthionine par l'ACS et l'ACO. L'ACO est une enzyme qui requiert pour son fonctionnement du  $Fe^{++}$  et de l'acide ascorbique (Ververis and John, 1991). Une régulation de la maturation par les ROS a été de ce fait envisagée. Il a été décrit que la concentration de  $H_2O_2$  augmente significativement chez la tomate au stade tournant (breaker) ainsi que la peroxydation des lipides et l'oxydation des protéines. Ceci a été interprété comme étant le signe d'une augmentation de l'activité oxydative accompagnant cette phase du processus de développement des fruits (Jiménez *et al.* 2002).

## Le complexe transcriptionnel et le contrôle de l'expression génique

La transcription est la copie d'une molécule d'ADN en une molécule d'ARN. L'enzyme responsable de cette transcription est l'ARN polymérase. Les eucaryotes possèdent trois classes différentes d'ARN polymérases, les ARN polymérases I, II et III. Les molécules d'ARN messager sont synthétisées par l'ARN polymérase II. La région à laquelle se fixe l'ARN polymérase, connue aussi comme le promoteur central, comprend le site du début de la transcription et contient la TATA box, située environ 25 pb en amont du site d'initiation de la transcription. Ce promoteur central est incapable, à lui seul, d'assurer une transcription efficace. D'autres éléments proximaux situés entre 100 et 200 pb du site d'initiation sont également impliqués dans la régulation de la transcription. La « CAT box » (boîte CCAAT) fonctionne comme l'une des séquences agissant en *cis*, de même qu'un segment continu riche en GC. La mutation de ces éléments a des conséquences significatives sur le taux de transcription (Griffiths and Anthony, 2001).

Pour que l'ARN polymérase II puisse assurer la transcription avec un rendement maximum, une coopération entre de multiples éléments régulateurs agissant en *cis* et en *trans* est nécessaire. Parmi les éléments connus il y a les facteurs de transcription de type TFII ou facteurs généraux notés: TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF, TFIIH. Ces facteurs forment avec la polymérase un complexe autour du site d'initiation appelé complexe de transcription basique. Tous les promoteurs ont besoin d'un appareil de transcription basique pour être capables de promouvoir la transcription.

Les facteurs TFII sont essentiels pour une transcription basique mais ne peuvent pas, par eux-mêmes, augmenter ni abaisser le taux de transcription. Cette tâche revient aux activateurs et aux répresseurs transcriptionnels. Ces activateurs et ces répresseurs communiquent avec les facteurs TFII par le biais de coactivateurs ou d'adaptateurs. L'assemblage du complexe d'initiation de l'ARN polymérase II commence par la fixation de TFIID à la TATA box. TFIID est composé d'une sous-unité se fixant à la TATA box appelée TATA-box binding protein (TBP) et de plus de huit autres sous-unités appelés TAF (TBP associated factors).



**Figure 10.** Modèle de la formation du complexe de transcription. Les cercles représentent les différentes protéines TFII.



La fixation de la TBP à l'ADN va positionner l'ARN polymérase II et permettre ainsi la formation du complexe de transcription fonctionnel. Il y a des inhibiteurs qui peuvent se fixer au complexe TFIIID-promoteur, bloquant la fixation des autres facteurs élémentaires de la transcription. La fixation de TFIIA au complexe TFIIID-promoteur empêche la fixation d'un inhibiteur. Le TFIIIB se fixe alors au complexe et sa fonction serait de protéger l'ADN en proximité du site d'initiation de l'action des DNases. TFIIIF forme un complexe avec l'ARN polymérase II et il est possible que TFIIIF transporte la polymérase jusqu'au site d'assemblage du complexe d'initiation. Enfin il a été avancé que TFIIIE et TFIIH doivent rejoindre le complexe pour que la transcription soit initiée. Il a été montré par ailleurs que TFIIH possède des activités hélicase, ATPase et kinase (Fig.10).

Les études du complexe de transcription, de sa régulation et de son fonctionnement ont débuté par la caractérisation du premier facteur accessoire eukaryote cloné, le TFIIID, lequel à l'époque était équivalent au polypeptide identifié comme « TATA-binding protéine » (TBP) une protéine de 30 kD (Lemon and Tjian, 2000). Par la suite, il a été montré que la TBP était capable de remplacer la fraction protéique contenant TFIIID pour initier une transcription basale, mais elle n'était pas capable de répondre à d'autres facteurs. La purification du TFIIID a permis de savoir qu'il s'agissait d'un complexe qui contenait la TBP et des facteurs associés à la TBP (TAF). Cette découverte a mis en évidence une nouvelle classe de molécules, appelées co-activateurs ou adaptateurs, nécessaires pour transmettre l'information entre les protéines *trans*-activatrices qui interagissent avec l'ADN au niveau d'un *cis*-élément et le complexe de l'ARN polymérase (Lemon and Tjian, 2000).

Une vaste étude portant sur le complexe TFIIID a révélé que différentes classes d'activateurs peuvent interagir avec différents TAF pour moduler la transcription. En effet, comme il existe plusieurs facteurs de transcription qui interagissent avec l'ADN de manière séquence-spécifique, il existe aussi des co-activateurs transcriptionnels qui sont tissu spécifiques (Goodrich and Tjian. 1994; Burley and Roeder, 1996). Par exemple, quelques sous-unités qui appartient au TFIIID fonctionnent de manière tissu

spécifique, comme c'est le cas de TAF105 chez l'homme qui est fortement exprimé dans les cellules B (Dikstein *et al.*, 1996).

## Les facteurs de transcription

L'un des processus majeur de la régulation de l'expression des gènes en réponse aux besoins spécifiques de chaque cellule est assuré par les facteurs de transcription qui se fixent directement sur l'ADN au niveau du promoteur. Ces facteurs de nature protéique interagissent avec des co-régulateurs pour permettre l'activation ou la répression de la transcription (Brivanlou and Darnell, 2002).

Les facteurs de transcription sont des protéines possédant 2 domaines caractéristiques.

- un site de liaison direct à une séquence spécifique d'ADN
- un domaine d'activation ou de répression qui permet au facteur de transcription d'interagir avec des co-facteurs pour contrôler (activer ou réprimer) l'activation de la machinerie basale.

De façon générale, ces facteurs se fixent au niveau des éléments régulateurs spécifiques du promoteur localisés entre les nucléotides -400 et -100 mais certains d'entre eux peuvent exercer leurs effets sur des distances plus importantes, jusqu'à 30 kb.

Il existe plusieurs catégories de structures protéiques capables de lier l'ADN présentes dans les facteurs de transcription. Les plus fréquentes sont les motifs en doigts de zinc, les homéodomains ou HD et les domaines riches en acides aminés basiques (Mitchell and Tjian, 1989). Les protéines avec des motifs en doigts de zinc permettent d'activer la transcription en se liant à des régions riches en GC. Les protéines contenant des motifs HD reconnaissent généralement des structures ADN riches en bases AT (Fainsod *et al.*, 1986). Enfin, les domaines riches en acides aminés basiques sont capables de former des structures en hélice compatibles pour établir des liaisons avec l'ADN. Certains facteurs de transcription tels que CREB, Jun et Fos sont capables de se lier à l'ADN sous la forme d'un dimère. La présence de domaines "leucine zipper" permet cette dimérisation et les régions basiques adjacentes favorisent l'interaction entre le facteur de transcription et l'ADN (revue dans Mitchell and Tjian, 1989).

Les domaines d'activation des facteurs de transcription sont généralement des parties (une ou plusieurs) de la protéine qui sont enrichies par un type d'acide aminé. Il a été ainsi mis en évidence des domaines d'activation riches en acides aminés acides comme l'acide aspartique, la glutamine ou la proline. Ces régions facilitent généralement des interactions avec des co-facteurs et sont parfois la cible de modifications post-traductionnelles de type phosphorylation ou acétylation qui permettent l'activation du facteur en question ou bien des co-facteurs associés (Brivanlou and Darnell, 2002; Mitchell and Tjian, 1989).

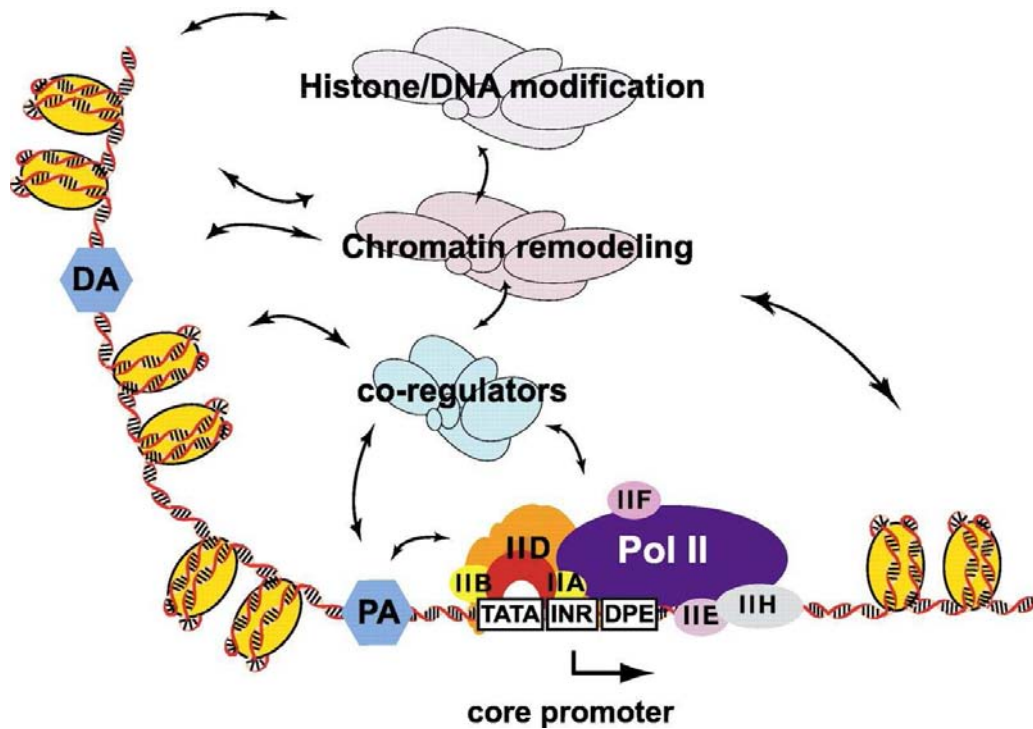
## Les cofacteurs transcriptionnels

La régulation de l'expression d'un gène est un processus qui comprend de multiples étapes et un grand nombre de protéines fonctionnant en complexes discrets. Les facteurs de transcription se lient à l'ADN de manière spécifique et marquent un gène pour être activé ou réprimé par les cofacteurs, qu'ils soient coactivateurs ou corépresseurs. On distingue 5 classes de cofacteurs transcriptionnels.

1- Classe I. Les cofacteurs de la classe I incluent les protéines qui reconnaissent la région promotrice, ils sont intimement associés au complexe de transcription et sont la cible d'activateurs et de répresseurs. Quelques exemples sont les TAFs du complexe TFIID et TFIIA.

2- Classe II. Les cofacteurs de classe II sont des protéines qui unissent les activateurs ou répresseurs de la transcription avec les TAFs. Exemples: OCA-B (OBF-1/Bob-1) et Groucho,

3- Classe III. Les cofacteurs de cette classe sont des complexes multiprotéiques divergents entre eux: quelques-uns interagissent avec l'ARN polymérase II et les autres avec de multiples activateurs. Certains semblent avoir une activité enzymatique ou des propriétés de sélection de chromatine. Par exemple, le cofacteur « mediator ».



**Figure 11.** Le complexe de transcription est responsable du contrôle de l'expression des gènes. Ce complexe est composé de plusieurs sous-complexes qui contrôlent la synthèse des l'ARN messager. La régulation peut se faire par modification covalente des histones, modifications de la chromatine ou par des coactivateurs qui unissent des activateurs localisés sur le promoteur proximal (PA) ou distal (DA) et le complexe de pre-initiation où se trouve la polymérase. La séquence du promoteur dirige la formation du complexe de pre-initiation et définit le site d'initiation de la transcription. Le complexe de pre-initiation comprend les facteurs de transcription basale (TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF et TFIIF), l'ARN polymérase et les cis éléments comme la TATA box (TATA), Initiator (INR) et l'élément en aval du promoteur (DPE ; D'après Hochheimer and Tjian).

4- Classe IV. Dans cette classe se trouvent les cofacteurs qui modifient de façon covalente la structure du nucléosome. On retrouve dans cette classe IV les activateurs ou répresseurs modificateurs de la chromatine avec des activités acétyltransférase ou déacétylase. Ce type de cofacteur permet au complexe de transcription un accès additionnel vers le promoteur et facilite les interactions protéine-protéine. Les membres de cette classe sont représentés par l'histone acétylase CBP/p300 et par les histones déacétylases HDAC-1 et HDAC-2.

5- Classe V. Dans cette classe se trouvent les cofacteurs avec une activité ATPase participant dans les réactions qui perturbent ou réorganisent la structure de la chromatine et permettent l'entrée du complexe de transcription. Comme représentants de cette classe on trouve SWI/SNF et ISWI (Lemon and Tjian, 2000, Fig.11).



## **Chapitre 2**

**Caractérisation fonctionnelle de la famille des MBF1 chez la tomate. Un nouveau type de régulateurs transcriptionnels chez les plantes.**





## Chapitre 2

### **Caractérisation fonctionnelle de la famille des MBF1 chez la tomate. Un nouveau type de régulateurs transcriptionnels chez les plantes.**

---

#### **Le cofacteur de la transcription MBF1**

La protéine “multiprotein bridging factor 1” (MBF1) a été isolée la première fois des glandes du ver à soie de *Bombix mori*. La protéine BmMBF1 est une protéine de 146 résidus d'acides aminés. MBF1 est un cofacteur de la transcription de la classe II.

MBF1 est une protéine très conservée parmi différentes espèces. Cette conservation de séquence suggère la présence d'un mécanisme de régulation transcriptionnel commun aux eucaryotes. MBF1 n'a pas un effet direct sur la transcription (Li *et al.*, 1994) mais il exerce la fonction de pont entre les régulateurs transcriptionnels (contenant un domaine basique / leucine zipper, b-zip) fixés à leur *cis*-élément et la TBP (Takemaru *et al.*, 1997 ; fig. 12). Les protéines MBF1 ont un domaine « hélice-tour-hélice » (HTH), présent chez les facteurs de transcription des bactéries aux d'eucaryotes, il constitue de ce fait un mode de régulation transcriptionnelle conservé au cours de l'évolution (Aravind *et al* 1999).

MBF1 a été identifiée comme une protéine interagissant avec la protéine FTZ-F1 qui est un récepteur nucléaire monomérique qui se lie directement avec l'ADN (Li *et al* 1994).

Des études de délétion sur BmMBF1 et HsMBF1 montrent que la partie centrale de la protéine (résidus 35 à 113) est importante pour l'interaction avec la protéine MBF2, un deuxième cofacteur isolé en même temps que MBF1, ainsi que pour la liaison avec la TBP (Fig.12). Cette partie centrale est remarquablement conservée dans toutes les

MBF1 connues. Une capacité d'interaction résiduelle est toutefois observée dans la partie N-terminale (Takemaru *et al.*, 1997 ; Kabe *et al.*, 1999).

Des études par RMN montrent la présence de quatre hélices amphipatiques très compactes dans la partie centrale de la protéine (résidus 63 à 132). Il est possible que cette partie soit la partie responsable des interactions protéine-protéine.

La partie N terminale (résidus 35 à 62) est moins conservée. Cette région montre une structure plus flexible et il est possible que cette partie joue un rôle dans l'architecture de la protéine (Ozaki *et al.*, 1999).

La substitution du résidu acide aspartique 112 par une alanine chez ScMBF1 (D112A) entraîne une grande réduction de l'affinité de MBF1 envers la TBP *in vitro* (Takemaru *et al.*, 1998). Des études de mutagénèse de MBF1 chez la levure (Takemaru *et al.*, 1998) ont permis de démontrer que la position 112 doit nécessairement être occupée par un résidu acide pour que la protéine soit active.

Des protéines similaires à MBF1 ont été découvertes chez la levure. MBF1 a été initialement décrit comme un cofacteur de GCN4, une protéine avec un domaine b-zip (Takemaru *et al.* 1998). MBF1 n'est pas un facteur de transcription général car des levures déficientes en MBF1 ( $\Delta mbf1$ ) sont viables et capables de se reproduire. Néanmoins, MBF1 est important pour l'activation du gène HIS3 en formant un pont entre GCN4 et la TBP (Takemaru *et al.*, 1998). D'une autre côté il a été montré par double hybride que ScMBF1 interagit avec une protéine 14-3-3 appelée Bmh2 qui participe à divers processus physiologiques comme l'exocytose et le transport vésiculaire, la localisation sub-cellulaire de Msn2/4 (activateur transcriptionnel d'élément de réponse à stress), la dégradation par le protéasome, et la signalisation en réponse à la rapamycine (Mayordomo and Sanz 2002).

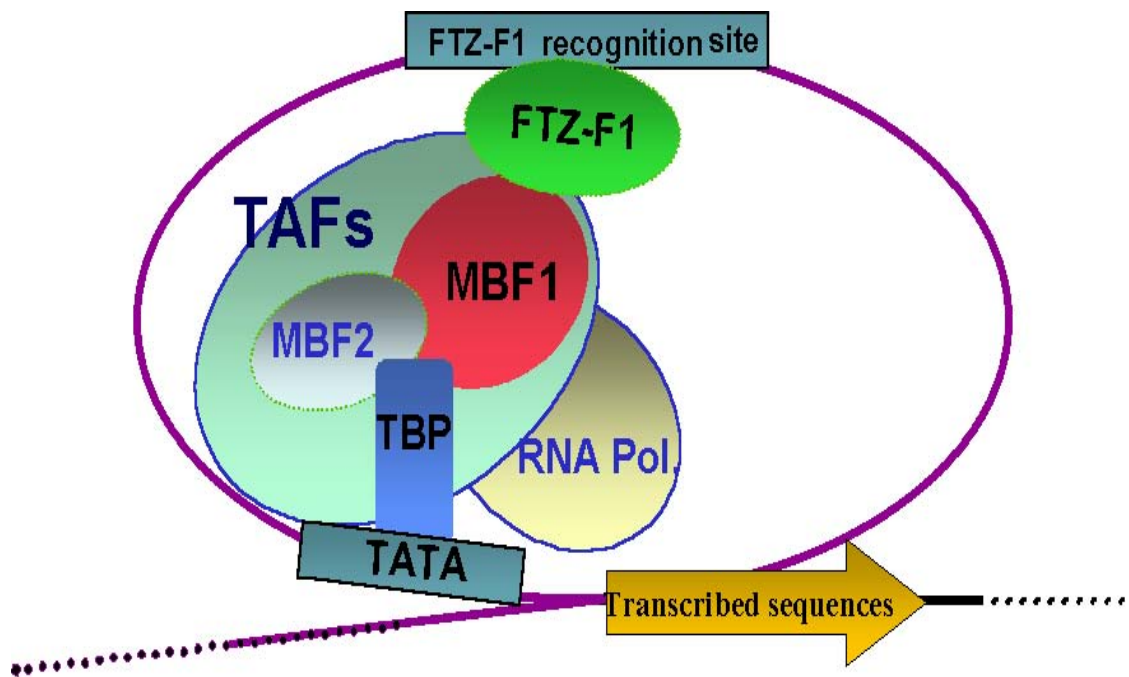
Chez les humains, la première MBF1 décrite a été la protéine EDF-1 (endothelial differentiation factor). Cette HsMBF1 est impliquée dans la répression de la différenciation des cellules endothéliales (Dragoni *et al.*, 1998). La protéine EDF-1 ou HsMBF1 interagit avec la calmoduline (CaM) *in vivo* et *in vitro*. La CaM est la principale protéine réceptrice de  $Ca^{2+}$  dans la cellule. En conditions normales, quand la CaM est privée de  $Ca^{2+}$ , elle se lie à des protéines appelées "CaM-binding proteins". D'autre part, EDF-1 est phosphorylée *in vitro* et *in vivo* par la protéine kinase C (PKC). Il a été montré que l'interaction EDF-1/CaM est modulée par la concentration en  $Ca^{2+}$  et par

l'état de phosphorylation de EDF-1. La molécule 12-O-tétradécanoylphorbol 13-acétate, une drogue utilisée dans le traitement de cancer, stimule la translocation nucléaire d'EDF1. EDF1 interagit avec la TBP dans les cellules endothéliales humaines. Donc, il semblerait que EDF1 a au moins deux fonctions. La première, en interagissant dans le cytosol avec la CaM et, la deuxième, comme cofacteur de la transcription en liaison avec la TBP (Mariotti *et al.* 2000).

HsMBF1 a aussi été décrit pour son interaction avec le récepteur nucléaire Ad4BP/SF-1 (steroidogenic factor-1 / adrenal 4-binding protein) qui est la protéine dont la séquence est homologue à celle de FTZ-F1 mais dont la fonction ne semble pas être la même. Ad4BP/SF-1 régule la production de corticostéroïdes et stéroïdes sexuels. Ce facteur de transcription joue aussi un rôle important dans l'établissement de la fonction reproductive (Kabe *et al.*, 1999). Chez les humains on trouve deux isoformes de HsMBF1 qui ont été appelées hMBF1 $\alpha$  et hMBF1 $\beta$ . hMBF1 $\alpha$  s'exprime dans tous les tissus, contrairement à MBF1 $\beta$  qui s'exprime uniquement dans le pancréas. Toutes deux ont la capacité de se lier à la TBP et stimulent la transcription *in vitro* (Kabe *et al.*, 1999).

HsMBF1 stimule l'interaction des récepteurs nucléaires associés au métabolisme de lipides (LXR  $\alpha$ , PPAR  $\gamma$  et LRH-1). La plupart des protéines partenaires de MBF1 décrites à ce jour ont un domaine b-ZIP. Les protéines LXR $\alpha$  et PPAR $\gamma$  ne contiennent pas ce domaine mais sont toutefois capable de se lier avec MBF1 (Brendel *et al.* 2002). Donc, il ressort que le domaine b-ZIP ne serait pas toujours indispensable pour l'interaction avec MBF1.

Chez le rat, MBF1 est nécessaire pour l'induction de l'hypertrophie cardiaque induite par la phényléphrine (PE). MmMBF1 intensifie l'expression d'un gène marqueur de l'hypertrophie et fonctionne comme un coactivateur transcriptionnel de C-Jun (Busk *et al.*, 2003). Additionnellement, une protéine appelée CAP-19, localisée dans les neurones et qui interagit avec la CaM, semble avoir une homologie avec MBF1 (Smith *et al.*, 1998).



**Figure 12.** Schéma de la position des MBF1 dans les complexes de transcription. MBF1, une protéine du complexe TAF, forme un pont entre la TBP et une autre protéine liée à l'ADN (représentée par FTZ-F1).

Chez la *Drosophile*, il a été démontré durant le développement du système nerveux central que DmMBF1 forme un pont entre un facteur de transcription appelé Tracheae Defective Factor (TDF), qui contient un domaine b-zip, et la TBP (Liu *et al.* 2003). La déficience de cette protéine TDF est létale chez les embryons mais en absence de MBF1 sa transcription est réduite mais n'est pas abolie (Liu *et al.* 2003).

Toujours chez la *Drosophile*, il a été montré que MBF1 a une interaction directe avec le facteur de transcription D-Jun. Apparemment MBF1 protège les cysteines de D-Jun de l'oxydation et stimule l'union de la protéine « activator protein 1 » (AP-1) à l'ADN (Jindra *et al.*, 2004). AP-1 est un complexe formé par Jun et Fos et ces deux protéines ont un domaine bZIP. L'expression de AP-1 est induit par divers types de signaux comme des facteurs de croissance, des hormones et des neurotransmetteurs, des infections microbiennes et des stress physiques et chimiques. En réponse à AP-1 une série de processus cellulaires sont initiés, comme l'apoptose, la différenciation et la mobilisation de défenses contre un stress (Shaulian and Karin, 2002). Les protéines Jun et Fos non seulement activent les défenses cellulaires contre les variations de l'état redox mais, en plus, leur activité dépend de leur état redox. En effet, AP-1 est sensible à l'oxydation mais son union à MBF1 la protège contre cette modification (Jindra *et al.*, 2004). Ainsi, des *Drosophiles* déficientes en MBF1 sont plus sensibles aux stress oxydatifs. Ce résultat montre l'importance de MBF1 dans ce genre de stress (Jindra *et al.*, 2004).

MBF1 est une protéine localisée dans le cytoplasme. Des études de co-immunoprecipitation de MBF1 et D-Jun suggèrent que MBF1 migre vers le noyau avec D-Jun (Jindra *et al.* 2004) ou avec Ad4BP/SF-1 chez l'humain (Kabe *et al.*, 1999).

## **MBF1 chez les plantes**

ER24 est le premier gène codant pour une protéine MBF1 des plantes initialement isolé comme un gène de réponse à l'éthylène chez la tomate (Zegzouti *et al.*, 1999).

Par la suite, il a été montré que *StMBF1* est positivement régulée chez la pomme de terre durant l'attaque par *Fusarium solanif. sp. eumartii*. L'accumulation du messenger

est également stimulée par la blessure, par un traitement avec un éliciteur de champignon, par l'acide salicylique et par l'ethephon, un composé générateur d'éthylène (Godoy *et al.*, 2001). Il est raisonnable de penser que l'éthylène et/ou l'acide salicylique sont responsables de l'activation de StMBF1 au cours de la réponse à l'attaque par le champignon. StMBF1 est phosphorylée dans sa partie centrale (résidus 71-117) ce qui constitue un mécanisme de régulation positive en réponse à des éliciteurs fongiques. Des études plus récentes suggèrent qu'une sérine/ thréonine kinase dépendante du calcium est responsable de la phosphorylation de la protéine StMBF1 (Zanetti *et al.*, 2003).

La protéine virale MP, (movement protein) du virus de la mosaïque de la tomate (ToMV), interagit avec les MBF1 de tabac et d'*Arabidopsis*. La protéine MP s'unit à l'ADN viral et interagit avec une variété de protéines de l'hôte en modulant l'expression de différents gènes de la plante. L'interaction entre MBF1 et MP ouvre l'hypothèse que l'union de ces deux protéines participerait à la suppression des mécanismes de défense de la plante (Matsushita *et al.*, 2002).

Des études menées avec la plante modèle *Arabidopsis* indiquent qu'il existe trois protéines de la famille MBF1 chez cette plante (Tsuda *et al.*, 2004). Selon cette étude, les MBF1 de plantes se divisent en deux groupes. Le groupe I comprend *AtMBF1a*, *AtMBF1b* et *StMBF1* alors que le groupe II comprend *AtMBF1c* et *LeER24*. Les gènes *AtMBF1a* et *AtMBF1b* sont constitués de quatre exons et trois introns alors que *AtMBF1c* est dépourvu d'introns (Tsuda *et al.* 2004).

L'expression de chacun des gènes d'*Arabidopsis* a été étudiée en utilisant des fusions promoteur-GUS ( $\beta$ -Glucuronidase). Pour *AtMBF1a*::GUS une légère coloration a été observée dans les tissus végétatifs durant le développement, les anthères et dans quelques graines. Pour *AtMBF1b*::GUS une forte coloration a été détectée dans le système vasculaire, les feuilles, les pétioles, la tige, les anthères et quelques graines. Aucune coloration associée à *AtMBF1c*::GUS n'a été détectée dans les premiers stades du développement mais, chez les plantes adultes, l'expression a été observée dans les feuilles, la tige, la fleur, les anthères et les siliques mais pas dans les graines. Le fait que les trois *AtMBF1* se trouvent dans les anthères peut suggérer une participation de ces protéines à la formation du pollen (Tsuda and Yamazaki, 2004). Une protéine

homologue à LeER24 a été identifiée chez *Retama raetam*, une plante C3 commune dans les écosystèmes arides qui entourent la Méditerranée. Cette plante utilise comme stratégie d'acclimatation une dormance partielle pour résister aux longues périodes de sécheresse (Mittler *et al.* 2002). Le gène *RrER24* est induit dans la journée durant les périodes de température élevée tandis que le niveau du messager diminue durant la nuit lorsque la température baisse. L'induction du messager se produit aussi après un choc thermique consistant en un traitement à 45°C pendant 5 h. Ces résultats suggèrent l'implication de ce gène dans la réponse aux stress environnementaux et en particulier les chocs thermiques (Pnueli *et al.*, 2002). Chez le tabac on observe une induction de l'homologue du gène *ER24* après un traitement de stress hydrique, de chaleur ou la combinaison de deux (Rizhsky *et al.*, 2002). Une analyse du transcriptome par microarrays chez *Arabidopsis* a mis en évidence une augmentation du messager du gène homologue à LeER24, par une combinaison de stress sécheresse et de choc thermique (Rizhsky *et al.*, 2004).

L'expression de *AtMBF1a* et *AtMBF1b* présente un profil constitutif et ne montre pas de variation significative au cours de différents traitements (Tsuda et Yamazaki, 2004). *AtMBF1c* présente une accumulation de messager après un traitement ABA (Tsuda *et al.*, 2004), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Tsuda et Yamazaki, 2004), sécheresse, chaleur et sécheresse-chaleur associées (Rizhsky *et al.*, 2004). Le froid n'a apparemment pas d'effet sur l'expression de *AtMBF1c* (Tsuda and Yamazaki, 2004). Tous les résultats antérieurs suggèrent fortement une participation des MBF1 dans la réponse aux stress.

Récemment, il a été montré chez *Arabidopsis* que la sur-expression de *AtMBF1c* confère aux plantes transgéniques une tolérance au stress thermique et au stress osmotique (Suzuki *et al.*, 2005). Les auteurs ont pu montrer par des analyses microarrays que la sur-expression de *AtMBF1c* favorise l'accumulation des gènes de réponse au stress tels que les gènes PR (Pathogenesis-Related) lors de stress thermiques et osmotiques (Suzuki *et al.*, 2005).





***Article 1***

---

**Functional characterisation of LeMBF1/ER24 a distinct member of the tomato MBF1-like gene family of transcriptional co-activator.**



## Functional characterisation of LeMBF1/ER24 a distinct member of the tomato MBF1-like gene family of transcriptional co-activator.

Jaimes-Miranda F<sup>1</sup>, Sanchez-Ballesta MT<sup>1</sup>, Tournier B, Zegzouti H, Mila I, Latche A, Pech JC, Regad F, and Bouzayen M.

<sup>1</sup>:These authors contributed equally to this work.

### Abstract.

Transcriptional regulators from the Multiprotein Bridging Factor 1 (MBF1) type are key components of the machinery controlling gene expression. Following previous isolation of *LeMBF1/ER24*, the first plant MBF1-like transcriptional co-activator, we report here on the isolation of three new members of the MBF1 gene family in the tomato and describe the functional characterisation of all four members (*LeMBF1a*, *LeMBF1b*, *LeMBF1c* and *LeMBF1/ER24*) of the small tomato MBF1 multigene family. Using yeast complementation assay, we show that all four tomato MBF1 proteins are capable to rescue the *MBF1*-disruptant *S. cerevisiae* strain ( $\Delta mbf1$ ) demonstrating a functional conservation of these genes among eukaryotes from yeast to higher plants. Likewise, all four *LeMBF1* proteins are able to specifically bind the tomato LeTBP protein *in vivo*. Phylogenetic analysis shows that *LeMBF1/ER24* lies in a separate clade, being more divergent from yeast and animal MBF1 genes than other *LeMBF1*. This distinctive gene structural feature is consistent with a distinct pattern of expression for *LeMBF1/ER24* compared to other *MBF1-like* genes, further suggesting a specific role for the ER24-type gene in ethylene and abiotic stress responses and in fruit ripening. Using a yeast-two-hybrid screening procedure, a number of MBF1-interacting proteins were isolated in the tomato among which abiotic stress and ripening-associated proteins. Transgenic *Arabidopsis* lines expressing the *LeMBF1/ER24* gene exhibited enhanced tolerance to heat-shock. Because *LeMBF1/ER24* is the first plant TAF component to show hormone-dependent and tissue specific regulation, its putative role in conveying hormone signalling to specific developmental responses is discussed.

## Introduction.

It is now well established that regulation of eukaryotic gene activity at the transcriptional level involves multiprotein complexes and requires the concerted action of transcription factors and co-activator proteins. Transcription factors bind to DNA in a sequence-specific manner and essentially mark a gene for activation or repression through the recruitment of co-activator or corepressor proteins (Spiegelman and Heinrich, 2004). Co-activators are proteins that connect a trans-acting factor with a component of the basal transcription machinery allowing transcriptional activation to proceed (Roeder, 1991, Li *et al.*, 1994). Multiprotein bridging factor 1 (MBF1) genes were first identified as a co-activator in the silkworm *Bombix mori* (Li *et al.*, 1994) and shown to contribute with other proteins to the building of TAF complexes (TBP associated factors) that are essential for transcription initiation. MBF1 proteins recruit the basal transcription machinery to specific transcription factors bound to their target promoters (Naar *et al.*, 2001). It is now quite clear that transcriptional regulation at the level of co-activators is a substantial part of the mechanisms underlying the control of gene expression and that co-activators allow functional integration of multiple transcription factors (Spiegelman *et al.*, 2004).

The MBF1-like gene, named ER24, was first cloned on the basis of its ethylene responsiveness in tomato fruit and shown to be induced during fruit ripening (Zegzouti *et al.*, 1999). Subsequently, a potato MBF1-like gene, *StMBF1*, was shown to be up-regulated during attack by *Fusarium solani*, wounding and in response to ethylene and SA treatments (Godoy *et al.*, 2001). *StMBF1* was shown to be capable to interact with the Homeodomain-Zip protein Hahb-4 *in vitro* (Zanetti *et al.*, 2004) and to undergo phosphorylation in potato cell suspensions challenged with *Phytophthora infestans* elicitors (Zanetti *et al.*, 2003). A tobacco MBF1 was also identified as a partner of the mosaic virus movement protein (Matsushita *et al.*, 2002) and more recently, three MBF1s up-regulated by stress were identified in *Arabidopsis thaliana*, all three were able to bridge GCN4 and TBP *in vitro* and to functionally complement a MBF1 yeast mutant (Tsuda *et al.*, 2004). Moreover, it was reported that an *ER24-like* gene was up-regulated by heat-shock treatment in *Retama raetam* (Pnueli *et al.*, 2002) and by drought and heat-shock in tobacco and *Arabidopsis* (Rizhsky *et al.*, 2002, 2004). Direct evidence of the involvement of MBF1 in plant responses to environmental stresses was

obtained by enhancing tolerance to heat and osmotic stresses in transgenic *Arabidopsis* lines expressing the *MBF1c* gene (Suzuki et al 2005). Taken together, the data reported so far not only indicate that *MBF1-like* genes are associated with a variety of normal and abnormal developmental processes in plants but they are also primary targets of physiological signals.

In order to get better insight on the role of transcriptional co-activators, we describe in this paper the isolation and characterization of three new members of the *MBF1* gene family in the tomato. The newly isolated tomato *MBF1-like* genes as well as *LeER24*, encode functional transcriptional co-activators as demonstrated by their capacity to complement the *MBF1*-disruptant *S. cerevisiae* strain ( $\Delta mbf1$ ). All four tomato *MBF1* were able to specifically bind *LeTBP* *in vivo* and yeast two-hybrid screening allowed the isolation of a number of interacting proteins among which some are associated with stress responses and fruit ripening. Moreover, expression studies revealed a distinct pattern of expression for *ER24* compared to other *MBF1-like* genes, suggesting a role for *ER24* in ethylene and abiotic stress responses and in fruit ripening.

*Table 1. Amino acid comparison between the predicted full length LeMBF1a, LeMBF1b, LeMBF1c and LeMBF1ER24 proteines*

		LeMBF1a	LeMBF1b	LeMBF1c	LeMBF1/ER24
LeMBF1a	Identity	100%	92.8%	92.1%	43.5%
	Similarity	100%	98.6%	96.4%	62.6%
LeMBF1b	Identity	-	100%	94.3%	44.2%
	Similarity	-	100%	98.6%	61.9%
LeMBF1c	Identity	-	-	100%	44.2%
	Similarity	-	-	100%	62.6%
LeMBF1/ER24	Identity	-	-	-	100%
	Similarity	-	-	-	100%

## Results.

### ***Tomato MBF1 are encoded by a small multigene family***

Using a PCR-based method three new MBF1-like cDNA clones were isolated in the tomato and named *LeMBF1a*, *LeMBF1b* and *LeMBF1c* while the initial *ER24* was renamed *LeMBF1/ER24*. The tomato EST database confirmed the existence of four distinct contigs corresponding to the four tomato MBF1-like clones. Isolation of full-length cDNA clones indicated that *LeMBF1/ER24*, *LeMBF1a*, *LeMBF1b* and *LeMBF1c* encode putative proteins of 16.1 kDa, 15.3 kDa, 15.3 kDa and 15.4 kDa, respectively. Sequence alignment revealed a strong conservation between *LeMBF1a*, *LeMBF1b* and *LeMBF1c* deduced proteins which display 92.1 to 94.3% homology and 96.4 to 98.6% similarity (Table 1). *LeMBF1/ER24* is significantly divergent and displays 43.5 to 44.2% homology and 61.9 to 62.6% similarity with the three other tomato MBF1 at the protein level (Table1).

Figure 1a indicates that MBF1 proteins present some conserved domains throughout eukaryotes. A number of amino acid residues (D3, W4, A29, R31, G33, K58, I79, R83, L93, A94, I97, E99, E108, P114, N115, E123, G127, K129, L130, R131 et G132) or peptide motifs (D3-W4, L93-A94, P114-N115, K129-L130-R131-G132) are perfectly conserved from yeast to animals throughout plants suggesting an essential role for these residues in the protein function. The central region (35-113aa) which has been reported to be involved in the interaction with the TBP protein (Takemaru et al 1997; Kabe et al 1999), displays strong conservation among *LeMBF1a*, *b* and *c* while it shows significant divergence with *LeMBF1/ER24*. However, among the two residues, D106 and E108, reported to be important for interaction with TBP (Ozaki 1999) D106 is substituted by E106 in all plant MBF1 proteins (Fig. 1a). In the C-terminal part, the four residues K129, L130, R131, K133, previously identified as important for folding maintenance (Ozaki et al 1999) are perfectly conserved in the four *LeMBF1s* (Fig. 1a). Among plant MBF1 proteins, a number of amino acid residues are highly conserved within the N-terminal region, known to harbour the protein/protein interaction domain essential for binding to other partners than TBP and TAF components, (Fig. 1a).

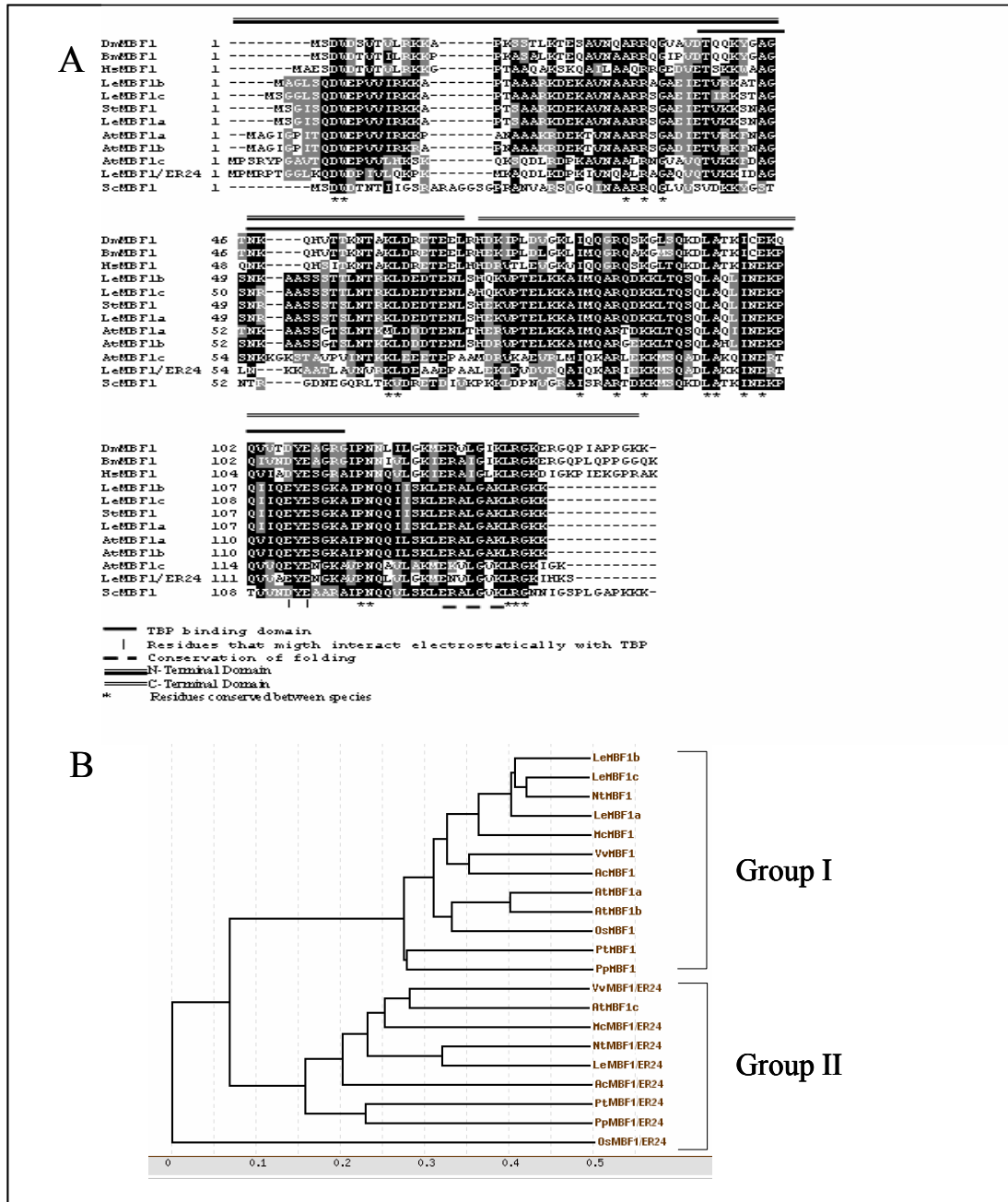


Figure 1 Amino acid sequence alignment of MBF1 of different species and Phylogenetic tree of plant MBF1. A: Deduced amino acid sequences of MBF1 were aligned using the ClustalX program DmMBF1 (*Drosophila melanogaster*, AB031273), BmMBF1 (*Bombyx mori*, AB001078), HsMBF1 $\alpha$  (*Homo sapiens*, AB002282), StMBF1 (*Solanum tuberosum*, AF232062), AtMBF1a (*Arabidopsis thaliana*, AF370280), AtMBF1b (*Arabidopsis thaliana*, AF326909), AtMBF1c (*Arabidopsis thaliana*, NM\_113358), LeMBF1/ER24 (*Lycopersicon esculentum*, AF096246), ScMBF1 (*Saccharomyces cerevisiae*, AB017593); B: Phylogenetic relationships between plant MBF1. The Tigr, GenBank and plant genome database accession numbers of each sequence of the MBF1 are: Group I: *Nicotiana tabacum* NtMBF1 (NP916802), *Mesembryanthemum crystallinum* McMBF1 (CA839385), *Vitis vinifera* VvMBF1 (CF211374), *Allium cepa* AcMBF1 (CF442396) *Arabidopsis thaliana* AtMBF1a (AF370280), *Arabidopsis thaliana* AtMBF1b (AF326909), *Oryza sativa* OsMBF1 (BAD03357.1), *Pinus taeda* Pt (CO361703), *Physcomitrella patens* PpMBF1 (BJ183149) *Pinus taeda* Pt (CO361703) Group II : *Vitis vinifera* VvER24 (TC45815), *Arabidopsis thaliana* AtMBF1c (NM\_113358), *Mesembryanthemum crystallinum* McER24 (TC5071), *Nicotiana tabacum* NtER24 (BP531744), *Lycopersicon esculentum* LeER24 (AF096246), *Allium cepa* AcER24 (CF447201), *Pinus taeda* PtER24 (CO368351), *Physcomitrella patens* PpER24 (TUC04-08-18.7707), *Oryza sativa* OsER24 (BAD32863).



The phylogenetic tree, constructed with full length clones from eukaryotic organisms available in the database, shows that plant MBF1 proteins segregate in two distinct groups. LeMBF1a, b and c lie in the same clade while LeMBF1/ER24 lies in a different group confirming that in various plant species the ER24 type has distinct sequence features that diverge from that of other MBF1 proteins (Fig. 1b).

### **Structure analysis of tomato MBF1 genomic clones**

The *LeMBF1a*, *LeMBF1b*, *LeMBF1c* and *LeMBF1/ER24* genomic clones have been obtained by PCR amplification using tomato genomic DNA as template. Comparison of genomic and cDNA sequences allowed the delineation of intron and exon positions. Search in the database revealed that Arabidopsis genome contains a total of three MBF1-like genes compared to the four genes found in the tomato. *LeMBF1/ER24* and its putative Arabidopsis ortholog are highly divergent from the remaining members of the family, have similar size, and no intron in their genomic structure (Fig. 2). Likewise, *LeMBF1a*, *LeMBF1b* and *LeMBF1c* share common gene organization feature with 4 exons and 3 introns. This structure is similar to that of *AtMBF1a* and *AtMBF1b* though the size of the introns in Arabidopsis is significantly reduced compared to that of the tomato genes. The first intron is dramatically enlarged in the three tomato genes and is three to seven times the size of that found in Arabidopsis genes (Fig; 2). The first intron in the *LeMBF1a* gene encompasses 2312 bp and is twice larger than those of *LeMBF1b* and c. The second intron is twice smaller in *LeMBF1b* compared to *LeMBF1a* and c while the third intron, the smallest in size, shows less variation among the three genes. As a consequence of the presence of larger introns, the overall size of the transcribed region of *LeMBF1a*, *LeMBF1b*, and *LeMBF1c* is twice bigger than that of Arabidopsis genes. The size of the exons is well conserved among all four tomato MBF1 genes and between these latter and *AtMBF1a* and *AtMBF1b* genes.

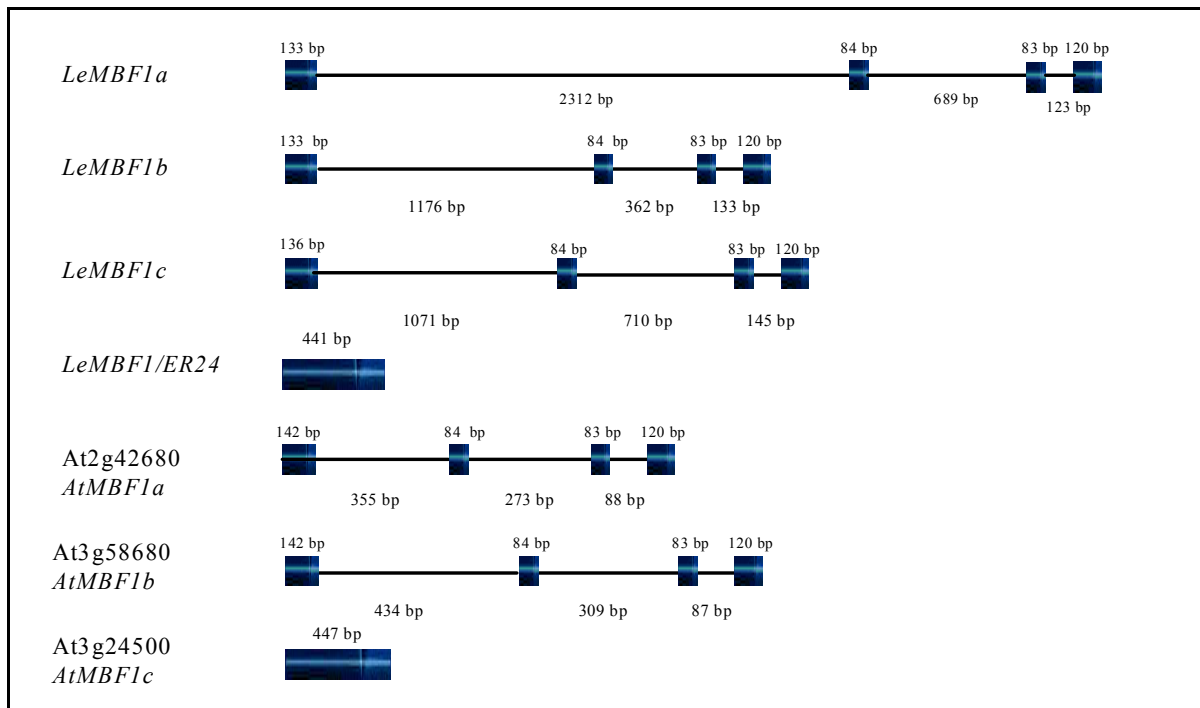


Figure 2. Comparison of Exon/Intron structure of tomato and Arabidopsis MBF1 genes. Black boxes represent exons and the lines connecting boxes denote introns. Numbers represent sizes in bp of each intron or exon.

### ***Tomato MBF1 gene family encode functional transcriptional co-activators***

To address the function of the tomato MBF1 genes, complementation assays of mutated yeast were performed. The yeast  $\Delta mbf1$  strain (KT131) is mutated in the yMBF1 gene which mediates the GCN4 dependent activation of HIS3 gene encoding the IGPDH enzyme necessary in the histidine biosynthetic pathway by bridging between GCN4 and TBP (Takemaru *et al.*, 1998). The yeast  $\Delta mbf1$  strain was reported to be sensitive to 3 aminotriazol (3-AT) an inhibitor of IGPDH enzyme. The ability of tomato MBF1 genes to complement the yMBF1 mutation was used to test their functionality as transcriptional co-activators. Yeast  $\Delta mbf1$  strain transformed with each of the tomato MBF1 genes were grown in the presence of 3-AT in a histidine free medium with 2% raffinose as carbon sources. Figure 3 shows that upon histidine starvation and in 20mM of 3-AT, the growth of the mutant yeast  $\Delta mbf1$  (KT131), was partially restored by transformation with LeMBF1a-c or with LeMBF1/ER24. This test clearly demonstrates that the four tomato *MBF1* genes encode functional transcriptional co-activator proteins and indicates that the mechanism by which MBF1 proteins regulate this process is conserved from yeast to plants.

### ***Tomato MBF1 genes show distinct expression patterns***

RNA extracted from leaf, root, stem, flower and fruit tissues were used to assess the accumulation of tomato MBF1 transcripts by real-time quantitative PCR. Figure 4a shows that LeMBF1/ER24, LeMBF1a, LeMBF1b and LeMBF1c transcripts are detected in all tissues tested with LeMBF1/ER24, LeMBF1a showing the most contrasted tissue-specific variation. Compared to its level in leaves taken as a reference tissue, LeMBF1/ER24 transcript accumulation is 60, 6 and 3 times higher in ripening fruit, flowers and roots, respectively while it is 3 times lower in the stem (Fig 4a). LeMBF1a transcripts accumulate preferentially in roots where they are 545 times higher than in leaves and show 4 times higher accumulation in fruit. The LeMBF1 transcript levels in flowers and stems are similar than in leaves (Fig. 4a). Compared to the leaf reference tissue LeMBF1b transcript accumulation in root, fruit, flower and stem is 5, 3, 2 and 2 times higher, respectively Fig. 4a).

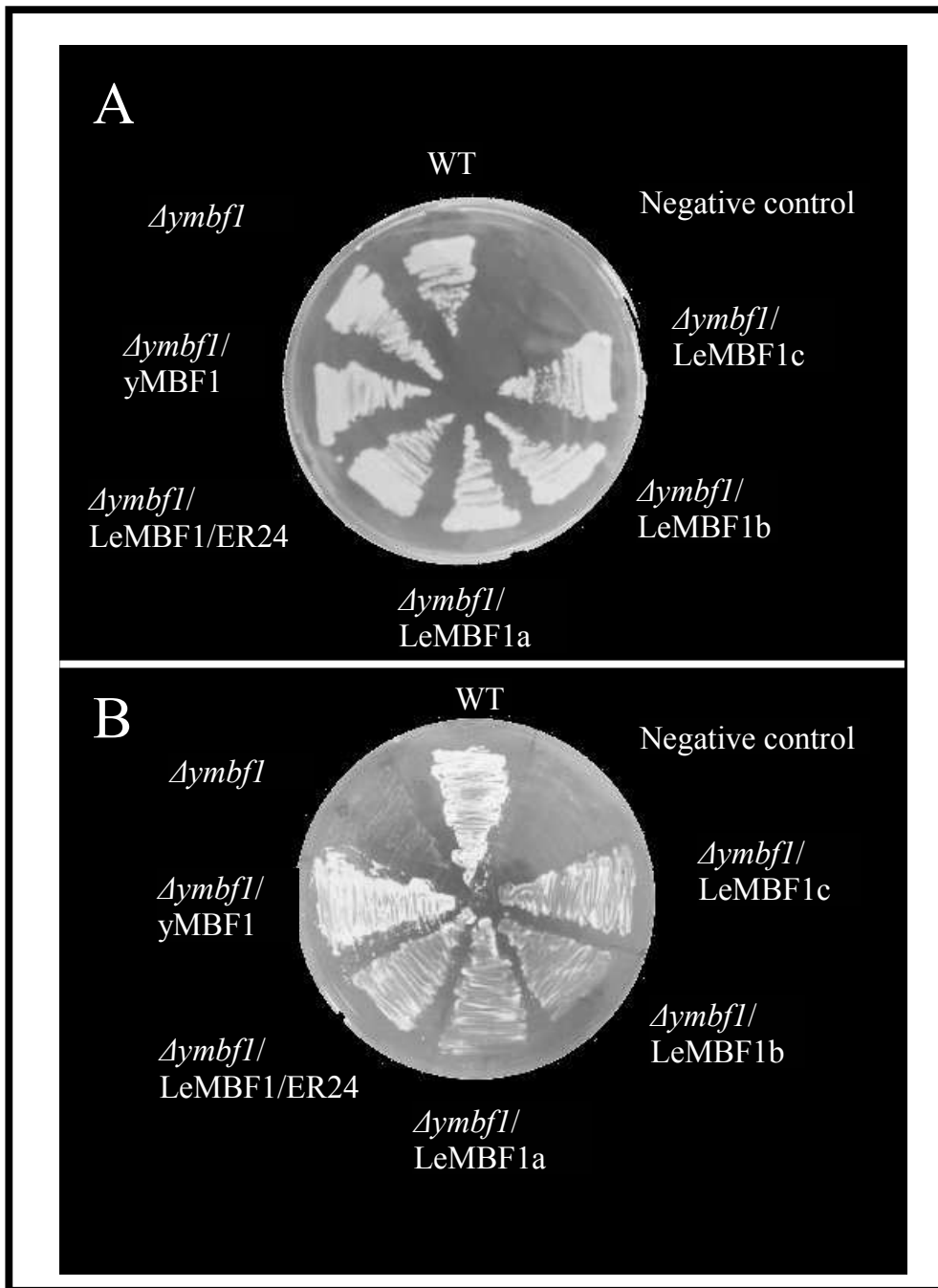
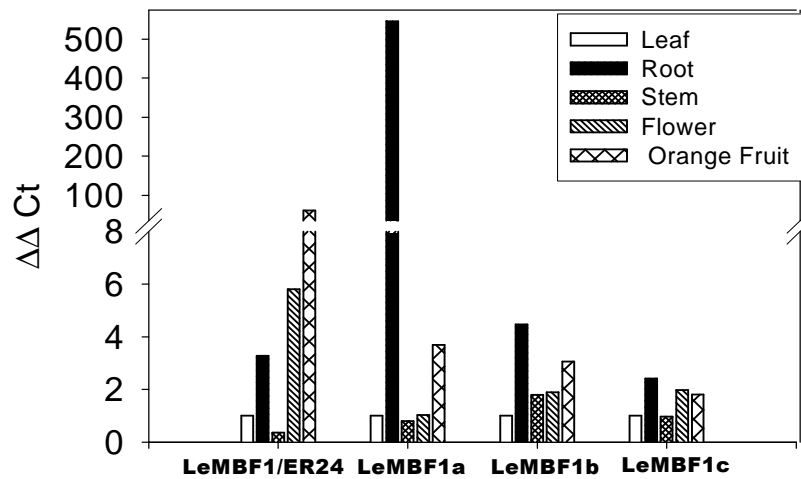


Figure 3. Growth of yeast mutant lacking yMBF1 transformed with *LeMBF1/ER24*, *LeMBF1a*, *LeMBF1b* and *LeMBF1c* and wt in a synthetic medium without histidine in the absence (A) or in the presence of the inhibitor 20 mM 3-AT (B).

Transcript accumulation of LeMBF1c shows the slightest tissue-specific variation being 2 times higher in root, flower and fruit and similar in leaves and stem (Fig. 4a). In order to uncover the relative abundance of tomato MBF1 transcripts in the different tissues tested, we compared their accumulation levels in leaves, orange fruit, flowers, roots and stems using LeMBF1/ER24 as a reference gene. Figures 4b-f indicate that members of the tomato MBF1 gene family display clear tissue-differential expression with LeMBF1b transcripts being the most abundant in all tissues tested except in ripening fruit where LeMBF1/ER24 transcripts display slightly higher accumulation. LeMBF1/ER24 is preferentially expressed in fruit and shows weak expression in leaf, root and stem. LeMBF1a shows preferential expression in root and leaves and very low expression in fruit, flowers and stem (Fig. 4c and 4d) while LeMBF1c transcripts are present in all tissues tested with the highest expression in stem and the lowest in fruit.

***LeMBF1/ER24 is highly induced during fruit ripening.***

In order to better define the dynamic expression of tomato *MBF1* genes in fruit we assessed the corresponding transcript accumulation at different stages of fruit ripening. Figure 5 indicates that LeMBF1/ER24 undergoes a sharp ripening-associated regulation compared to other MBF1 genes which display either weak or no regulation during fruit ripening. The level of LeMBF1/ER24 transcript was relatively low in mature green fruit, starts to increase at the breaker stage and peaks at orange stage where its abundance is 25 times higher than that in mature green stage (Fig. 5a). This accumulation declines at over-ripe stages though it remains 10 times higher than that of the pre-ripening stages. To further address the ripening associated expression of LeMBF1/ER24, we assessed the expression of the four tomato MBF1 genes in *nor*, *rin* and *Nr* tomato ripening mutants. Expression data obtained by quantitative real-time PCR clearly indicate that the ripening-induced expression of LeMBF1/ER24 and LeMBF1a is strongly impaired in the ripening mutants (Fig. 5b). Because ethylene is known to control fruit ripening in climacteric fruit, the ethylene responsiveness of the tomato *MBF1* genes was then assessed in immature green fruit where endogenous ethylene production is very low.



Expression level comparison of LeMBF1/ER24, LeMBF1a, LeMBF1b and LeMBF1c in different tissues relative to LeMBF1/ER24

	LeMBF1/ER24	LeMBF1a	LeMBF1b	LeMBF1c
Feuille	1	4	56	7.5
Tige	1	0.1	87	27
Racine	1	11	24	7.6
Fleur	1	0.01	6	3.5
Fruit orange	1	0.004	0.9	0.3

Figure 4. Tissue-specific expression *LeMBF1/ER24*, *LeMBF1a*, *LeMBF1b* and *LeMBF1c* in tomato. The levels of *LeMBF1s* transcripts were assessed by real-time quantitative PCR. The experiments were carried out in triplicate.  $\Delta\Delta Ct$  refers to the fold difference in each *LeMBF1* expression relative to leaf. (A) mRNA accumulation was monitored in leaves, root, stem, flower and orange fruit ( 65 days post anthesis dpa). (B) Expression level comparison of *LeMBF1/ER24*, *LeMBF1a*, *LeMBF1b* and *LeMBF1c* in leaves in orange fruit, flowers, roots, and stems.  $\Delta\Delta Ct$  refers to the fold difference in each *LeMBF1* expression relative to (A) the leaf and (B) to *LeMBF1/ER24*.

Figure 6 indicates that all four *MBF1* genes are transiently up-regulated by exogenous ethylene treatment in immature green fruit, however, the ethylene-responsiveness kinetics varied among the four genes (Fig. 6). *LeMBF1/ER24* undergoes rapid induction (15 min) while *LeMBF1b* and *LeMBF1c* respond within 1 hour. *LeMBF1a* which shows the highest induction also displays a distinct ethylene-dependent expression pattern with a strong decrease within 15 min, followed by 13 fold increase after 1 h treatment and then a new dramatic decrease at 6 h (Fig. 6).

### ***Responsiveness of tomato MBF1 genes to abiotic stresses***

Because *LeMBF1* genes show ethylene responsiveness and provided the role of ethylene in mediating plant stress responses, we assessed the expression tomato *MBF1* genes in a variety of abiotic stress conditions including heat-shock, cold, wounding and paraquat treatment (a light-dependent  $H_2O_2$  generator). Figure 7 shows that *LeMBF1/ER24* is strongly induced by all kind of stresses tested. Upon 2 hour heat-shock treatment, *LeMBF1/ER24* transcript accumulation undergoes rapid (within 2 hour) and dramatic increase (several thousands fold) before it decreases after 1 day to 25 times the level of untreated control plants (Fig. 7a). *LeMBF1a*, *b* and *c* also show heat-shock responsiveness but at much lesser extent (2 to 3 times increase). Cold treatment (Fig. 7b) also induced a dramatic and steady increase of *LeMBF1/ER24* transcript accumulation which reaches 440 times that of untreated plants after 2 days at 4°C. *LeMBF1a*, *LeMBF1b* and *LeMBF1c* genes also show significant increase in their transcript accumulation after 2 days of cold treatment reaching 8, 3 and 9 times the level of control plants, respectively (Fig. 7b). Paraquat treatment strongly induced the accumulation of *LeMBF1/ER24* transcripts (29 times and 9 times after 1 day and 3 days, respectively) whereas it did not alter the expression of other tomato *MBF1* genes (Fig. 7c). Wounding, resulted in 2 times increase in *LeMBF1/ER24* transcripts accumulation after 2 h and only a slight decrease of *LeMBF1a*, *LeMBF1b* and *LeMBF1c* transcript accumulation (Fig. 7d).

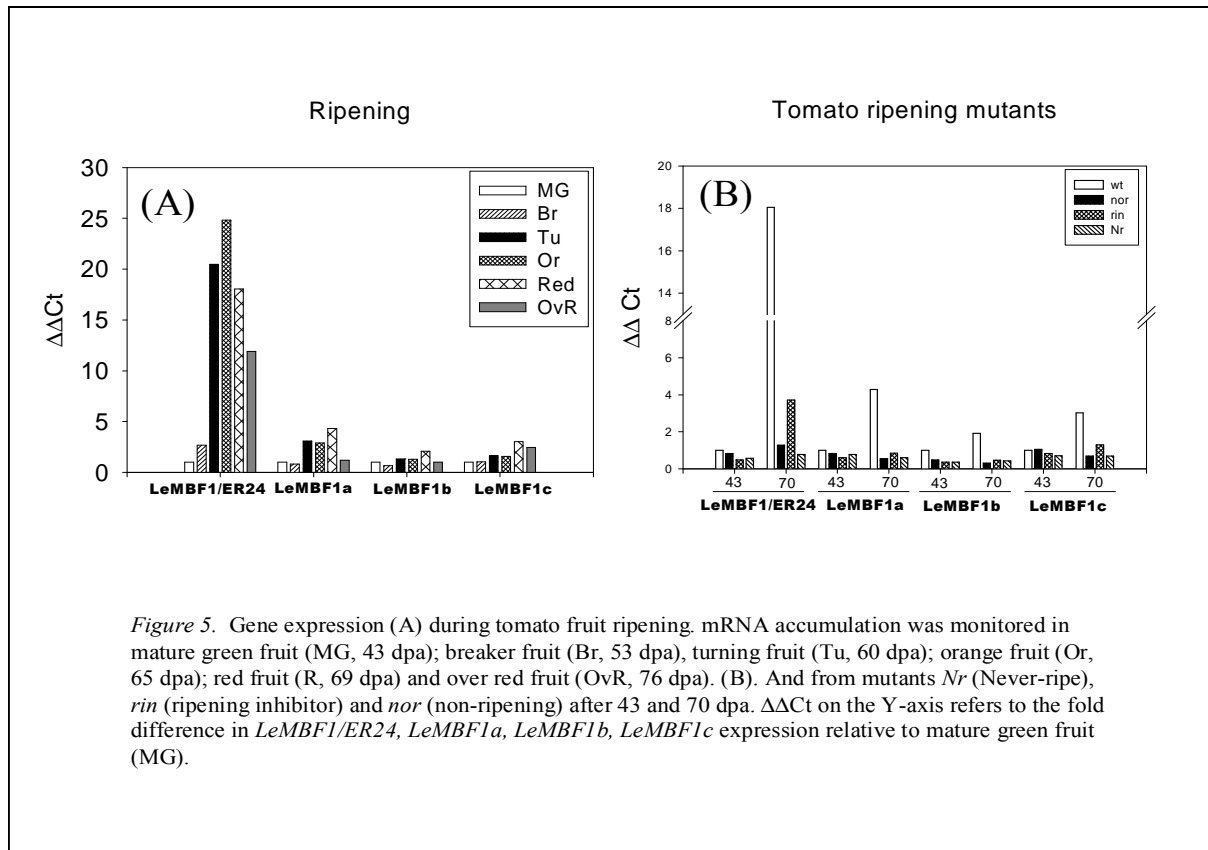


Figure 5. Gene expression (A) during tomato fruit ripening. mRNA accumulation was monitored in mature green fruit (MG, 43 dpa); breaker fruit (Br, 53 dpa), turning fruit (Tu, 60 dpa); orange fruit (Or, 65 dpa); red fruit (R, 69 dpa) and over red fruit (OvR, 76 dpa). (B). And from mutants *Nr* (Never-ripe), *rin* (ripening inhibitor) and *nor* (non-ripening) after 43 and 70 dpa.  $\Delta\Delta Ct$  on the Y-axis refers to the fold difference in *LeMBF1/ER24*, *LeMBF1a*, *LeMBF1b*, *LeMBF1c* expression relative to mature green fruit (MG).

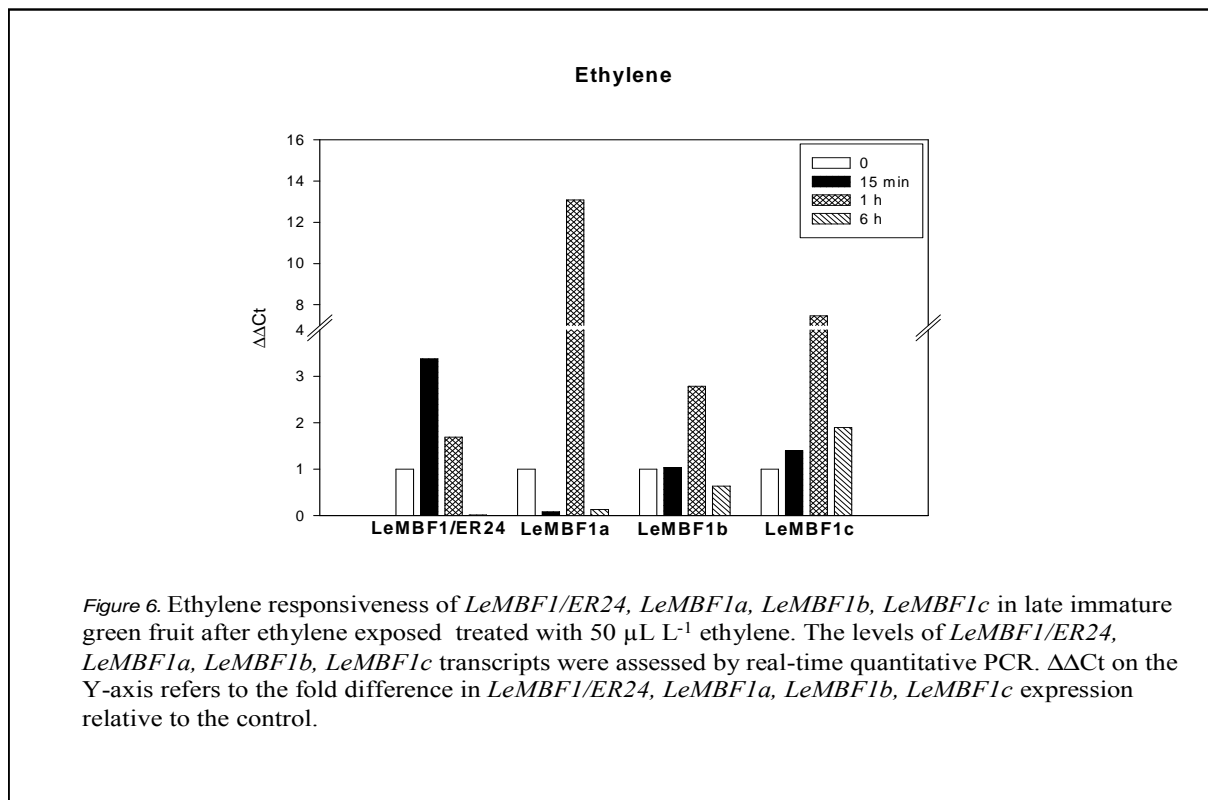


Figure 6. Ethylene responsiveness of *LeMBF1/ER24*, *LeMBF1a*, *LeMBF1b*, *LeMBF1c* in late immature green fruit after ethylene exposed treated with  $50 \mu L L^{-1}$  ethylene. The levels of *LeMBF1/ER24*, *LeMBF1a*, *LeMBF1b*, *LeMBF1c* transcripts were assessed by real-time quantitative PCR.  $\Delta\Delta Ct$  on the Y-axis refers to the fold difference in *LeMBF1/ER24*, *LeMBF1a*, *LeMBF1b*, *LeMBF1c* expression relative to the control.

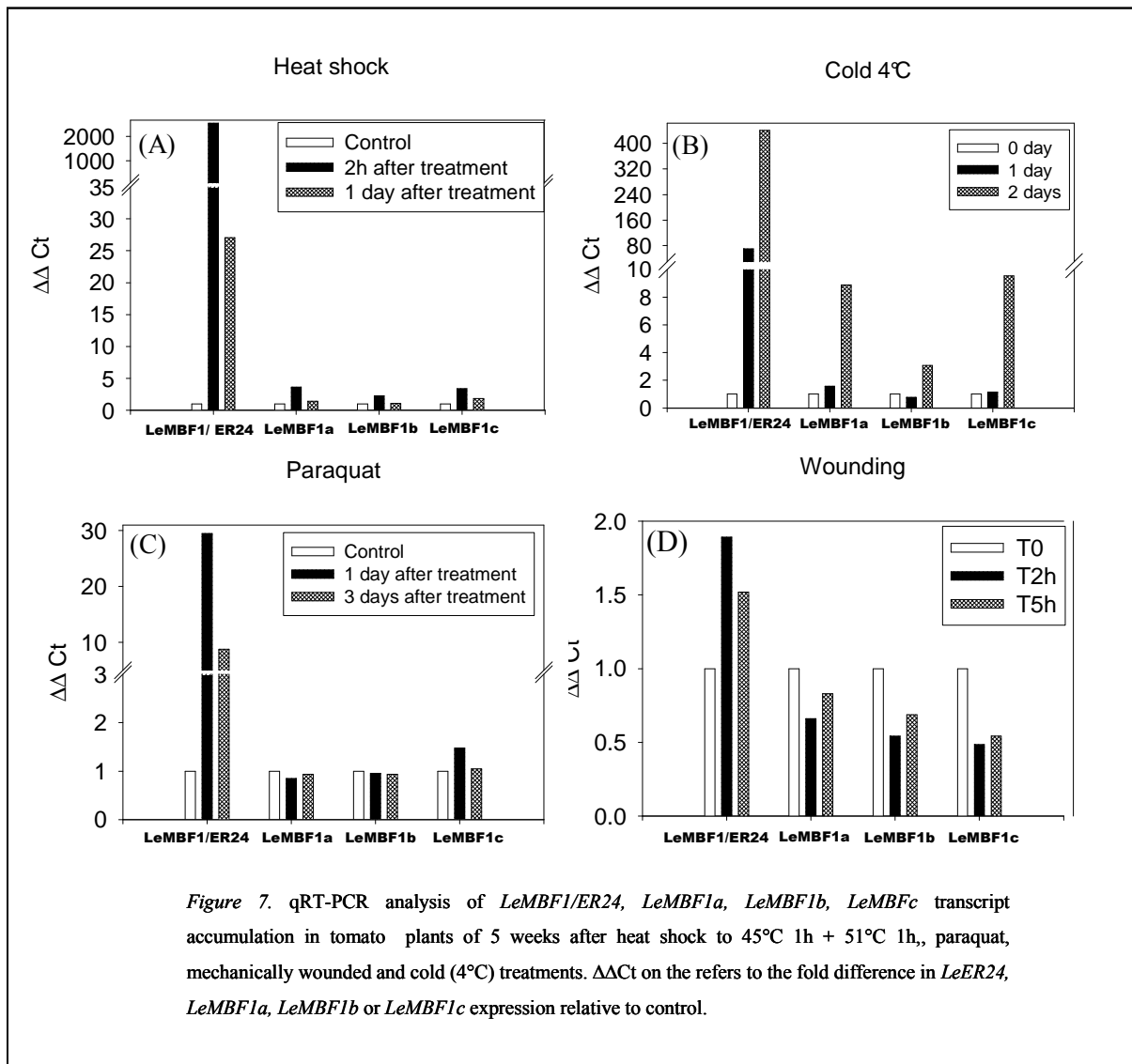


### ***Isolation of LeMBF1/ER24 partners by Yeast two-hybrid screening***

In an attempt to identify partner proteins of tomato MBF1, we performed a two hybrid screening using LexA-MBF1/ER24 as bait and a fruit cDNA library as prey. Following several selection rounds 17 positive cDNA clones were retained and sequenced. Sequence analyses of the isolated genes conducted by Blast (Altschul *et al.*, 1997) identified mainly three groups of encoded proteins that are related to stress responses, ripening and transcriptional regulation (Table 2). Noteworthy, some of the isolated clones have been picked a number of times during the screening procedure among which the TBP, an expected natural partner of MBF1s. Among the putative interacting proteins isolated, Hap5a is another transcriptional regulator associated with the CAAT-box binding complex. Interestingly, a number of ripening-associated and ethylene-responsive clones were also isolated among which 2A11 and E4 are known as fruit-specific genes. In line with the stress-induced expression of LeMBF1/ER24, a number of the isolated clones are related to stress responses. The class1 small heat-shock protein correlates very well with the strong induction of the LeMBF1/ER24 upon heat treatment while Metallothioneins, glutathione-s-transferase (GST), monooxygenase, methionine sulfoxide reductase and  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase ( $\gamma$ -ECS) are putatively involved in oxidative stress repair.

### ***LeMBF1/ER24 is involved in tolerance to heat-shock stress***

Based on the rapid and extremely strong induction of the LeMBF1/ER24 upon heat-shock treatment we addressed its putative involvement in plant tolerance to high temperature. Transgenic Arabidopsis lines expressing the tomato LeMBF1/ER24 gene under the control of the 35S constitutive promoter were generated. Compared to control untransformed plants, ectopic expression of the tomato MBF1/ER24 gene did not result in any visible phenotype when the plants are grown under normal condition. By contrast, eight-day-old wild type seedlings incubated 45 minute at 48°C displayed high mortality 5 days after treatment while LeMBF1/ER24 over-expressing lines showed substantial tolerance (Figure 6). Under the same experimental conditions, over-expression of LeMBF1c also confers tolerance to heat-shock while LeMBF1a and LeMBF1b over-expressing lines displayed the same susceptibility than wild type plants.



***Nuclear localization of MBF1 requires binding to partner proteins***

The subcellular localization of LeMBF1/ER24, LeMBF1a, LeMBF1b and LeMBF1c was addressed by transient expression in tobacco protoplasts of chimeric construct consisting of C-terminal fusion of tomato MBF1 genes to the green fluorescent protein (GFP). Following transfection, protoplasts were analyzed by confocal laser scanning microscopy. Figure 7a reveals that the ubiquitous presence of the four tomato MBF1 in the nucleus and in the cytoplasm. This result is unexpected as MBF1 proteins are putative transcriptional regulators acting in the nuclear compartment. In order to test whether association with interacting proteins is required for the nuclear import of the tomato MBF1 proteins, we carried out co-transfection assays of tobacco protoplasts with MBF1-GFP fusion proteins and LeTBP and LeFKBP12, both shown to be interacting partners of MBF1 proteins. Figure 7 shows partial translocation of LeMBF1s to the nucleus upon interaction with LeTBP and FKBP12. This result indicates that LeMBF1 proteins are partially transported into nucleus in the presence of TBP and other interacting partners.

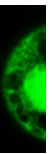
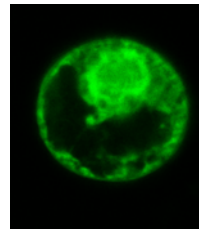
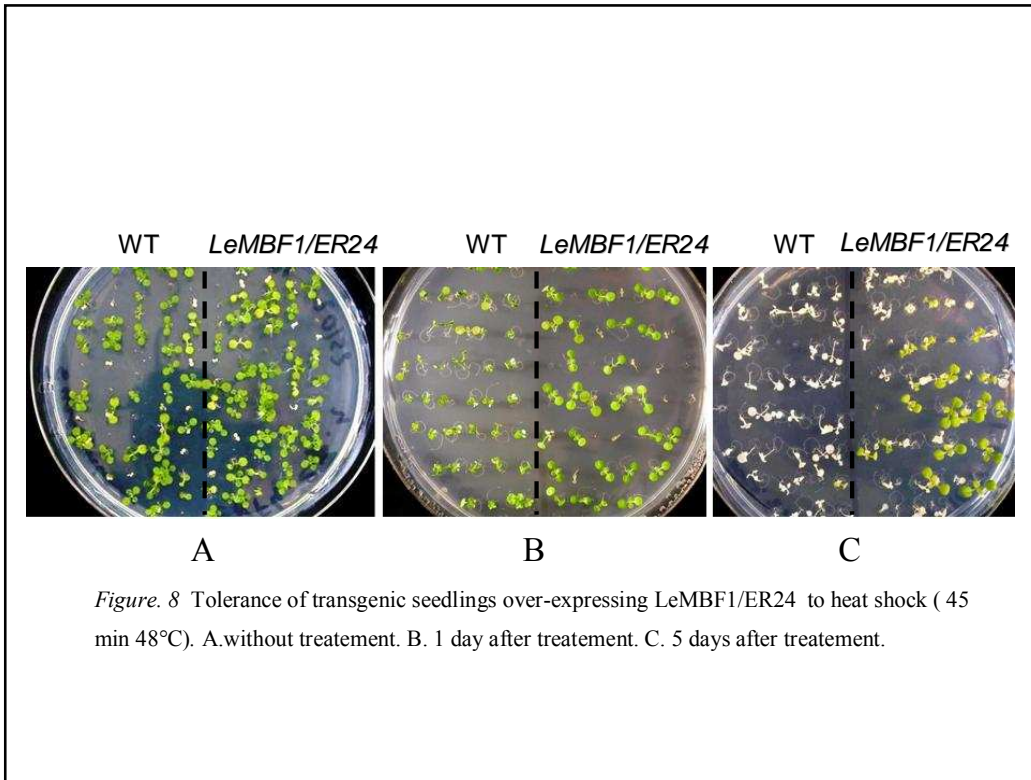
Table 2. Proteines identifies in a *LeMBF1/ER24* screening in a tomato fruit expression library.

<u>Gene name</u>	<u>Species</u>	<u>Accession number</u>
<b>Transcription Factors</b>		
TATA binding protein	Solanum tuberosa	CAA44360.1
CCAAT-box binding transcription factor Hap5a	Arabidopsis thaliana	NP_190428.1
<b>Ripening associated genes</b>		
2A11-Lycopersicon esculentum fruit-specific protein	Lycopersicon esculentum	M21775.1 TOM2A11
Lipoxygenase LOXC	Lycopersicon esculentum	T07408
E4-fruit-ripening gene	Lycopersicon esculentum	S44898
Histidine decarboxylase	Lycopersicon esculentum	CAA50719.1
Pectate lyase family protein	Lycopersicon esculentum	BTO12714.1
<b>Stress associated genes</b>		
Gamma-glutamylcysteine synthetase	Lycopersicon esculentum	AAB71230.1
Monoxygenase family protein	Arabidopsis thaliana	NP_196694.1
FKBP12- immunophilin	Vicia faba	AB57848.1
pT52 mRNA for wound-induced gene	Lycopersicon esculentum	CAA42537
Methionine sulfoxide reductase	Fragaria x Ananassa	Z69596.2
Metallothionein like protein	Lycopersicon esculentum	CAA92652.1
Small heat shock protein 20.0 class I	Lycopersicon peruvianum	CAA12389
Glutathione -S- transferase	Lycopersicon esculentum	AAL92873.1
Metallocarboxypeptidase inhibitor (MCPI)	Solanum tuberosum	T07138
Ser/Thr protein kinase Avr9/Cf-9 induced kinase 1(ACIK1)	Nicotiana tabacum	AAV92906

## Discussion.

MBF1 proteins are important transcriptional regulators involved in the control of gene expression via building a link between the RNA polymerase-associated transcription complex and trans-acting factors that bind distal elements in the promoter of eukaryotic genes (Li *et al.*, 1994). The first plant *MBF1*-like gene, the tomato *LeMBF1/ER24*, was primarily isolated as an ethylene-responsive gene (Zegzouti *et al.*, 1999). We show here that while only three *MBF1*-type genes were found in Arabidopsis genome, *MBF1* proteins in the tomato are encoded by a small multigene family comprising four members. The ability of the tomato *MBF1* genes to complement the yeast *MBF1*-disrupted strain reveals that all four tomato *MBF1* genes encode functional transcriptional co-activator indicating that the mechanism by which *MBF1* proteins regulate transcription is well conserved among eukaryotic organisms from yeast to higher plants. The genomic structure of *MBF1* genes is remarkably conserved between Arabidopsis and tomato except for the size introns that are significantly larger in the tomato genes. Phylogenetic analyses indicate that tomato *MBF1* genes are divided in two distinct groups, *LeMBF1a-c* belong to one group while *LeMBF1/ER24* lies in a separate group. *LeMBF1/ER24* and its putative Arabidopsis ortholog *AtMBF1c*, are highly divergent from the remaining members of the multigene family exhibiting an intronless distinctive genomic structure. Consistent with its distinctive genomic structure, *LeMBF1/ER24* encodes a protein that shares less than 45% sequence homology with other tomato *MBF1* proteins suggesting that ER24-type *MBF1* may have specific roles in plant developmental processes.

Subcellular localization studies performed using GFP-fusion construct unexpectedly revealed that tomato *MBF1* proteins are present both in the cytosol and the nucleus. This cytosolic localization is neither consistent with their function as transcriptional regulators acting in the nuclear compartment nor with the data reported recently showing that Arabidopsis *MBF1* proteins are predominantly localized in nucleolus (Sugikawa *et al.*, 2005). However, it has been shown in animal systems *MBF1* proteins are resident in the cytosolic compartment and that *MBF1*-function is controlled by nuclear translocation (Liu *et al.* 2000).



*Figure 9.* Sub-ubiquitous presence of MBF1s in the nucleus localised in the MBF1s are c

Our data indicate that nuclear translocation of tomato MBF1 proteins is enhanced by the presence of interacting partners such as TBP and FKBP12 suggesting that MBF1-function in plants may be controlled at the levels of both transcriptional induction and post-translational regulation.

While expression studies show that transcripts corresponding to the four tomato MBF1 genes are detected in all plant tissues tested, members of this gene family display tissue-preferential expression patterns. *LeMBF1/ER24* shows distinctive and contrasted expression pattern with high transcript accumulation found in ripening fruit and flowers and very low expression in leaves and stems. Indeed, *LeMBF1/ER24* is the only tomato MBF1 gene showing a sharp ripening-regulated expression that is almost completely abolished in the ripening mutant genotypes such as *nor*, *rin* and *Nr*. Noteworthy, using DNA microarrays analyses it was also shown recently that MBF1 is up-regulated during tomato fruit ripening and that its expression is reduced in the tomato ripening mutants (Alba *et al.*, 2005). *LeMBF1a* shows clear preferential expression in roots where its transcripts are several hundred fold more abundant than in leaves, stems, flowers or fruit. *LeMBF1c* transcripts and, to a lesser extent *LeMBF1b*, show only slight tissue-specific variation. Assessing the comparative abundance of the four MBF1 transcripts in different plant tissues indicated that *LeMBF1b* is the most abundant in leaves and roots where *LeMBF1/ER24* shows very weak expression.

The expression data indicate that the *LeMBF1/ER24* gene is dramatically induced by a variety of abiotic stresses like heat-shock, cold treatment and oxidative stress. Expression of MBF1 genes has been associated with stress responses in both plant and animal organisms (Pnueli *et al.*, 2002, Rizsky *et al.*, 2002, Jindra *et al.*, 2004). Consistent with the expression pattern, the search for *LeMBF1/ER24*-interacting proteins lead to the isolation of a number of ripening and stress-related genes. Two well known ripening-regulated genes, 2A11 and E4, are the most frequently picked clones among those isolated by yeast two hybrid screening using *LeMBF1/ER24* as a bait. Likewise, a number of stress-associated genes were also isolated in this screening. Both the distinctive expression pattern of *LeMBF1/ER24* and the putative function of its interacting partners are strongly indicative of specific roles for this gene in stress responses and fruit ripening. A more direct evidence of the involvement of

Le*MBF1/ER24* in stress responses is provided by the enhanced tolerance of Arabidopsis lines expressing this tomato MBF1 gene.

Our data clearly show that MBF1 gene family in the tomato is differentially regulated in various normal and abnormal developmental processes. The MBF1-type transcriptional co-activators are likely to play a key role in integrating different signaling pathways thus contributing to a better tune of the required network of gene in responses to environmental cues.

## Materials and Methods.

### Isolation of the genomic clone

Genomic DNA was extracted from 1 g of ground tomato leaves. The powder was mixed with 5 ml of extraction buffer (2% (w/v) CTAB, NaCl 1.4 M, EDTA 20 mM, Tris-HCl 100 mM pH 8) and warmed at 65°C during 10 minutes. After a phenol/chloroform/isoamylalcohol and a chloroform extraction, DNA was precipitated with 1 volume of isopropanol during 20 minutes on ice. After centrifugation (5 min, 2000 g), the pellet was resuspended in 10 ml of wash buffer (76% (v/v) ethanol, ammonium acetate 10 mM). After centrifugation (10 min, 2000 g), the DNA is resuspended in 200 µL of sterile water. A RNase treatment was done at 37°C during 10 minutes. Several primers were chosen on the cDNA sequence and polymerization chain reactions were performed on the genomic DNA (MBF1abc\_Forward: 5'CAAACAGGGCTGCCTCTAG3', MBF1aDDRT\_Reverse: 5'CTGAAAACCTGATTTTCATAACG3', MBF1b\_DDRT\_Reverse: 5'AGAGATTTGAGAAGCCAAGAG3', MBF1b\_Forward: 5'ATGGCCGGATTGTCACAAG3', MBF1c\_Forward: 5'ATGAGTGGAGGATTATCACAAG3', MBF1c\_Reverse: 5'TCATTCTTTCTCTAAGTTTGG3', MBF1abc\_Reverse: 5'CTGAAAACCTGATTTTCATAACG3'). The fragments were cloned in pGEM-T easy vectro (Promega) and sequenced. Comparative analysis between the genomic clone and cDNA sequences allowed the delimitation of introns and exons.



### Complementation

The wt KT130 (*trp1-Δ1ura3-52 leu2-P1*) strain of was used for generated an *mbf1*-deficient yeast mutant ( $\Delta mbf1$ ) by gene replacement of yeast MBF1 with a LEU2 selectable marker (Takemaru *et al.*, 1998) To express LeMBF1a, LeMBF1b, LeMBF1c and LeER24 in the  $\Delta mbf1$  strain, the complete tomato's MBF1 ORF was PCR-amplified from tomato plants DNA using Taq DNA polymerase and an specific pair of primer for each *mbf1*(MBF1a: 5' ATGAGTGGAATATCGCAAGACTGG3' and 5'TTATTTCTTCCCTCGAAGTTTCG3'; MBF1b: 5'ATGGCCGGATTGTCACAAGA3' and 5'TTATTTCTTCCACGAAGTTTC3', MBF1c: 5'ATGAGTGGAGGATTATCACAAGAC3' and 5'TCATTTCTTTCCTCTAAGTTTGG3'; ER24: 5'ATGCCGATGCGACCAACA3' and 5'TCATGACTTGTGAATTTTACCTC3'). Amplicons were ligated into the pYES TOPO vector containing a URA3 selectable marker (Invitrogen).After transformation into E.coli Top 10 one shot (Invitrogen) the plasmides of some transformants were tested by PCR to confirm the orientation with the primer T7 and the primer reverse of each MBF1 and after the plasmids were sequenced to confirm the identity of *Lembf1* into pYES TOPO. Plasmids containing the four MBF1 were transformed into yeast  $\Delta mbf1$  competent cells. The subsequents strains  $\Delta mbf1/LeMBF1a$ ,  $\Delta mbf1/LeMBF1b$ ,  $\Delta mbf1/LeMBF1c$  and  $\Delta mbf1/LeER24$  were obtained by selecting yeast transformants on agar plates containing a uracil-free synthetic medium (SM-U). Like positive control .ScMBF1 was amplified (5'ATGTCTGACTGGGATACA 3' and 5' TGTCATTTCTTCTTTGGAGCTCC 3') and transformed into  $\Delta mbf1$ .

Since MBF1 mediates GCN4-dependent transcriptional activation in yeast, the  $\Delta mbf1$  strain under conditions of histidine starvation is sensitive to 3-AT, which inhibits IGPDH encoded by the HIS3 gene (Takemaru *et al.* 1997, 1998) The sensibility to 3-AT in  $\Delta mbf1$  can be overcome if the yMBF1 is reintroduced (Takemaru *et al.*1997) For LeMBF1 the sensitivity was tested to 20 mM 3-AT in 2% raffinose as a carbon source at 28 °C for 7 days or for 3 days without 3-AT.

### Plant material

*Lycopersicon esculentum* (Ailsa Craig) plants were grown in soil under light for 13 hr at 25°C and in darkness for 11 hr at 20°C. Late immature green fruit (DPA), unable to produce ripening-related ethylene, were harvested and treated in 10-litre sealed jars with 50  $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$  of ethylene for 15 min, 1 h and 6 h while control plants were exposed to air alone. The ripening stages were harvested at mature green (MG) 43 DAP, breaker (Br) 53 DAP, turning (Tu) 60 DPA, Orange (Or) 65 DPA, Red (R) 69 DPA and Over ripe (Ov) 76 DPA. The fruits with and without treatment and also flowers, roots, leaves and stems were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until RNA extraction.

### RNA extraction

Total RNA were extracted by the cetyltrimethyl-ammonium bromide method according Hamilton et al. (1990). Plant tissues were ground in liquid nitrogen. About 5 g of powdered tissues (15 ml) were mixed with same volume (15 mL) RNA extraction buffer and phenol/chloroform (15 mL) in 50 mL Nunc tube. The tubes were centrifuged at 4°C and 4000 rpm for 45 min. The supernatants were transferred to fresh Nunc tube and add them 1/10 volume sodium acetate (3M, pH 4.5) and the same volume of ice cold isopropanol, overnight at -20°C. After the overnight precipitation, the tubes were centrifuged at 4000 rpm for 45 min at 4°C. The pellets were washed with 5 mL of ice ethanol 70% and were centrifuged by 5 min at 4°C. The pellets were dried in a speedvac and were resuspended in 4 mL of DEPC-water. Immediately an equal volume of CTAB 2% extraction buffer and 1/2 volume of CTAB 1% were added. The tubes were centrifuged by 50 min at 4000 rpm room temperature. The pellets were resuspended in 1.4M NaCl (2 mL) and 2.5 vol. of ice cold ethanol 100% (5 mL) and were incubated at -20°C at least 3 h. The tubes were centrifuged at 4000 rpm by 30 min at 4°C. The pellets were washed with 1 mL of ice cold ethanol 70% and were transferred to eppendorf tubes and centrifuged at 13000 rpm 10 min at 4°C. The pellets were dried in speedvac and resuspended in DEPC-water. The RNA were treated with RQ Dnase (Promega).

Quantitative RT-PCR

To obtain total RNA, the same protocol for northern analysis was used. After quantification, 10 µg of RNA was treated with DNase I (Promega) and cleaned up with a phenol-chloroform extraction. The Reverse transcription reaction was done with the Kit omniscrypt Qiagen using 2µg of total RNA

Real-time quantitative PCR was performed using 4 ng of total RNA for the four LeMBF1 and actin in a 20-µL reaction volume using SYBR GREEN Master Mix reagents kit (PE-Applied Biosystems, Foster City, CA) on an ABI PRISM 7900HT sequence-detection system. PRIMER EXPRESS software (PE-Applied Biosystems) was used to design gene-specific primers:

LeMBF1a forward primer, 5'CTTTAATCATTGGCTATGTTTTTGCT3'; LeMBF1a reverse primer, 5'CAGAAGAAACAGCTAATTCAACAGAGAA3'; LeMBF1b forward primer 5'GAACGTCTACATCGTTTGGGTTCT3'; LeMBF1b reverse primer 5'ACGTCCCGAATCCAGACACA3'; LeMBF1c forward primer 5'CAACTTTTTCTGTTAGCCCTCTTTCTAT3'; LeMBF1c reverse primer 5'ATGTAGCCAAGAAATCCAGAACCA3'; LeER24forward primer 5'CGTTGGCAGTTAATGTAAGAAAGCTAG3'; LeER24 reverse primer 5'TCCACCGGCAATTTCTCAA3'. Optimal primer concentration for LeER24 was 300 nM, for MBF1a 50nM, for MBF1b 300 nM and for MBF1c 300nM and optimal primer and concentrations for actine was 900 nM. RT-PCR conditions were as follows: 50°C for 2 min, 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min and one cycle 95°C 15 s and 60°C 15 s. Samples were run in triplicate on each 384-well plate.

For each sample, a Ct (threshold cycle) value was calculated from the amplification curves by selecting the optimal Rn (emission of reporter dye over starting background fluorescence) in the exponential portion of the amplification plot.

Relative fold differences were calculated based on the comparative Ct method using the Actin gene as an internal standard.

Transient expression of LeMBF1:GFP fusion proteins.

The ORFs of wild type of the four MBF1 were cloned in the Sma I restriction site of the pGreen 002935SOMCaMVT vector (gift of Dr Julie Cullimore, INRA Toulouse). The corresponding ORFs (598 AA) were PCR-amplified (Vent polymerase, Clontech) from a

tomato cDNA using the following primers: mbf1 (MBF1a: 5' ATGAGTGGAAATATCGCAAGACTGG3' and 5'TTATTTCTTCCCTCGAAGTTTCG 3'; MBF1b 5'ATGGCCGGATTGTCACAAGA 3' and 5'TTATTTCTTTCCACGAAGTTTC 3'; MBF1c 5'ATGAGTGGAGGATTATCACAAGAC 3' and 5'TCATTTCTTTCTCTAAGTTTGG 3'; Er24 5' ATGCCGATGCGACCAACA 3' and 5' TCATGACTTGTGAATTTTACCTC 3') LeTBP 5' ATGGCAGATCAGGGATTAGAG 3' and 5' CATTGTTGATTCTTCCTGAAC 3'; LeFKBP12 5' ATGGGAGTGGAGAAGGAA 3' and 5' TCATTGTGCACCTAGGACTTCAATC 3'; 2A11 5' ATGGCTGCCAAAATTTCAGA 3' and 5' TTATACGCGCAGAGACAGATAA 3'. This vector allows the transient expression of protein in C-terminal fusion with enhanced GFP. For protoplast transfection assay, suspension-cultured tobacco BY-2 cells were cultured in standard conditions, the cells were digested into 10 mL of an enzyme solution containing 1.0% (w/v) cellulase 345 (Cayla, France), 0.2% (w/v) pectolyase Y-23 (Seishin Pharmaceutical, Tokyo), 0.6 M mannitol and 25 mM MES-KOH, pH 5.5, at 37°C for 90 mins. Tobacco protoplasts were isolated and transfected by a modified polyethylene glycol method as described (Negrutiu, 1987; Abel, 1994). Typically, 0.3 ml of protoplast suspension ( $0.5 \times 10^6$ ) was transfected with 50µg sheared salmon sperm carrier DNA and 10 µg of DNA of LeMBF1::GFP (mbf1a, mbf1b, mbf1c and er24) or 35S::GFP (control) plasmid and for colocalisation assay 10 µg of DNA of LeMBF1::GFP (mbf1a, mbf1b, mbf1c and er24) with 50µg of TBP, FKBP12 or 2a11 plasmid without GFP. The transfected protoplasts were incubated at 25°C for 16 h. Confocal fluorescent images were obtained with a Leica (Leica TCS SP2, Leica DM IRBE; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) confocal scanning laser microscope. The samples were illuminated with an argon ion laser (488 nm wavelength) for GFP fluorescence. The emitted light was collected between 500-525 nm.

**References.**

- Alba R, Payton P, Fei Z, McQuinn R, Debbie P, Martin GB, Tanksley SD, Giovannoni JJ. (2005) Transcriptome and selected metabolite analyses reveal multiple points of ethylene control during tomato fruit development. *Plant Cell*, 17: 2954-65.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, 25: 3389-402.
- Jindra M, Gaziova I, Uhlirova M, Okabe M, Hiromi Y, Hirose S. (2004) Coactivator MBF1 preserves the redox-dependent AP-1 activity during oxidative stress in *Drosophila*. *EMBO J.*, 23: 3538-47.
- Kabe Y, Goto M, Shima D, Imai T, Wada T, Morohashi K, Shirakawa M, Hirose S, Handa H. (1999) The role of human MBF1 as a transcriptional co-activator. *J Biol Chem*. 274: 34196-202
- Godoy AV, Zanetti ME, San Segundo B, Casalongue CA. (2001) Identification of a putative *Solanum tuberosum* transcriptional co-activator up-regulated in potato tubers by *Fusarium solani* f. sp. *eumartii* infection and wounding. *Physiol Plant.*, 112: 217-22.
- Li FQ, Ueda H, Hirose S. (1994) Mediators of activation of fushi tarazu gene transcription by BmFTZ-F1. *Mol Cell Biol*. 14: 3013-21
- Matsushita Y, Miyakawa O, Deguchi M, Nishiguchi M, Nyunoya H. (2002) Cloning of a tobacco cDNA coding for a putative transcriptional co-activator MBF1 that interacts with the tomato mosaic virus movement protein. *J Exp Bot*. 53: 1531-2
- Naar AM, Lemon BD, Tjian R. (2001) Transcriptional co-activator complexes. *Annu Rev Biochem*. 70: 475-501.
- Ozaki J, Takemaru K, Ikegami T, Mishima M, Ueda H, Hirose S, Kabe Y, Handa H and Shirakawa M. (1999) Identification of core domain and the secondary structure of the transcriptional co-activator MBF1. *Genes to cells*. 4: 415-24.
- Pnueli L, Hallak-Herr E, Rozenberg M, Cohen M, Goloubinoff P, Kaplan A, Mittler R. (2002) Molecular and biochemical mechanisms associated with dormancy and drought tolerance in the desert legume *Retama raetam*. *Plant J*. 31: 319-30
- Rizhsky L, Liang H, Mittler R. (2002) The combined effect of drought stress and heat-shock on gene expression in tobacco. *Plant Physiol*. 130: 1143-51
- Rizhsky L, Liang H, Shuman J, Shulaev V, Davletova S, Mittler R. (2004) When defense pathways collide. The response of *Arabidopsis* to a combination of drought and heat stress. *Plant Physiol*. 134: 1683-96.

- Roeder RG. (1991) The complexities of eukaryotic transcription initiation: regulation of preinitiation complex assembly. *Trends Biochem Sci.* 16: 402-8.
- Sugikawa Y, Ebihara S, Tsuda K, Niwa Y, Yamazaki KI. (2005) Transcriptional co-activator MBF1s from *Arabidopsis* predominantly localize in nucleolus. *J Plant Res.* Nov 9; [Epub ahead of print]
- Spiegelman BM, Heinrich R. (2004) Biological control through regulated transcriptional co-activators. *Cell.* 119: 157-67
- Suzuki N, Rizhsky L, Liang H, Shuman J, Shulaev V and Mittler R. (2005) Enhanced tolerance to environmental stress in transgenic plants expressing the transcriptional co-activator multiprotein bridging factor 1c. *Plant Physiol.*, 139: 1313-22.
- Takemaru K, Li FQ, Ueda H, Hirose S. (1997) Multiprotein bridging factor 1 (MBF1) is an evolutionarily conserved transcriptional co-activator that connects a regulatory factor and TATA element-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94: 7251-6
- Takemaru K, Harashima S, Ueda H, Hirose S. (1998) Yeast co-activator MBF1 mediates GCN4-dependent transcriptional activation. *Mol Cell Biol.* 18: 4971-6.
- Tsuda K, Tsuji T, Hirose S, Yamazaki K. (2004) Three *Arabidopsis* MBF1 homologs with distinct expression profiles play roles as transcriptional co-activators. *Plant Cell Physiol.* 45: 225-31.
- Tsuda K, Yamazaki K. (2004) Structure and expression analysis of three subtypes of *Arabidopsis* MBF1 genes. *Biochim Biophys Acta.* 1680: 1-10.
- Zanetti ME, Blanco FA, Daleo GR, Casalongue CA. (2003) Phosphorylation of a member of the MBF1 transcriptional co-activator family, StMBF1, is stimulated in potato cell suspensions upon fungal elicitor challenge. *J Exp Bot.* 54: 623-32
- Zanetti ME, Chan RL, Godoy AV, Gonzalez DH, Casalongue CA. (2004) Homeodomain-leucine zipper proteins interact with a plant homologue of the transcriptional co-activator multiprotein bridging factor 1. *J Biochem Mol Biol.* 37: 320-4
- Zegzouti H, Jones B, Frasse P, Marty C, Maitre B, Latch A, Pech JC, Bouzayen M. (1999) Ethylene-regulated gene expression in tomato fruit: characterization of novel ethylene-responsive and ripening-related genes isolated by differential display *Plant J.* 18: 589-600



```

LeMBF1b 1 ----MAGLSQDWEPPVIRKKAPTAAARKDEKAVNAARRAGAEIETVRKATAGSNKAASS
LeMBF1c 1 ----MSGGLSQDWEPPVIRKKAPTAAARKDEKAVNAARRSGAEIETVRKSTAGSNRAASS
LeMBF1a 1 ----MSGISQDWEPPVIRKKAPTSAAARKDEKAVNAARRSGAEIETVKKSNAGSNRAASS
LeMBF1/ER24 1 MPMRPTGGLKQDWDPIV LQKPKMKAQDLKDPKIVNQLRAGAQVQTVKIDAGLNKKAAT

LeMBF1b 56 STTLNTRKLDDEDTENLSHQKVPTELKKAIMQARQDKKLTQSOLAQLINEKPQIIQEYESG
LeMBF1c 57 STTLNTRKLDDEDTENLAHQKVPTELKKAIMQARQDKKLTQSOLAQLINEKPQIIQEYESG
LeMBF1a 56 STSLNTRKLDDEDTENLSHEKVPTELKKAIMQARQDKKLTQSOLAQLINEKPQIIQEYESG
LeMBF1/ER24 61 -LAVNVRKLDDEAAEPAALEKIPVDVRQAIQKARIEKKMSQADLAKKINERTQVVAEYENG

LeMBF1b 116 KAIPNQOII SKLERALGAKLRGKK---
LeMBF1c 117 KAIPNQOII SKLERALGAKLRGKK---
LeMBF1a 116 KAIPNQOII SKLERALGAKLRGKK---
LeMBF1/ER24 120 KAVPNQLV L GKMENVLGVKLRGKIHK
    
```

Figure 14. Alignement des séquences protéiques des quatre LeMBF1.

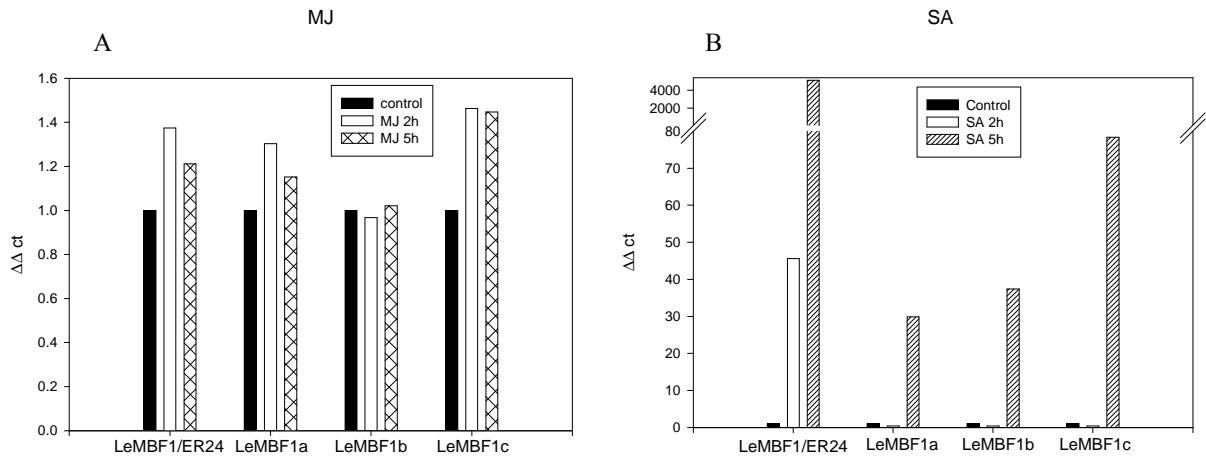


Figure 15. Expression du messenger de LeMBF1/ER24, LeMBF1a, LeMBF1b et LeMBF1c dans des plantes microtom de 5 semaines après traitement par (A) méthyl jasmatate, (B) acide salicylique. Les traitements contrôle furent éthanol pour le méthy jasmonate et eau pour SA.



## Résultats complémentaires

Chez la tomate, les gènes MBF1 forment une famille multigénique d'au moins quatre membres comprenant le gène *LeMBF1/ER24*, isolé comme un gène de réponse à l'éthylène (Zegzouti et al, 1999) et trois autres gènes appelés *LeMBF1a*, *LeMBF1b* et *LeMBF1c* (Tournier et al. 2002).

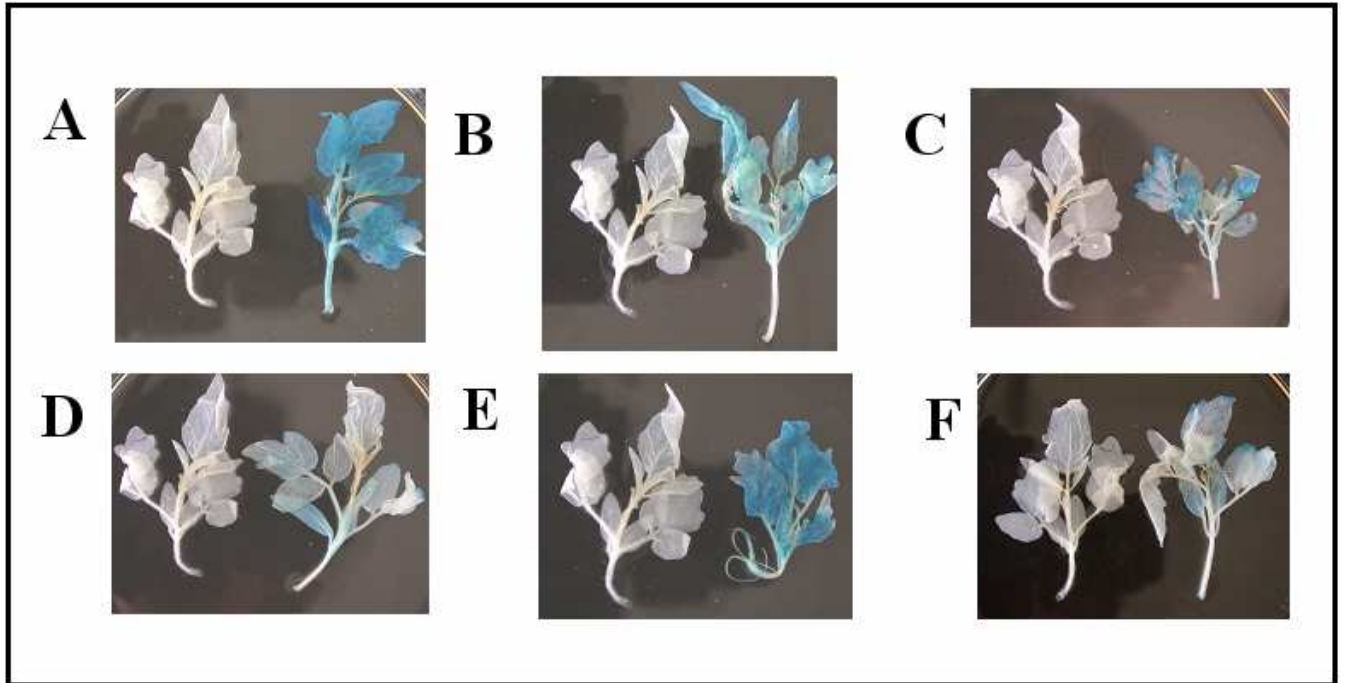
Nous avons comparé les séquences nucléiques et protéiques des quatre MBF1 de la tomate et nous retrouvons une grande similitude entre MBF1a, MBF1b et MBF1c, tandis que MBF1/ER24 présente une forte divergence avec les trois gènes précédents (Fig 14). Cette différence structurale suggère que *LeMBF1/ER24* pourrait avoir une fonction différente de celle des autres *LeMBF1*.

### Etudes complémentaires d'expression

En complément aux études d'expression présentées auparavant dans ce manuscrit, j'ai considéré important de tester l'expression des messagers des quatre *LeMBF1* après traitements à l'acide salicylique (SA) et au méthyl-jasmonate (MJA). Les données obtenues par PCR quantitative montrent que l'expression du messager MBF1c est induite lors du traitement par le MJA alors que MBF1a et MBF1/ER24 présentent une faible expression et aucune expression n'est détectée pour MBF1b.

Cinq heures après application de l'acide salicylique nous observons que la quantité de messagers de MBF1a, MBF1b et MBF1c augmente 50 fois, alors que le messager de MBF1/ER24 augmente son expression de 4000 fois (Fig. 15).

Ce résultat semble confirmer notre hypothèse que les gènes MBF1 jouent un rôle important durant la réponse aux stress et qu'il sont induits par le SA, probablement dans le contexte de la mise en place de mécanismes de défense contre les pathogènes. De plus, la différence d'expression entre *LeMBF1/ER24* et *LeMBF1a*, *LeMBF1b* et *LeMBF1c* suggère que *LeMBF1/ER24* a une fonction différente des autres *LeMBF1*.



**Figure 16.** Expression de LeMBF1/ER24::GUS après différents traitements. A gauche se trouve toujours la plante contrôle. A, 1h à 45°C + 1 h 51° C; B, traitement SA; C, traitement paraquat; D, traitement méthyl jasmonate; E, 2 jours à 4°C; F, blessure.

### **Analyse de l'expression de GUS sous le contrôle du promoteur LeMBF1/ER24 en présence de différents types de stress abiotiques chez la tomate.**

En parallèle aux études d'expression du messenger j'ai décidé de suivre l'expression du gène rapporteur GUS sous le contrôle du promoteur du gène LeMBF1/ER24 pendant différents traitements. Les constructions et les plantes transgéniques exprimant ces constructions ont été générées au laboratoire (Khalil-Ahmad, 2002).

On observe une forte expression GUS après un choc thermique, un stress froid (4°C, température de stress pour la tomate), l'application de SA, de paraquat (un herbicide qui est réduit *in vivo* et qui, durant sa re-oxydation, provoque la formation d'anions superoxyde qui sont convertis en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par la superoxyde dismutase). Une faible expression est observée 2 h après blessure et 5 h après application MJA (Fig.16).

Ces résultats montrent que l'expression de MBF1/ER24 est induite par différents types de stress.

### **Comparaison des promoteurs de LeMBF1/ER24 et LeMBF1a**

Nous avons isolé le promoteur de LeMBF1a (1149 pb) et nous l'avons comparé par le logiciel PlantCare au promoteur de LeMBF1/ER24 qui avait été isolé auparavant dans notre laboratoire (Khalil-Ahmad, 2002). Il est important de remarquer qu'il existe deux fois plus de *cis*-éléments HSE, impliqués dans la réponse au stress thermique, dans le promoteur LeMBF1/ER24 que dans le promoteur LeMBF1a (Tableau1). De même, nous retrouvons plus de *cis*-éléments de réponse à éthylène et à la blessure dans le promoteur LeMBF1/ER24. De plus, nous retrouvons dans le promoteur LeMBF1/ER24 des éléments *cis* impliqués dans la réponse à la sécheresse, qui sont absents dans le promoteur de LeMBF1a (Tableau1).

En revanche, la séquence du promoteur LeMBF1a contient plus d'éléments ABRE que le promoteur LeMBF1/ER24. Dans le promoteur LeMBF1a nous retrouvons des *cis*-éléments de réponse à l'auxine qui n'existent pas dans le promoteur de LeMBF1/ER24. Nous avons aussi remarqué l'existence de *cis* éléments impliqués dans la réponse au MJA dans les deux promoteurs.

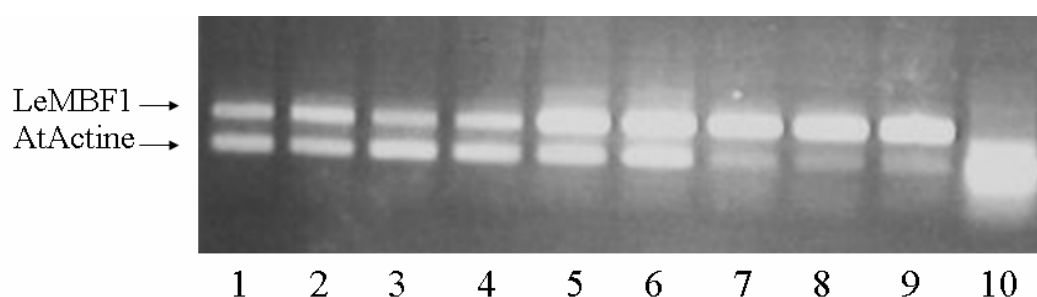
**Tableau 1 Analyse de la séquence promotrice de MBF1a et MBF1/ER24**

## Analyse du promoteur LeMBF1a

Nom élément	Fonction	No de fois présent
<u>AuxRR-core</u>	Elément régulateur de la réponse à l'auxine	1
<u>ABRE</u>	Elément de réponse acide absissique	5
<u>CE1</u>	CIS élément associé au ABRE, réponse acide absissique	1
<u>TCA-element</u>	Cis élément de réponse acide salicylique	4
<u>WUN-motif</u>	Elément de réponse à la blessure	11
<u>ERE</u>	Elément de réponse à l'éthylène	4
<u>HSE</u>	Cis élément de réponse choc thermique	6

## Analyse du promoteur LeMBF1/ER24

Nom élément	Fonction	No de fois présent
<u>ABRE</u>	Cis élément réponse acide absissique	1
<u>CGTCA-motif</u>	Cis élément de la réponse à MeJA	2
<u>ERE</u>	Cis Elément de réponse à l'éthylène	6
<u>HSE</u>	Cis élément de réponse choc thermique	24
<u>MBS</u>	Site d'union MYB impliqué dans sécheresse	2
<u>TCA-element</u>	Cis élément de réponse à l'acide salicylique	5
<u>WUN-motif</u>	Cis élément de réponse à la blessure	13



**Figure 17.** RT-PCR réalisées avec des amorces spécifiques de chacun des gènes MBF1 de tomate sur les différentes lignées homozygotes surexprimant *LeMBF1a* (1-3), *LeMBF1b* (4-5), *LeMBF1c* (6-8) ou *LeMBF1/ER24* (9). La piste 10 est le contrôle non-transformé.

Ces données comparatives des deux promoteurs qui montrent que les deux gènes MBF1 possèdent des éléments régulateurs distinctifs sont en conformité avec la régulation différentielle de cette famille multigénique trouvée chez la tomate. Ces résultats associés à ceux issus des études d'expression suggèrent que les gènes MBF1 pourraient être impliqués dans des processus différents de développement et de réponse aux facteurs de l'environnement. Dans cette hypothèse, les MBF1 pourraient jouer un rôle d'aiguillage pour la canalisation sélective de certaines voies de signalisation vers l'activation de gènes spécifiques associées à des processus de développement particuliers.

### **Sur-expression de *LeMBF1a*, *LeMBF1b*, *LeMBF1c* et *LeMBF1/ER24* chez *Arabidopsis thaliana***

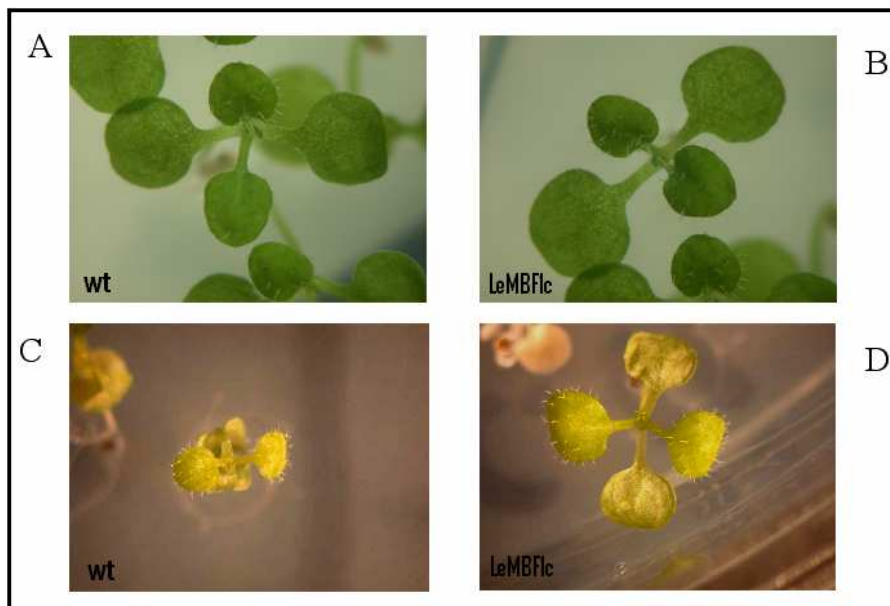
Des études antérieures à notre travail ont montré qu'il n'existe pas de phénotype apparent associé à la sur ou sous-expression de *LeMBF1/ER24* chez la tomate. Nous avons donc décidé de transformer des plantes d'*Arabidopsis thaliana* surexprimant chacun des quatre gènes MBF1 de tomate.

Dans un premier temps nous avons vérifié par RT-PCR la surexpression du transgène dans les lignées homozygotes obtenues par transformation d'*Arabidopsis* avec les quatre gènes *LeMBF1* (Fig.17).

L'analyse des lignées transgéniques obtenues indique que par rapport aux plantes sauvages, les plantes surexprimant les gènes *LeMBF1* ne présentent pas de phénotype apparent touchant le développement. Cependant, guidés à la fois par les résultats d'expression et par l'importance des MBF1 comme protéine protectrice chez *Drosophila* lors de stress oxydatifs (Jindra *et al.* 2004) nous avons recherché des phénotypes induits en relation avec la réponse aux stress. Pour cela nous avons réalisé différents traitements connus pour déclencher chez la plante un stress oxydatif : choc thermique, paraquat, UV et congélation. Ces stress ont été appliqués à des plantules de 8 jours.



**Figure 18.** Plantules d'Arabidopsis de 8 jours WT (à gauche) ou surexprimant le gène *LeMBF1c* (à droite) traitées avec du paraquat 40  $\mu$ M.



**Figure 19.** Plantules de 13 jours non traitées (A et B) ou traitées à 48°C pendant 45 min (C et D). A et C sont des plantes sauvages et B et D des plantes surexprimant *LeMBF1c*.

Il faut signaler en premier lieu que les conditions expérimentales des stress UV et congélation n'ayant pas pu être maîtrisées au laboratoire, les résultats correspondant à ces expériences ne sont pas présentés ici. Nous présentons uniquement les résultats des traitements relatifs au choc thermique et au paraquat car ces expériences ont été répétées plusieurs fois et ont donné des résultats reproductibles.

L'analyse montre que la surexpression des MBF1 de tomate dans la plante modèle *Arabidopsis* entraîne une tolérance accrue au paraquat quelque soit le gène considéré. Toutefois, les plantes surexprimant le gène *LeMBF1c* présentent un niveau de tolérance significativement plus élevé *LeMBF1c* (Fig.18).

Nous avons mentionné plus haut (voir chapitre 2 – article 1) que les plantes transformées avec *LeMBF1/ER24* et *LeMBF1c* sont plus tolérantes que les plantes contrôles à un choc thermique de 45 min à 48°C. Nous avons ajoutons à ce résultat que trois jours après le choc thermique, les plantes transformées avec *LeMBF1/ER24* et *LeMBF1c* étaient plus développés que les plantes contrôles ayant subi le même traitement (Fig.19), ce qui suggère que la surexpression de ces gènes confère une résistance ou permet une récupération plus rapide face au stress subi. Ces résultats confirment l'importance des MBF1 pour la réponse à un stress thermique chez les plantes.





## **Chapitre 3**

# **ERF2, Un facteur de transcription de la famille AP2/ERF impliqué dans la réponse à l'éthylène et la germination des graines chez la tomate**



## Chapitre 3

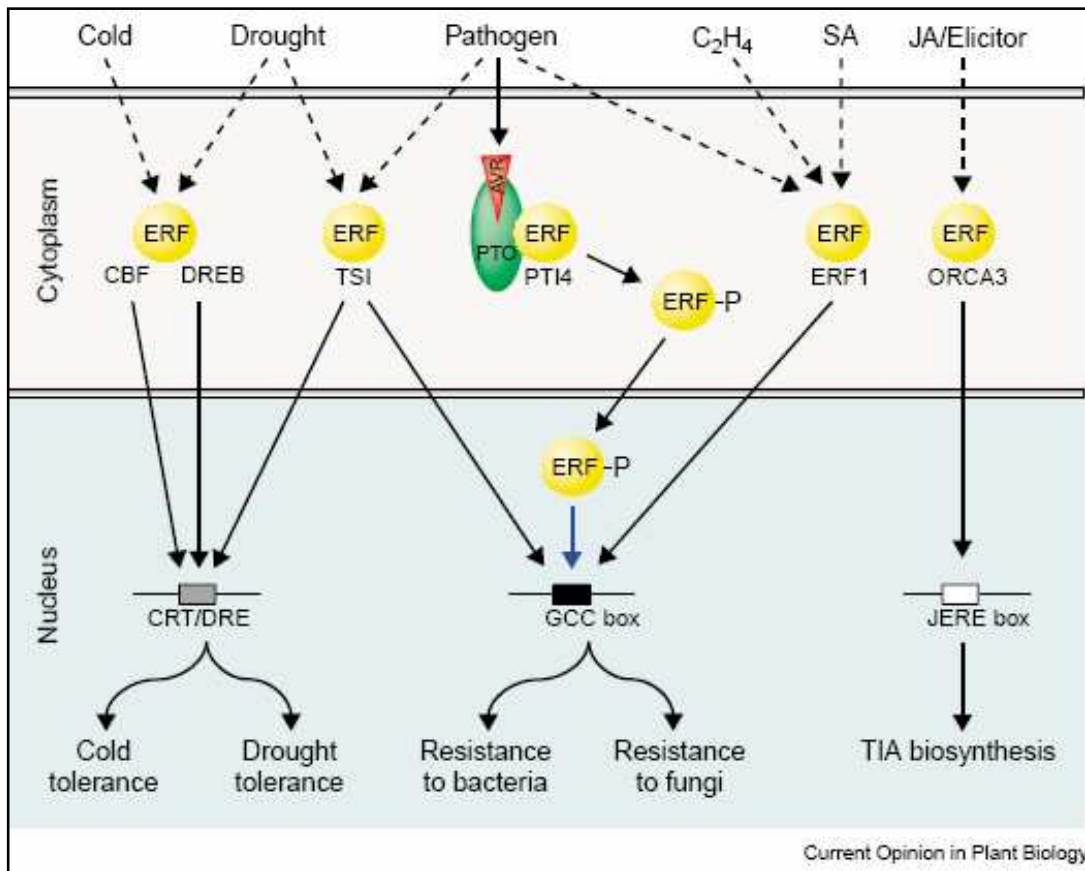
### **ERF2, Un facteur de transcription de la famille AP2/ERF impliqué dans la réponse à l'éthylène et la germination des graines chez la tomate**

---

#### **Les facteurs de transcription ERF**

Les protéines « ethylene responsive factors » ERF (Ohme-Takagi et Sinshi, 1995) appartiennent à une des plus grandes familles de facteurs de transcription connue, la famille des protéines AP2/ERF (APETALA2/ERF) qui compte plus de 70 membres chez *Arabidopsis* (Riechmann *et al.*, 2000). Ce groupe de protéines se caractérise par la présence d'un domaine de fixation à l'ADN spécifique des plantes supérieures, appelé domaine ERF, composé de 58 à 59 acides aminés. Les ERF se lient à l'ADN sous forme monomérique.

Le domaine ERF est similaire au domaine APETALA2 caractérisé dans le gène d'*Arabidopsis* APETALA2 (Jofuku *et al.*, 1994). Ces deux domaines ont des homologies de séquence significatives et acquièrent probablement la même structure tridimensionnelle. Cependant, certains des acides aminés du domaine ERF impliqués dans les interactions avec l'ADN ne sont pas conservés dans le domaine APETALA2 (Allen *et al.*, 1998; Nole-Wilson et Krizek, 2000). Les protéines du type ERF2, à la différence des protéines du groupe APETALA2 qui possèdent deux domaines de fixation à l'ADN tandis que les ERF ne présentent qu'un seul domaine.



**Figure 20.** Schéma résumant les données disponibles concernant la participation des membres de la famille des ERF à différentes voies de signalisation chez les plantes. D'après Singh *et al.*, 2002

Les protéines ERF sont considérées comme les derniers acteurs de la voie de transduction de l'éthylène. Il a été montré que le facteur de transcription EIN3, appartenant à la voie de régulation de l'éthylène, interagissait directement avec le promoteur du gène ERF1 chez *Arabidopsis* (Solano *et al.*, 1998). Par ailleurs il a été également démontré que la protéine ERF1 interagit spécifiquement avec une séquence conservée appelée la boîte GCC (TAAGAGCCGCC) identifiée initialement dans les promoteurs de gènes codant pour des protéines PR basiques (Pathogenesis Related Proteins) et retrouvée chez plusieurs gènes de réponse à l'éthylène (Ohme-Takagi et Shinshi 1995 ; Kitajima et Sato, 1999). Certains de ces gènes sont aussi régulés par le méthyl-jasmonate. Au sein de la famille des ERF, certaines protéines fonctionnent comme des régulateurs positifs de la transcription et d'autres comme des régulateurs négatifs (Ohta *et al.*, 2000; Fujimoto *et al.* 2000 ).

Les protéines ERF sont régulées par l'éthylène mais il ressort de plusieurs études qu'elles participent aussi au contrôle transcriptionnel associé à d'autres voies de signalisation hormonales (Fig. 20). Un nombre de plus en plus croissant d'études décrivent la régulation des ERF par une variété de signaux tel que le jasmonate, l'ABA, le NaCl (Zhang *et al.*, 2004 ; Finkelstein *et al.*, 1998) , l'acide salicylique (Gu *et al.*, 2000), blessure (Tournier *et al.*, 2003) et les stress biotiques (Brown *et al.*, 2003; Fujimoto *et al.*, 2000 ; Lorenzo *et al.*, 2003 ; Onate-Sanchez et Singh, 2002).

Il a été aussi démontré que les ERF participent au système de défense des plantes (Chakravarthy *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 1997, Thara *et al.*, 1999, Cheong *et al.*, 2003; Brown *et al.*, 2003) à la tolérance au stress osmotique (Park *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2004) et dans la germination et sa relation avec l'ABA (Finkelstein *et al.*, 2002; Song *et al.*, 2005).



***Article 2***

---

**LeERF2, a tomato Ethylene Response Factor involved in ethylene response and seed germination.**





**LeERF2, a tomato Ethylene Response Factor involved in ethylene response and seed germination.**

Pirrello J<sup>1</sup>., Jaimes-Miranda F<sup>1</sup>., Sanchez-Ballesta MT, Tournier B., Khalil-Ahmad Q, Latche A, Pech J.C., Regad F. and Bouzayen M.

<sup>1</sup>*These authors contributed equally to this work.*

**ABSTRACT**

Ethylene Response Factors (ERFs) are plant transcriptional regulators mediating ethylene-dependent gene expression via binding to the GCC motif found in the promoter region of ethylene-regulated genes. We report here on the structural and functional characterisation of the tomato *LeERF2* gene that belongs to a distinct class of the large ERF gene family. Two versions spliced and unspliced, of *LeERF2* transcripts were amplified from RNA samples and the search in the public tomato EST database confirmed the existence in a number of cDNA libraries of two transcript species. The unspliced transcript contains two ORFs yielding two hypothetical proteins, a small highly truncated one lacking the AP2 domain and a bigger protein lacking the N-terminal MCGAAIL consensus peptide specific to ERF members from subfamily IV. Nevertheless, functional *LeERF2* protein may only derive from spliced transcripts since, depending on the tissue, the level of the spliced transcript is extensively higher than that of the unspliced one. *LeERF2* is expressed in all plant tissues tested though its transcript accumulates preferentially in germinating seeds and ripening fruit. Over-expression of the *LeERF2* gene in transgenic tomato lines results in premature seed germination and causes altered ethylene response as assessed by enhanced hook formation of dark-grown seedlings. Noteworthy, the exaggerated hook phenotype is abolished when ethylene perception is blocked, strongly suggesting that *LeERF2* requires other ethylene-dependent components to impact the hook formation process. The expression of the *mannanase2* gene is up-regulated in *LeERF2* over-expressing seeds suggesting that *LeERF2* stimulates seed germination through the induction of the *mannanase2* gene.

## INTRODUCTION

Ethylene is an important phytohormone involved in many plant developmental processes. Notably, this plant hormone is involved in germination, fruit ripening, abscission and senescence (Abeles *et al.*, 1992). Currently, the last, known, actors of the ethylene pathway are the ethylene response factors (ERF) (Ohme-Takagi and Sinshi, 1995). ERFs belong to the large AP2/ERF family of transcription factors specific to plants and which accounts more than 70 genes in *Arabidopsis thaliana* (Riechmann *et al.*, 2000). Proteins encoded by this family have a highly conserved DNA binding domain known as AP2 domain made of 58 to 59 amino acids involved in the high affinity binding to the target DNA sequences (Allen *et al.*, 1998). The ERF proteins specifically bind the so-called GCC box with a strictly conserved GCCGCC core domain to modulate transcription of genes harbouring this type of *cis*-elements on their promoter like PDF1.2 or NtChitinase (Ohme-Takagi, *et al.* 1995, Gu *et al.*, 2002). It's known that ERF genes are not only induced by ethylene but can also respond to jasmonate, abscissic acid, NaCl (Zhang *et al.*, 2004 ; Finkelstein *et al.*, 1998), salicylic acid (Gu *et al.*, 2000), wounding (Tournier *et al.*, 2003) and biotic stress (Brown *et al.*, 2003; Fujimoto *et al.*, 2000 ; Lorenzo *et al.*, 2003, Onate-Sanchez and Singh, 2002).

It was reported recently that tomato ERFs belong to four distinct classes and expression analyses revealed that representatives from each class display differential pattern of expression in a tissue and developmental-specific manner (Tournier *et al.*, 2003). In particular, LeERF2 shows a ripening and wound-associated expression while its transcript accumulation was unaffected by ethylene treatment. LeERF2 belongs to ERF class 4 and its encoded protein is characterized by the presence of a conserved short N-terminal domain (MCGGAIL/L) of unknown function (Tournier *et al.*, 2003).

ERFs have been shown to be involved in normal and abnormal plant developmental processes such as plant defence (Chakravarthy *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 1997, Thara *et al.*, 1999, Cheong *et al.*, 2003; Brown *et al.*, 2003), osmotic stress tolerance (Park *et al.*, 2001; Zhong *et al.*, 2004) and seed germination (Finkelstein *et al.*, 1994; Song *et al.*, 2005). Seed germination is the initial step of the plant life cycle which allows the embryo to develop into seedlings. In many plant species, germination is preceded by dormancy which is known to be maintained by ABA (Hilhorst *et al.*, 1995) while GA is required for breaking dormancy and inducing germination (Dadeajon and Koorneef, 2000; Karsen *et*

*al.*, 2003). Germination is characterised by radicle protrusion as a result of weakening of the region of the endosperm enclosing the radicle tip, termed the endosperm cap (Groot and Karsen, 1987). The ABA-insensitive Arabidopsis mutant *abi4* affected in seed germination displays altered expression of seed-specific genes (Finkelstein *et al.*, 1994) and the *abi4* mutation is caused by a single pair deletion within an *APETALA2* gene (Finkelstein *et al.*, 1998). While it is known since a long time that ethylene impacts seed germination it was demonstrated only recently that ERFs are involved in ethylene-dependent regulation of seed germination (Song *et al.*, 2005). It was reported that AtERF7 acts as a transcriptional repressor of ABA response and that transgenic Arabidopsis lines expressing RNAi construct targeted to down-regulate the AtERF7 gene are more sensitive to ABA and germinate later than the WT seeds.

However, direct evidences for the involvement of ERFs in the seed germination process are still scarce. In the present study, we report that over-expression of the *LeERF2* gene in transgenic tomato lines results in premature seed germination and causes altered ethylene response as assessed by the triple response. Moreover, our data suggest that *LeERF2* may stimulate seed germination through the activation of *LeMan2* gene encoding mannanase.

## METHODS

### Plant material

Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seed from wild-type (microtom) plants were used in this study. Plants growth in green house under the following conditions: 10h of light at 25°C and 70% of hygrometry, 14h of dark at 70% of hygrometry.

### Germination assay

Seeds were collected from wild type and transgenic tomato fruits at the orange stage, washed abundantly with water and dried quickly on paper in ventilated area. For germination, 100 tomato seeds were placed in Petri dishes on one layer of filter papers moister with 10 ml of water and incubated at 25°C in the dark. For hormone treatments,

seeds were imbibed in the presence of 1, 10 or 100 $\mu$ M ABA. Germination was measured as root protrusion.

### **Plant transformation**

A sense construct consisting of the full length coding sequence of LeERF2 (from ATG to stop codon) was introduced into tomato plants under the transcriptional control of the cauliflower mosaic virus 35S (CaMV 35S) promoter and the nopaline synthase (NOS) terminator using the pGA643 binary vector. *A. tumefaciens*-mediated transformation was carried out on the tomato variety *microtom* according to (Jones *et al.*, 2002) with minor changes: 6 days old cotyledons were used for the transformation; the duration of subcultures for shoot formation was reduced to 15 days; and the kanamycin concentration was increased to 70 mg.L<sup>-1</sup>. Regenerated plants (F0) were grown and screened by sowing seeds on MS/2 with 70 mg.L<sup>-1</sup> kanamycin. All further experiments were carried out using homozygote lines F3 or later generations. We chose the lines S28 and S88 for our experiments because they were the lines where LeERF2

### **Isolation of promoter**

Promoter of LeERF2 was isolated with the genome walker kit (clontech) according to instruction of society.

### **Quantitative PCR**

RNA was extracted by phenol-chloroform method. Extraction has been done at different time of imbibitions: 0, 6, 24, 36, 48h before root protrusion. cDNA synthesis has been done by omniscrypt kit (Quiagen) according to society. We used 7900HT ABI PRISM from Applied Biosystem to do real time PCR. We used SYBR green from Applied Biosystem as PCR product marker.

Primers used for real time PCR are the following:

To amplify LeMan2:

LeMAN2-1178F: GAATTGGGAAAAAATCCATCCA

LeMAN2-1235R: TCATGGCATGAGACTGACTTGTAAT

To amplify LeERF2\_intron:

LeERF2\_I\_219F: TCGACCCTCTACAGGTACTAGTTAATCATATATA

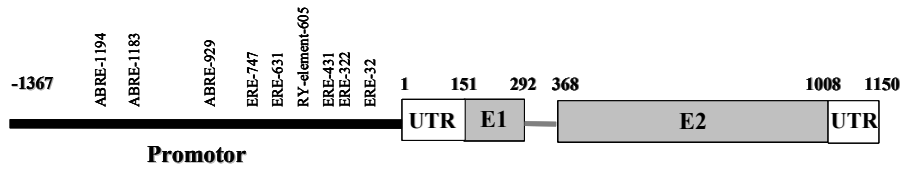
LeERF2\_I\_322R: TTCATCTGCTCACCACCTGTTT

To amplify LeERF2 without intron:

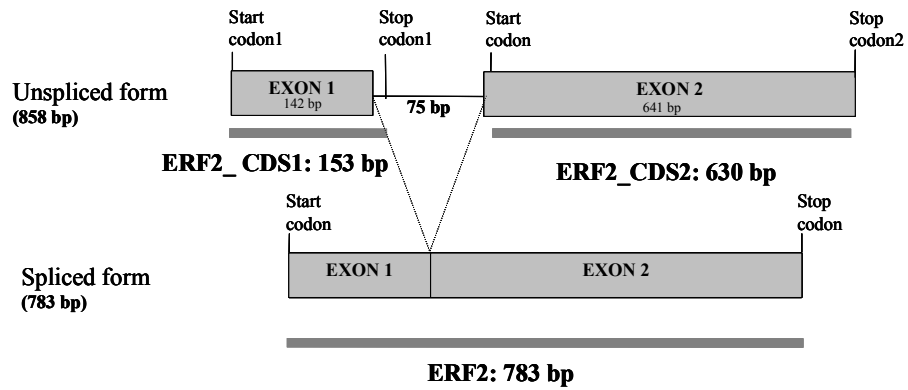
LeERF2\_184\_F: GTTCCTCTCAACCCCAAACG

LeERF2\_236\_R: TTCATCTGCTCACCACCTGTAGA

**A**



**B**



**Fig. 1** Structure of the *LeERF2* gene. (A) Genomic structure of the tomato *LeERF2* (AAO34704) gene. Black line represent the promoter, gray line represent the intron, gray portions represent the exons, and white portions represent the untranslated region. (B) Gene structure of *LeERF2* Unspliced and spliced forms. Gray portions represent the exons and black line the intron, gray lines represent complete open reading frames.

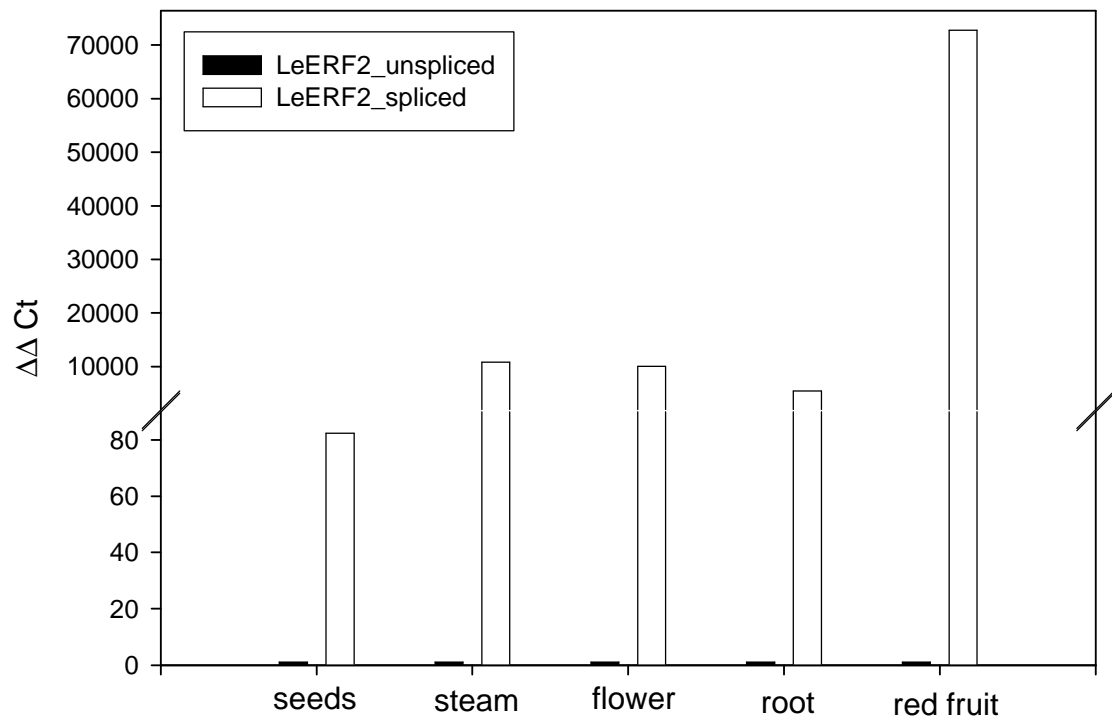
## RESULTS

### ***Structure of the LeERF2 gene***

The tomato *LeERF2* gene belongs to a new class of ethylene response factor capable to bind the GCC box found in the promoter of ethylene responsive genes. In order to gain larger information on the structure of the *LeERF2* gene, a 2517 bp genomic fragment was isolated and fully sequenced allowing to delineate the promoter region (1367 bp) and the transcribed region (1150 bp). The isolated gene is composed of two exons and one intron and contains an ORF of only 783 pb long. As shown in figure 1, the first exon starts at nucleotide 151 and ends at 292 and the second exon encompasses the region from nucleotide 368 to 1150. Upstream of the first exon there is a 5'UTR of 150 bp and downstream of the second exon a 3'UTR of 141 bp. The *LeERF2* gene contains a single, small sized intron of 75 bp (figure 1a). The closest Arabidopsis homolog of *LeERF2* is *AtEBP* (AT3G16770.1) which also contain a single intron though of a larger size (237 bp). *LeERF2* and *AtEBP* encoded proteins display 52% identity and 64% similarity.

### ***Isolation and characterization of the Le ERF2 promoter***

A 2517 bp DNA fragment corresponding to the tomato *LeERF2* genomic clone was isolated. This genomic clone containing a 1367 bp fragment upstream of the transcription site corresponding to the promoter region of the *LeERF2* gene that is likely to harbor most regulatory elements necessary for driving transcription of the gene. *In silico* analysis of the promoter performed by PlantCare software (<http://intra.pst.ugent.be:8080/plantCARE/>) identified three putative ABA-Response-Elements (ABRE) containing the consensus sequence GTACGTGGCGC lying at positions -929, -1183 and -1194 (Figure 1a). A putative regulatory element, known as RY-element, found in the promoter region of seed-specific regulated genes, was also identified at position -605. Finally, at least five putative ethylene-responsive elements were found at positions -747, -631, -431, -322 and -32 positions (Figure 1a).

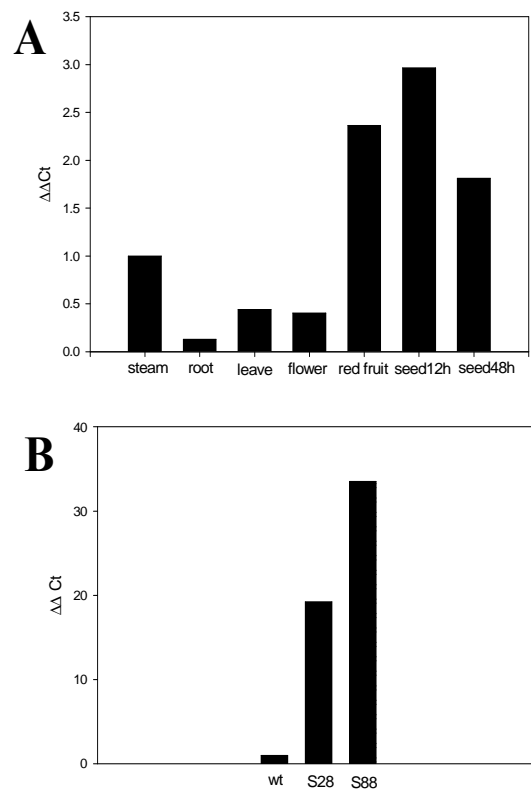




***Tomato LeERF2 gene undergoes alternative splicing***

Two LeERF2 transcripts were detected and the corresponding cDNAs cloned and sequenced. The presence of the intronic region in one of these mRNA species raises the possibility that LeERF2 undergoes alternative splicing (Figure 1b). The search in the tomato EST database (sgn.cornell.edu) identified a number of contigs (SGN-E375112, SGN-E378950, SGN-E377694, SGN-E258222, SGN-E233294, SGN-E231194) that contain the intron region confirming the co-existence of spliced and unspliced versions of LeERF2 transcripts and suggesting that alternative splicing may play a role in controlling the expression of the LeERF2 gene. Sequence analysis of the unspliced LeERF2 transcript revealed two putative “Stop codons”, the first one being located in the intron region at position 153 from the “Start codon” and the second at position 858. Two proteins can be therefore derived from this transcript, (i) a low molecular weight (5.507 kDa) peptide of 50 amino acids and, (ii) a higher molecular weight protein (209 amino acids and 24.006 kDa). Compared to the protein derived from the spliced version of LeERF2 transcript, the short putative protein corresponds to the N-terminal part lacking the AP2 domain while the biggest one corresponds to a large C-terminal moiety containing the AP2 domain but lacking the N-terminal MCGAAIL consensus peptide specific to members of subfamily IV of the ERF gene family (Figure 1b).

In order to assess the importance of the two versions of the LeERF2 transcripts, we performed a comparative analysis of the accumulation of the spliced and unspliced version of LeERF2 transcripts. Specific primers allowing to discriminate between the two mRNA species were used in quantitative RT-PCR experiment with RNA samples extracted from different plant tissues. Figure 2 shows that accumulation of LeERF2 spliced transcript is 40 to 16000 times higher than that of the unspliced version suggesting that the spliced version accounts for most of the LeERF2 transcripts in all tissues tested. Hence, because it is more likely that functional LeERF2 protein only derives from the spliced transcript, we decided to target this type of transcript in subsequent expression studies described here after.



**Fig. 3** Expression pattern of *LeERF2*. (A) Tissue-specific expression of *LeERF2* in tomato. The levels of *LeERF2* transcripts were assessed by real-time quantitative PCR. The experiments were carried out in triplicate. mRNA accumulation was monitored in steam, root, leaf, flower, red fruit (69 days post anthesis) ungerminated seed after 12 and 48h of imbibition.  $\Delta\Delta Ct$  on the refers to the fold difference in *LeERF2*, expression relative to steam. (B) Overexpression of *LeERF2* mRNA in tomato seeds. The levels of *LeERF2* transcripts were assessed by real-time quantitative PCR.  $\Delta\Delta Ct$  refers to the fold difference in *LeERF2* expression relative to WT.

***LeERF2* is mainly expressed in ripening fruit.**

Quantitative RT-PCR analyses revealed ubiquitous expression of *LeERF2*. Its transcripts were detected in all plant tissues tested even though they accumulate preferentially in germinating seeds and ripening fruit (Figure 3a). *LeERF2* transcript accumulation is the lowest in roots. In order to get better insight on the expression of *LeERF2* in the seeds and test whether it is associated with germination, we assessed its transcript accumulation in seeds treated ABA. Figure 3b shows that the seed-associated expression of *LeERF2* is dramatically reduced when seed germination is inhibited by exogenous ABA treatment.

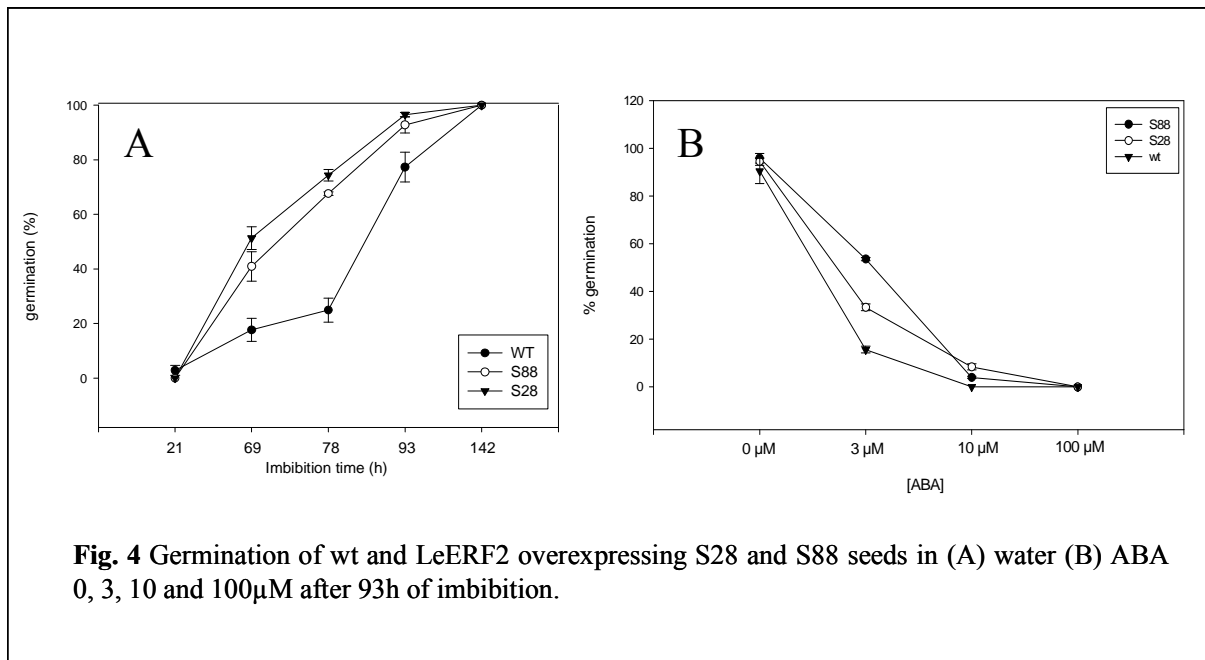
***Over-expression of LeERF2 results in enhanced ethylene sensitivity and premature seed germination.***

In an attempt to unveil the physiological significance of *LeERF2* and to better explore its role in seed germination, we generated tomato lines under- and over-expressing this gene by stably transforming the tomato plants with either an antisense or a sense construct under the control of the S35 constitutive promoter. A number of homozygous transgenic lines corresponding to independent transformation events were obtained and analysed. No visible phenotype could be detected in any of the *LeERF2*-suppressed lines which may be due to functional redundancy among ERF genes. By contrast, *LeERF2*-expressing lines, showed visible phenotypes associated with seed germination and ethylene response. Two transgenic lines S28 and S88 showing 19 and 33 times the highest accumulation of *LeERF2* transcript, respectively, were selected for subsequent studies (Figure 3).

Hook formation in the seedlings is one component of the typical triple response displayed by dark-grown seedlings in response to the plant hormone ethylene. Compared to wild type, dark-grown over-expressing lines exhibited exaggerated apical hook formation in the absence of exogenous ethylene treatment. Table 1 shows that only 15% of wild type seedlings exhibit complete hook formation when grown in the dark whereas this proportion increases up to 32% and 35% for S28 and S88 over-expressing lines, respectively. Furthermore, hook formation is completely abolished in the presence of 1-MCP, a potent inhibitor of ethylene perception (Table1). While these data strongly suggest that *LeERF2* is involved in hook formation, it also indicates that *LeERF2* requires other ethylene-dependent components to impact this developmental process.

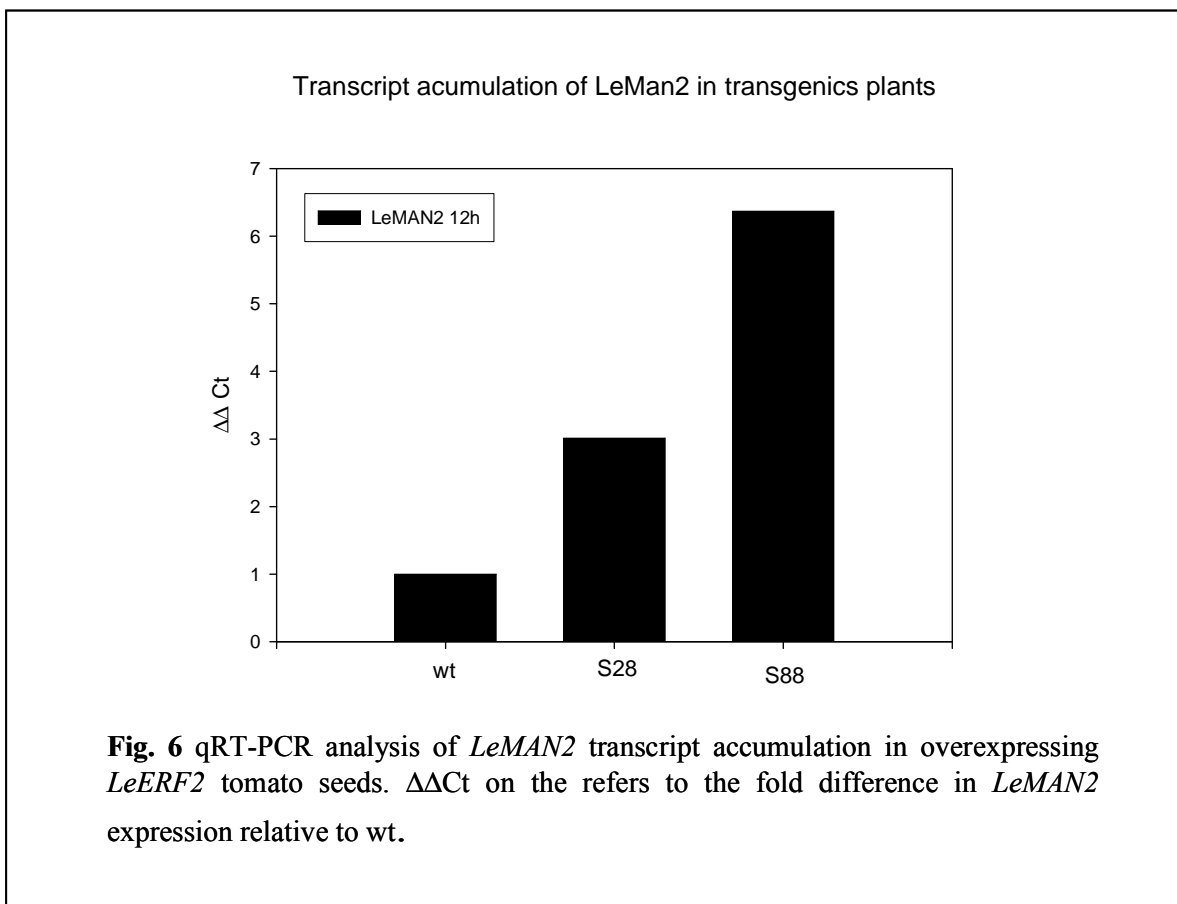
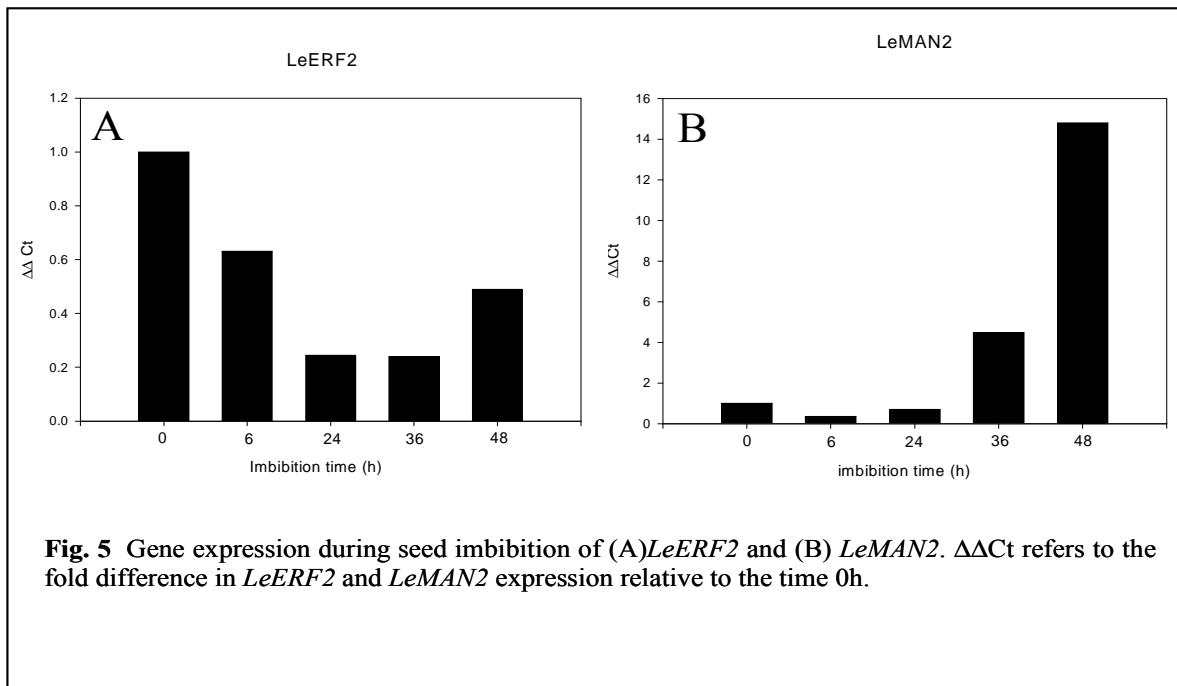
**Table1.** Complete hook formation ( 270°-360°) of wt and sens LeERF2 etiolated seedlings untreated or treated with MCP.

	AIR		MCP	
	%	SD	%	SD
wt	15	1.7260	0	0
S88	32	5.8926	3	2.12
S28	35	2.0506	0	0



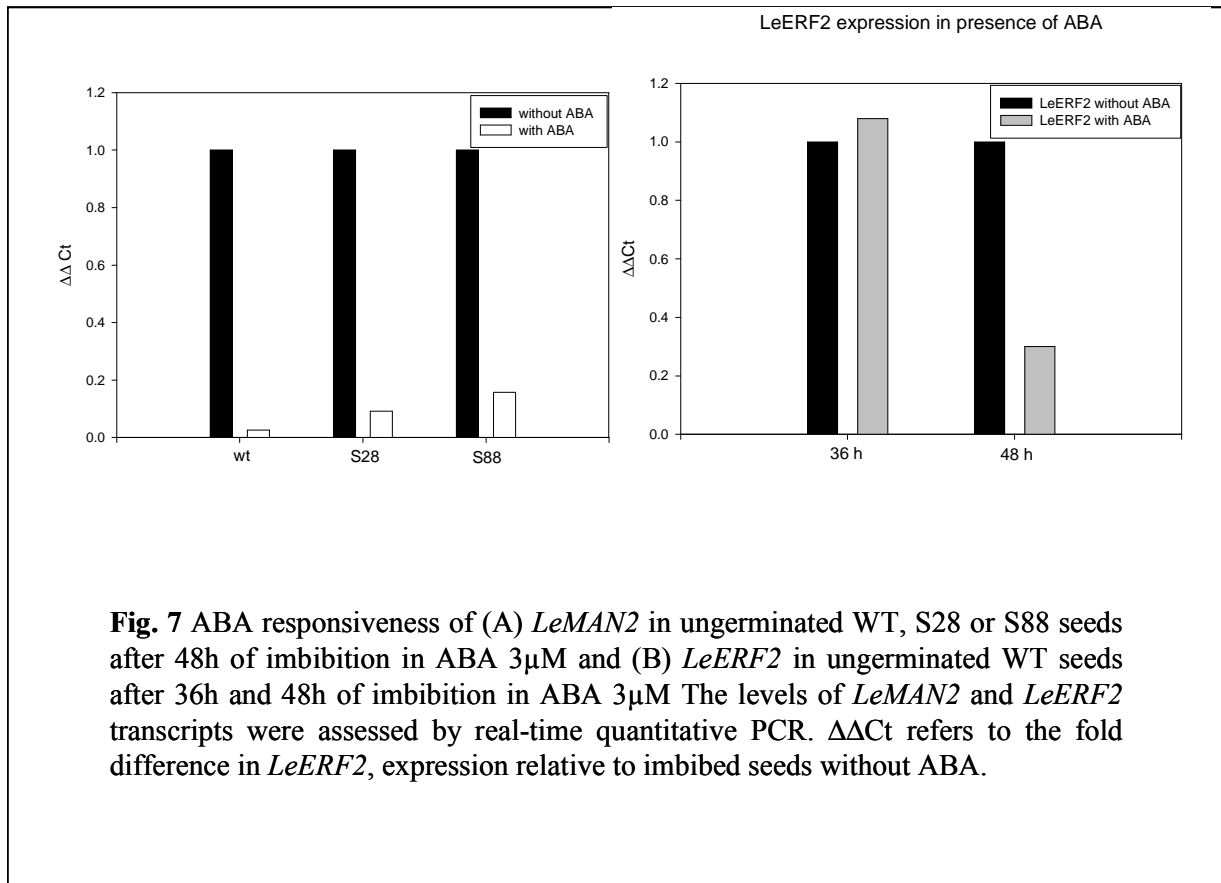
***LeERF2 is involved in seed germination***

Considering the presence of RY-element and ABRE in the promoter, we assessed the effect of over-expressing the *LeERF2* gene on seed germination. Figure 4a shows that both S28 and S88 lines displayed early germination compared to wild type. Indeed, for S28 and S88 over-expressing lines, up to 72% and 66% of the seed, respectively, germinated after 78 hours imbibition in water while only 25% in wild type seeds germinated. Figure 4a also indicates that the higher germination capacity cannot be due to a lower germination potential of wild type seeds since after 142 hours, 100% of both transgenic and wild type seeds successfully germinated. These data strongly suggest that *LeERF2* is involved in the seed germination process. To test whether *LeERF2* over-expression is capable to overcome the typical ABA-inhibition of seed germination, we assessed the effect of this hormone on the germination of transgenic seeds. Figure 4b shows that in the presence of 3  $\mu$ M ABA 85% of wild type seeds failed to germinate while in the same condition, S88 and S28 transgenic seeds retained higher germinating capacity with 55% and 32 % of the seeds undergo successful germination, respectively (Figure 4b). However, higher ABA concentrations resulted in almost complete inhibition of germination of both wild type and *LeERF2*-expressing seeds.



In order to gain better insight on the mechanism by which *LeERF2* impacts seed germination we assessed its transcript accumulation during this process. Considering that *LeERF2* can give rise to two different transcripts, primers were designed to exclusively target the spliced mRNA in all quantitative RT-PCR experiments. Figure 5a shows that *LeERF2* transcript accumulation in germinating seeds decreases after 24 h imbibition and then increases from 48 hours, coincident with the start of the germination process (see figure 4). We also assessed the accumulation of the tomato *mannanase2* transcript (*LeMAN2*), a gene considered as a marker of seed germination (Nonogaki *et al.* 2000). In wild type seeds, the level of *LeMAN2* transcript decreases slightly after 6 hour of imbibition in water and then undergoes dramatic increase reaching 15 times its initial level after 48 hours imbibition (figure 5b). We then assessed the level of *LeMAN2* transcript in *LeERF2* over-expressing lines in order to uncover putative correlation between the expressions of the two genes. Data obtained by quantitative RT-PCR reveal substantial accumulation of *LeMAN2* transcripts in 12-hour-imbibed *LeERF2*-expressing seeds. The level of *LeMAN2* transcripts in S28 and S88 was 3 and 6 times higher than wild type, respectively (Figure 6) clearly indicating that the *LeMAN2* gene is up-regulated in the over-expressing lines and hence, suggesting that the premature germination of the transgenic seeds may result from the up-regulation of *LeMAN2*.

To further explore whether the *LeMAN2* gene is under direct regulation by *LeERF2* and in order to address whether seed germination is dependent on the expression the *mannanase2* gene, we assessed its expression in wild type and transgenic seeds upon ABA treatment. Figure 7 indicates that accumulation of *LeMAN2* transcripts completely collapses in the presence of 3  $\mu$ M ABA in both wild type and *LeERF2* over-expression lines. However, the ABA-induced inhibition of the *mannanase2* gene ranges from 39 times in wild type to 11 and 6 times in S28 and S88 transgenic lines, respectively (Figure 7a). As a result, the level of *LeMAN2* transcript in transgenic seeds remains significantly higher than that in wild type which may explain the residual germination capacity retained by S88 and S28 lines (see figure 4b). In wild type germinating seeds, ABA treatment strongly reduces the expression of the *LeERF2* gene only at 48 h imbibition but not at earlier stage of germination (Figure 7b).



**Fig. 7** ABA responsiveness of (A) *LeMAN2* in ungerminated WT, S28 or S88 seeds after 48h of imbibition in ABA 3 $\mu$ M and (B) *LeERF2* in ungerminated WT seeds after 36h and 48h of imbibition in ABA 3 $\mu$ M. The levels of *LeMAN2* and *LeERF2* transcripts were assessed by real-time quantitative PCR.  $\Delta\Delta Ct$  refers to the fold difference in *LeERF2*, expression relative to imbibed seeds without ABA.



## DISCUSSION

ERF proteins are defined as a large family of transcription factors involved in ethylene-mediated regulation of gene expression (Ohme-Takagi and Shinshi 1995). We have described previously four new members of the ERF gene family in the tomato and showed that among these, *LeERF2* exhibits ripening-associated pattern of expression (Tournier et al. 2003). We report here that *LeERF2* is involved in ethylene-dependent developmental processes such as apical hook formation and seed germination. The tomato *LeERF2* gene is composed of two exons and a single, small sized intron of 75 bp (figure 1a) like its Arabidopsis homolog *AtEBP* which also contains a small intron of 237 bp. Two *LeERF2* transcript versions, spliced and unspliced are detected and the search in the tomato EST database (sgn.cornell.edu) confirmed the existence of the two mRNA species suggesting that alternative slicing may play a role in controlling the expression of the *LeERF2* gene. However, the unspliced *LeERF2* transcript is unlikely to give rise to functional proteins since it contains two ORFs that could yield two truncated proteins, one corresponding to the N-terminal part that lacks the AP2 domain and the second one corresponding to the C-terminal part which lacks the N-terminal MCGAAIL consensus peptide specific to members of subfamily IV of the ERF gene family (Figure1b). Moreover, depending on the tissue tested, the abundance of spliced *LeERF2* transcripts is 40 to 16000 times higher than that of the unspliced one and therefore accounts for most of *LeERF2* derived transcripts. Taken together these data suggest that functional *LeERF2* proteins are likely to derive only from the spliced transcript.

The *LeERF2* promoter region harbor a number of putative *Cis*-regulatory elements among which three ABA-Response-Element (ABRE) a RY-element found in seed-specific regulated genes (Fujiwara *et al.* (1994) and five putative ethylene-responsive elements. The presence of these regulatory elements suggests a role for *LeERF2* these developmental processes. In order to address the physiological significance of the *LeERF2* gene up and down-regulated transgenic tomato lines were generated and analysed. Noteworthy, none of the *LeERF2*-suppressed lines showed any visible phenotype which may result from functional redundancy among ERF genes. By contrast, consistent with the presence of the RY and ERE *cis*-elements in the promoter region of the *LeERF2* gene, over-expressing lines showed altered phenotypes

associated with seed germination and ethylene response. Enhanced ethylene response in *LeERF2*-expressing lines is revealed by exaggerated hook formation in the absence of ethylene treatment. However, the complete inhibition of hook formation upon treatment with 1-MCP, a potent inhibitor of ethylene perception, suggests that *ERF2* alone is not sufficient to induce hook formation and requires the presence of some other ethylene-dependent component(s).

Up-regulation of *LeERF2* results in premature seed germination concomitant with enhancing *Mannanase2* gene expression. Mannanase activity was shown to correlate with the germination process and it was reported that endosperm cell walls contain approximately 60% of mannanase (Groot *et al.*, 1998; Dahal *et al.*, 1997) probably in the form of galactomannan or galactoglucomannan polymers that constitute the major carbohydrate reserves of the endosperm and contribute to its rigidity. Endo-(1,4)- $\alpha$ -Mannanase, which hydrolyzes internal bonds within mannan polymer, has been associated with the mechanism of seeds germination in many plant species. (Watkins *et al.*, 1985; Dutta *et al.*, 1994, 1997; Downie *et al.*, 1997; Sanchez and De Miguel, 1997). *LeMAN2* is preferentially expressed in the endosperm cap of seeds prior to radicle emergence. This tissue show a high mannanase activity (Nonogaki *et al.*, 2000) and the expression of the *LeMan2* gene is therefore considered as a good marker of seed germination and the *LeMan2* protein as a germination specific protein. *LeMAN2* shares 77% deduced amino acid sequence similarity with *LeMAN1* which is know to be a post germinative tomato mannanase. In the *LeERF2*-expressing lines the premature seed germination correlates with the enhanced expression of the *LeMan2* gene suggesting that *LeERF2* impacts germination through positively regulating the *LeMan2* gene. Mannanase gene expression seems to be required for seed germination and ABA and *LeERF2* have opposite effect on the expression of the mannanase gene. While we confirm in this study that ABA plays a role in the inhibition of seed germination (Toorop *et al.*, 2000), we also show here for the first time that ABA exerts a negative regulation on both *LeERF2* and *LeMan2* genes. In the process of seed germination, *LeERF2* may allow functional integration of ethylene and ABA signalling leading to a fine coordination of seed germination. The role of ERF-like proteins in integrating ABA and ethylene responses has been recently demonstrated for AP2/EREBP during drought stress responses of *Arabidopsis* plants (Song *et al.*, 2005).

**REFERENCES**

1. Abeles, F.B., Morgan, P.W. and Saltveit, M.E. Jr. (1992) Ethylene in plant biology. San Diego: Academic. 2<sup>nd</sup> ed.
2. Allen, M.D., Yamasaki, K., Ohme-Takagi, M., Tateno, M. and Suzuki, M. (1998) A novel mode of DNA recognition by a beta-sheet revealed by the solution structure of the GCC-box binding domain in complex with DNA. *EMBO J* 17: 5484-5496.
3. Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.
4. Brown, R.L., Kazan, K., McGrath, K.C., Maclean, D.J. and Manners, J.M. (2003) A role for the GCC-box in jasmonate-mediated activation of the *PDF1.2* gene of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 132: 1020-1032.
5. Chakravarthy, S., Tuori, R.P., D'Ascenzo, M.D., Fobert, P.R., Despres, C. and Martin, G.B. (2003) The tomato transcription factor Pti4 regulates defense-related gene expression via GCC box and non-GCC box *cis* elements. *Plant Cell* 15: 3033-3050.
6. Cheong, Y.H., Moon, B.C., Kim, J.K., Kim, C.Y., Kim, M.C., Kim, I.H., Park, C.Y., Kim J.C., Park, B.O., Koo, S.C., Yoon, H.W., Chung, W.S., Lim, C.O., Lee, S.Y. and Cho, M.J. (2003) BWMK1, a rice mitogen-activated protein kinase, locates in the nucleus and mediates pathogenesis-related gene expression by activation of a transcription factor. *Plant Physiol.* 132:1961-1972.
7. Chiwocha, S.D., Cutler, A.J., Abrams, S.R., Ambrose, S.J., Yang, J., Ross, A.R. and Kermode, A.R. (2005) The *etr1-2* mutation in *Arabidopsis thaliana* affects the abscisic acid, auxin, cytokinin and gibberellin metabolic pathways during maintenance of seed dormancy, moist-chilling and germination. *Plant J* 42: 35-48.
8. Dahal, P., Nevins, D.J. and Bradford, K.J. (1997) Relationship of Endo-[beta]-D-Mannanase Activity and Cell Wall Hydrolysis in Tomato Endosperm to Germination Rates. *Plant Physiol* 113: 1243-1252

9. Debeaujon, I. and Koornneef, M. Gibberellin requirement for Arabidopsis seed germination is determined both by testa characteristics and embryonic abscisic acid. (2000). *Plant Physiol* 122: 415-424.
10. Downie, B., Hilhorst, H.W.M., Bewley, J.D. (1997) Endo- $\beta$ -mannanase activity during dormancy alleviation and germination of white spruce (*Picea glauca*) seeds. *Physiol Plant* 101: 405-415.
11. Dutta, S., Bradford, K.J. and Nevins, D.J. (1994) Cell-Wall Autohydrolysis in Isolated Endosperms of Lettuce (*Lactuca sativa L.*). *Plant Physiol* 104: 623-628.
12. Dutta, S., Bradford, K.J. and Nevins, D.J. (1997) Endo-[ $\beta$ ]-Mannanase Activity Present in Cell Wall Extracts of Lettuce Endosperm prior to Radicle Emergence. *Plant Physiol* 113: 155-161
13. Finkelstein, R.R., Wang, M.L., Lynch, T.J., Rao, S. and Goodman, H.M. (1998) The Arabidopsis abscisic acid response locus *ABI4* encodes an APETALA 2 domain protein. *Plant Cell*. 10:1043-1054.
14. Fujimoto, S.Y., Ohta, M., Usui, A., Shinshi, H. and Ohme-Takagi, M. (2000) Arabidopsis ethylene-responsive element binding factors act as transcriptional activators or repressors of GCC box-mediated gene expression. *Plant Cell* 12: 393-404.
15. Fujiwara, T. and Beachy, R.N. (1994) Tissue-specific and temporal regulation of a beta-conglycinin gene: roles of the RY repeat and other cis-acting elements. *Plant Mol Biol* 24: 261-272.
16. Groot, S.P.C. and Karssen, C.M. (1987) Gibberellins regulate seed germination in tomato by endosperm weakening: a study with gibberellin-deficient mutants. *Planta* 171:525-531.
17. Groot, S.P.C., Kieliszewska-Rokicka, B., Vermeer, E. and Karssen, C.M. (1988) Gibberellin-induced hydrolysis of endosperm cell walls in gibberellin-deficient tomato seeds prior to radicle protrusion. *Planta* 174: 500-504.
18. Gu, Y.Q., Wildermuth, M.C., Chakravarthy, S., Loh, Y.T., Yang, C., He, X., Han, Y. and Martin, G.B. (2002) Tomato transcription factors Pti4, Pti5, and Pti6

- activate defense responses when expressed in Arabidopsis. *Plant Cell* 14: 817-831.
19. Gu, Y.Q., Yang, C., Thara, V.K., Zhou, J. and Martin, G.B. (2000) *Pti4* is induced by ethylene and salicylic acid, and its product is phosphorylated by the Pto kinase. *Plant Cell* 12: 771-786.
  20. Itzhaki, H., Maxson, J.M. and Woodson, W.R. (1994) An ethylene-responsive enhancer element is involved in the senescence-related expression of the carnation glutathione-S-transferase (GST1) gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 8925-8929.
  21. Jones, B., Frasse, P., Olmos, E., Zegzouti, H., Li, Z.G., Latche, A., Pech, J.C. and Bouzayen M. (2002) Down-regulation of DR12, an auxin-response-factor homolog, in the tomato results in a pleiotropic phenotype including dark green and blotchy ripening fruit. *Plant J.* 32:603-613.
  22. Karssen, C.M., Zagorski, S., Kepczynski, J. and Groot, S.P.C (1989) Key role for endogenous gibberellins in the control of seed germination. *Ann Bot* 63: 71-80
  23. Kazan, K. (2003) Alternative splicing and proteome diversity in plants: the tip of the iceberg has just emerged. *Trends Plant Sci* 8: 468-471.
  24. Kong, J., Gong, J.M., Zhang, Z.G., Zhang, J.S. and Chen, S.Y. (2003) A new AOX homologous gene OsIM1 from rice (*Oryza sativa* L.) with an alternative splicing mechanism under salt stress. *Theor Appl Genet* 107: 326-331.
  25. Koornneef, M., Bentsink, L. and Hilhorst, H. (2002) Seed dormancy and germination. *Curr Opin Plant Biol* 5: 33-36.
  26. Leclercq, J., Adams-Phillips, L.C., Zegzouti, H., Jones, B., Latche, A., Giovannoni, J.J., Pech, J.C. and Bouzayen, M. (2002) *LeCTR1*, a tomato *CTR1*-like gene, demonstrates ethylene signaling ability in Arabidopsis and novel expression patterns in tomato. *Plant Physiol* 130: 1132-1142.
  27. Lescot, M., Déhais, P., Thijs, G., Marchal, K., Moreau, Y., Van de Peer, Y., Rouze, P., and Rombauts, S. (2002) PlantCARE, a database of plant *cis*-acting regulatory elements and a portal to tools for *in silico* analysis of promoter sequences *Nucleic Acids Res.* 30:325-327.

- 
28. Lorenzo, O., Piqueras, R., Sanchez-Serrano, J.J., Solano, R. (2003) ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *Plant Cell* 15: 165-178.
  29. Modrek, B. and Lee, C. (2002) A genomic view of alternative splicing. *Nat Genet* 30: 13-19.
  30. Nonogaki, H., Gee, O.H. and Bradford, K.J. (2000) A germination-specific endo-beta-mannanase gene is expressed in the micropylar endosperm cap of tomato seeds. *Plant Physiol* 123: 1235-1246.
  31. Nonogaki, H. and Morohashi, Y. (1996) An Endo-[beta]-Mannanase Develops Exclusively in the Micropylar Endosperm of Tomato Seeds Prior to Radicle Emergence. *Plant Physiol* 110: 555-559.
  32. Ohme-Takagi, M. and Shinshi, H. (1995) Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. *Plant Cell* 7: 173-182.
  33. Onate-Sanchez, L. and Singh, K.B. (2002) Identification of Arabidopsis ethylene-responsive element binding factors with distinct induction kinetics after pathogen infection. *Plant Physiol* 128: 1313-1322.
  34. Park, J.M., Park, C.J., Lee, S.B., Ham, B.K., Shin, R. and Paek, K.H. (2001) Overexpression of the tobacco *Tsi1* gene encoding an EREBP/AP2-type transcription factor enhances resistance against pathogen attack and osmotic stress in tobacco. *Plant Cell* 13: 1035-1046.
  35. Riechmann, J.L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C., Keddie, J., Adam, L., Pineda, O., Ratcliffe, O.J., Samaha, R.R., Creelman, R., Pilgrim, M., Broun, P., Zhang, J.Z., Ghandehari, D., Sherman, B.K. and Yu, G. (2000) Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science* 290: 2105-2010.
  36. Sánchez, R.A. and de Miguel, L. (1997) Phytochome promotion of mannan-degrading enzyme activities in the micropylar endosperm of *Datura ferox* seeds requires the presence of embryo and gibberellin synthesis. *Seed sci Res* 7: 27-33.

- 
37. Song, C.P., Agarwal, M., Ohta, M., Guo, Y., Halfter, U., Wang, P. and Zhu, J.K. (2005) Role of an Arabidopsis AP2/EREBP-type transcriptional repressor in abscisic acid and drought stress responses. *Plant Cell* 17: 2384-2396
  38. Thara, V.K., Tang, X., Gu, Y.Q., Martin, G.B. and Zhou, J.M. (1999) Pseudomonas syringae pv tomato induces the expression of tomato EREBP-like genes Pti4 and Pti5 independent of ethylene, salicylate and jasmonate *Plant J.* 20:475-483.
  39. Toorop, P.E., van Aelst, A.C. and Hilhorst, H.W. (2000) The second step of the biphasic endosperm cap weakening that mediates tomato (*Lycopersicon esculentum*) seed germination is under control of ABA. *J Exp Bot* 51: 1371-1379.
  40. Tournier, B., Sanchez-Ballesta, M.T., Jones, B., Pesquet, E., Regad, F., Latche, A., Pech, J.C. and Bouzayen, (2003) M. New members of the tomato ERF family show specific expression pattern and diverse DNA-binding capacity to the GCC box element. *FEBS Lett* 550: 149-154.
  41. Watkins, J.T., Cantliffe, D.J., Huber, D.J. and Nell, T.A. (1985) Gibberellic acid stimulated degradation of endosperm in pepper. *J Am Soc Hortic Sci* 110: 61-65
  42. Zhang, H., Huang, Z., Xie, B., Chen, Q., Tian, X., Zhang, X., Zhang, H., Lu, X., Huang, D. and Huang, R. (2004) The ethylene-, jasmonate-, abscisic acid- and NaCl-responsive tomato transcription factor JERF1 modulates expression of GCC box-containing genes and salt tolerance in tobacco. *Planta* 220: 262-270.
  43. Zhou, J., Tang, X. and Martin, G.B. (1997) The Pto kinase conferring resistance to tomato bacterial speck disease interacts with proteins that bind a cis-element of Pathogenesis related genes *Embo J* 16-: 3207-3218.





## **Discussion générale et perspective du travail**



## Discussion générale et perspective du travail

---

Le travail présenté dans cette thèse apporte des données nouvelles sur les médiateurs transcriptionnels de la réponse à l'éthylène et sur leur rôle dans la régulation de certains processus de développement des plantes.

En premier lieu l'isolement et la description de la famille de gènes codant pour les MBF1 chez les plantes permet d'identifier de nouvelles cibles pour l'étude de la régulation transcriptionnelle en relation avec les signaux soit endogènes (hormones) soit d'origine environnementale (température, stress oxydatif). Parce qu'elles offrent la possibilité de se lier à plusieurs types de facteurs de transcription, les protéines MBF1 se présentent comme des candidats forts pour être les lieux d'intégration de plusieurs voies de signalisation. Il est montré dans ce travail de thèse que les gènes MBF1 possèdent des profils d'expression distinctifs ce qui suggère leur implication différenciée dans des situations physiologiques différentes. En particulier le gène *LeMBF1/ER24* présente une expression fortement associée au déroulement de la maturation du fruit et à la réponse aux stress thermiques. Le rôle de ce gène dans la réponse aux hautes températures a été confirmé par le fait que sa surexpression dans des lignées transgéniques confère à ces dernières une meilleure tolérance aux chocs thermiques. Cependant en raison de l'inadaptation du modèle *Arabidopsis* utilisée dans cette étude pour l'étude de la maturation des fruits, il n'a pas été possible de déterminer si le processus de maturation est affecté dans les lignées de sur-expression du gène *LeMBF1/ER24*. Cette tâche sera réalisée au laboratoire avec des lignées de tomate qui sont actuellement en cours d'obtention.

Il est important de relever que l'expression des gènes MBF1 semble associée à des processus mettant en jeu des stress oxydatifs. En effet les conditions d'expression de

ces gènes ont toutes en commun l'augmentation intracellulaire des ROS, en particulier le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Le processus de maturation des fruits a été également décrit comme un phénomène oxydatif qui est accompagné par des altérations de la concentration de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, de la peroxydation des lipides, de l'oxydation des protéines (Jimenez et al. 2002) surtout au moment du ramollissement du fruit. L'implication potentielle des gènes MBF1 dans les situations de stress est confortée par la nature des gènes partenaires qui ont été isolés par le criblage double hybride de la levure. En effet, parmi les protéines interagissant avec MBF1 plusieurs sont associées aux stress et à la maturation des fruits. Chez *Drosophila* il a été montré que MBF1 participe à la réponse au stress oxydatif comme une protéine de protection du complexe D Jun-Fos (Jindra et al., 2004). De plus, la conservation remarquable de séquence entre les MBF1 des différentes espèces suggère fortement une conservation fonctionnelle et donc la participation des protéines MBF1 à la réponse aux stress oxydatifs chez les plantes. Si l'implication de *LeMBF1/ER24* dans la voie de signalisation des ROS est confirmée, cela constitue une avancée significative car peu d'informations sont actuellement disponibles sur les mécanismes qui président à la régulation transcriptionnelle associée aux stress oxydatifs chez les plantes.

D'autre part, la caractérisation fonctionnelle de LeERF2 réalisée au cours de ce travail de thèse constitue également une avancée importante pour la compréhension des mécanismes par lesquels l'éthylène contrôle la germination des graines. Le rôle positif de l'éthylène dans le processus de germination a été démontré récemment à travers la caractérisation des graines du double mutant *etr1/etr2* (Chiwocha et al. 2005). Cependant, alors que l'implication des ERF dans le processus de germination des graines a été fortement suggérée (Finkelstein et al., 1998; Song et al., 2005), le travail présenté ici apporte des éléments de preuve directe de la participation du gène LeERF2 à ce processus. Ce travail montre également pour la première fois que LeERF2 accélère le processus de germination à travers la régulation positive du gène de la *mannanase2* et que ce gène répond à un contrôle négatif par l'ABA. Cette double régulation par l'éthylène et l'acide abscissique met en évidence le dialogue entre les deux voies de signalisation hormonales.

Au total, les données nouvelles acquises au cours de ce travail de thèse et les lignées transgéniques générées apportent des ressources biologiques uniques qui permettront d'explorer le mode d'action de l'éthylène au cours de processus de développement variés des plantes. Il est maintenant envisagé d'utiliser l'approche DNA microarrays pour l'analyse comparative de l'expression génique chez les lignées transgéniques et les lignées sauvages. Cette approche permettra d'identifier les gènes dont l'expression est altérée chez les lignées soit sur-exprimant soit sous-exprimant les gènes *LeERF2* et *LeMBF1/ER24*. En premier lieu cela permettra de définir les gènes cibles de ces régulateurs transcriptionnels et en deuxième lieu d'ouvrir des voies nouvelles pour la compréhension des mécanismes par lesquels la voie de signalisation de l'éthylène opère pour sélectionner les gènes spécifiques à un tissu ou à un processus physiologique donné.



---

## Supplément de Matériel et Méthodes

---

### Matériel végétal.

#### *Lycopersicon esculentum*

L'ensemble des études d'expression présentées dans les publications ont été réalisées sur *Lycopersicon esculentum cv Ailsa Craig* et *Lycopersicon esculentum cv Microtom*.

#### *Arabidopsis thaliana*

Les transformations génétiques ont été réalisées avec l'écotype WS.

### Clonage de MBF1a-c et ER24

La séquence codante de chaque gène a été amplifiée par la PCR sur ADNc en utilisant des oligonucléotides au début et à la fin de la séquence codant en incluant le codon stop.

MBF1a\_Forward: ATGAGTGGAATATCGCAAGACT  
MBF1a\_Reverse: TTATTTCTTCCCTCGAAGTTTCG

MBF1b\_Forward: ATGGCCGGATTGTCACAAG  
MBF1b\_Reverse: TTATTTCTTCCACGAAGTTTC

MBF1c\_Forward: ATGAGTGGAGGATTATCACAAG  
MBF1c\_Reverse: TCATTTCTTCCCTCTAAGTTTGG

ER24\_Forward: ATGCCGATGCGACCAACAG  
ER24\_Reverse: TCATGACTTGTGAATTTTACCTC

La réaction de PCR (25 µl au total) est composée de 2,5 µl de tampon 10X de la Taq ADN polymérase (ependorff) avec Mg<sup>2+</sup>, 0,5 µl de dNTP 10 mM, 1µl d'ADNc, 0,5 µL de chaque amorce 50 µM et 0,5 µl de Taq polymérase (Promega). Les cycles réalisés sont 1 cycle à 95°C pendant 90 secondes, puis 30 cycles à 95°C pendant 20 secondes,

50°C pendant 50 secondes, 72°C pendant 50 secondes. Le dernier cycle est effectué à 72°C pendant 5 minutes. Les fragments ainsi obtenus sont clonés dans le vecteur pGEMT (Promega).

### **Ligation, clonage et transformation dans *E. Coli*.**

Le vecteur de clonage pGEMT (Promega) permet une sélection rapide des colonies grâce à une discrimination bleu/blanc liée au fonctionnement du gène *LacZ*, en présence d'un substrat, le X-gal au sein duquel se trouve le site de clonage. Les colonies bleues (*lacZ* fonctionnel) ne contiennent que le plasmide refermé sur lui-même alors que les colonies blanches ont intégré un plasmide contenant l'insert ce qui rend le produit du gène *LacZ* non-fonctionnel.

La ligation s'effectue avec 3µL de produit PCR, 1µL de vecteur pGEMT, 1µL de tampon et 1µL de T<sub>4</sub> ADN ligase (Promega) pour un volume total de 10µL. Le mélange est placé à 4°C pendant une nuit. La transformation des cellules compétentes *E. coli* JM109 (Promega) est réalisée avec 10µL de la réaction de ligation et 200 µL de cellules compétentes. Après 15 minutes dans la glace, un choc thermique (42°C pendant 45 secondes puis 2 minutes dans la glace) permet l'entrée du plasmide dans les cellules. On ajoute 250µL de milieu de culture SOC et on incube à 37°C pendant 1 heure et 30 minutes sous agitation à 205 rpm. Le mélange est étalé sur une boîte de Pétri contenant du LB-agar (20g.L<sup>-1</sup>; Sigma), 50 mg.L<sup>-1</sup> d'ampiciline (Sigma), 50 µL de X-gal (Promega 50 mg/mL) et 100 µL IPTG (100µM). Après une nuit d'incubation à 37°C, les colonies blanches sont analysées par PCR avec des amorces universelles T7 et M13 reverse. L'extraction des plasmides des colonies positives est réalisée par le kit *Midipreps* de Promega.

### **Isolement des clones génomiques de *LeMBF1a*, *LeMBF1b*, *LeMBF1c* et *LeMBF1/ER24*.**

Les clones génomiques de *LeMBF1c* et la moitié de *LeMBF1a* ont été obtenu par PCR sur de l'ADN extrait de feuilles de tomate.

Le clone de *MBF1b* et l'autre moitié du clone *LeMBF1a* a été sorti d'une banque d'ADN génomique en cosmides en utilisant comme sonde la séquence d'ADNc.



Les amorces utilisées pour l'amplification des séquences génomiques sont:

ER24\_Forward: ATGCCGATGCGACCAACAG  
ER24\_Reverse: TCATGACTTGTGAATTTTACCTC

MBF1a\_Forward: ATGAGTGGAATATCGCAAGACT  
MBF1a\_I2\_GSP2: GCATCATAGTTCTCCACCAGAAGTTTTC

MBF1c\_Forward: ATGAGTGGAGGATTATCACAAG  
MBF1c\_Reverse: TCATTTCTTTCCTCTAAGTTTGG

Les fragments ont été clonés, suivant les conditions déjà décrites, puis séquencés. Une analyse comparative entre la séquence génomique et celle de l'ADNc a permis la délimitation des exons et des introns.

#### **Isolement du promoteur LeMBF1a.**

L'obtention du promoteur a été faite selon le protocole de Clontech pour le kit "Universal Genome Walker kit" à partir d'ADN génomique de feuille.

Les oligos utilisés sont:

MBF1a\_36\_R et AP1                      MBF1a\_3\_R et GSP2  
MBF1c56R et AP1                      MBF1c\_21\_R et GSP2  
MBF1a\_36\_R.-AGGTAGGCGCCTTCTTCCTGATAAC  
MBF1a\_3\_R.-CCCAGTCTTGCGATATTCCACTCAT  
AP1.-GTAATACGACTCACTATAGGGC  
AP2.-ACTATAGGGCACGCGTGGT

### **Extraction des ARNs totaux et synthèse d'ADNc.**

Le matériel végétal est broyé dans de l'azote liquide. L'équivalent de 15ml de poudre de tissus sont mélangés à 15mL de tampon d'extraction (1% (P/V) d'acide tri-isopropyl naphtalène sulphonique, sel de sodium (TNS), 6% (P/V) d'acide 4-amino salicylique, 5 g de phénol, 3,5mL de m-crésol, 25 mg de 8-hydroxyquinolène et 7,5mL d'eau) et 15 ml de phénol/chloroforme/isoamylalcool (25:24:1). Après une centrifugation de 15 minutes à 5000g, le surnageant est prélevé et les acides nucléiques sont précipités pendant une nuit à -20°C avec 0,1 volume d'acétate de sodium 3M pH 4,5 et un volume d'isopropanol. Après une centrifugation de 30 minutes à 5000g, le culot est lavé avec de l'éthanol 70%. Il est ensuite repris dans 4mL d'eau stérile, 4 ml de tampon CTAB (2% CTAB, 100 mM Tris/HCl, pH 8,20 mM EDTA pH 8, 1.4 M NaCl) et 8mL de tampon de précipitation (CTAB 1%, 50 mM Tris/HCl pH 8, 10 mM EDTA pH8). Suite à une centrifugation de 45 minutes à 5000g à une température supérieure à 18°C, le culot est repris dans 2mL d'eau stérile, 2mL de tampon CTAB et 4mL de tampon de précipitation. Après une centrifugation de 30 minutes, le culot est repris dans 2mL de chlorure de sodium 1,4M et 2,5 volumes d'éthanol absolu. Après une nuit de précipitation à -20°C et une centrifugation de 30 minutes, le culot est repris dans 400µL d'eau stérile.

L'élimination de l'ADN génomique est effectuée par une digestion à l'ADNase exempte de ARNase (Boeringher Mannheim) en présence de 1µL d'inhibiteur de ARNase (RNasin, Promega) et 45µL de tampon de DNase 10X (Acétate de sodium 1M, sulfate de magnésium 50mM, pH 5). Après une extraction au phénol/chloroforme/isoamylalcool et une extraction au chloroforme, les ARNs sont précipités pendant une nuit à -20°C avec 3 vol de éthanol 100% et 1/10 de acétate de sodium. Après une centrifugation de 30 minutes à 14000 rpm, le culot est rincé avec 1mL d'éthanol 70 %. Le culot est dissout dans 70µL d'eau stérile.

.

Après la quantification des ARNs par spectrophotomètre, 2 µg of RNA ont été traités avec l'ADNase I (Promega) et purifié avec une extraction de phenol-chloroform. La synthèse des ADNcs est réalisée à partir de 2 µg d'ARN totaux avec le Kit omniscrypt Qiagen.

La RT PCR quantitative a été faite avec 4 ng des ARN totaux pour les quatre MBF1 et l'actine dans 20- $\mu$ L de réaction en utilisant le kit "Master mix SYBR GREEN" (PE-Applied Biosystems, Foster City, CA).

Les oligonucleotides utilisés:

LeMBF1a forward CTTTAATCATTGGCTATGTTTTTGCT

LeMBF1a reverse CAGAAGAAACAGCTAATTCAACAGAGAA

LeMBF1b forward GAACGTCTACATCGTTTGGGTTCT

LeMBF1b reverse ACGTCCCGAATCCAGACACA

LeMBF1c forward CAACTTTTTCTGTTAGCCCTCTTTCTAT

LeMBF1c reverse ATGTAGCCAAGAAATCCAGAACCA

LeER24forward CGTTGGCAGTTAATGTAAGAAAGCTAG

LeER24 reverse TCCACCGGCAATTTCTCAA

La concentration optimale des oligonucléotides pour LeER24, LeMBF1a, LeMBF1b, LeMBF1c a été 300nM, et 900 nM pour l'actine. Les conditions pour la RT-PCR quantitative ont été les suivantes: 50°C-2 min, 95° C-10 min, ensuite 40 cycles de 95°C - 15 s et 60°C -1 min et un cycle 95°C -15 s et 60°C -15 s. Les échantillons ont été charges par triplicata. Pour chaque échantillon une valeur de Ct ("threshold cycle") a été désignée dans la portion exponentielle de la courbe d'amplification. Les différences relatives entre les échantillons ont été calculées par la méthode comparative Ct en utilisant l'actine comme standard interne.

## Constructions

Le vecteur binaire utilisé est pGreen 2935SOMCaMVT (Dr Julie Cullimore, INRA Toulouse) Le gène d'intérêt est sous le contrôle du promoteur 35S (virus de la mosaïque du chou-fleur) et du terminateur NOS (Nopaline synthase). Ce vecteur permet une sélection des plantes génétiquement transformées sur un milieu de culture contenant un antibiotique, la kanamycine, grâce au gène *NPTII*. Le site de clonage utilisé est *SmaI* Toute l'ORF de *MBF1a*, *MBF1b*, *MBF1c* et *ER24* a été introduite pour la construction en orientation sens.

Le vecteur binaire est ensuite introduit dans la souche d'*Agrobacterium tumefaciens* C58 + pSOUP. La transformation d'*Agrobacterium* se fait en présence de 10 $\mu$ g (15 $\mu$ L) de plasmide et 100 $\mu$ L de cellules compétentes. Le choc thermique se fait d'abord dans

l'azote liquide (5 min) puis 30 min à 37°C. L'ajout de 1 mL de milieu de culture LB (Sigma) et une incubation à 28°C- 150 rpm pendant 4 -5 heures à l'obscurité permet aux bactéries de débiter leur expression phénotypique. Le mélange est étalé sur une boîte de Pétri contenant du LB-agar (20g.L<sup>-1</sup> ; Sigma), 50mg.L<sup>-1</sup> de kanamycine, de 5mg.L<sup>-1</sup> tétracycline (résistances apportées par le plasmide pSOUP) et de 100mg.L<sup>-1</sup> de rifampicine (résistance génomique) (Sigma).

### **Transformation génétique.**

#### ***Arabidopsis thaliana***

Les boutons des plantes en floraison sont trempés dans une suspension d'*Agrobacterium* dans un milieu d'inoculation contenant 5% de saccharose et 0.05% Silwet L-77 (OSI Specialities, INC., Danbury, T, USA). Après un passage en serre, les graines sont ensuite récoltées et semées sur un milieu gélosé contenant 70 mg/L de kanamycine.

#### *\* Semis des graines de tomate*

Désinfection des graines : 10 minutes dans une solution de 0.48% de hypochlorite de sodium (eau de Javel diluée), puis rincer abondamment avec de l'eau distillée stérile. Sécher sur du papier watmann stérile, puis déposer dans une boîte magenta contenant 50 mL de milieu MS+ Vitamine R3 : Thiamine 1 g.L<sup>-1</sup>, Acide nicotinique 0.5 g.L<sup>-1</sup>, Pyridoxine 0.5 g.L<sup>-1</sup> (Duchefa, Kalys). Incuber 7/8 jours en chambre de culture à 25°C.

#### *\* Transformation génétique*

Incuber 24h à 28°C, à l'obscurité et sous agitation .

#### **Analyse des descendance (R1, R2...)**

On utilise le même milieu MS dans lequel on a ajouté de 75mg.L<sup>-1</sup> de kanamycine qui permet la sélection des plantules transformées.

Pour 1 litre : Milieu MS + 500µl Vitamines R3 + 750µl de Kanamycine (100mg.mL<sup>-1</sup>)

Même méthode de désinfection que le semis pour la transformation.

Semis des graines R1 (environ 20 graines): sélection des plantes *résistantes à la kanamycine* (développement normal de la plante) et des *plantes sensibles à la kanamycine* et donc non transformées (plantes présentant une tige violette, pas de développement foliaire et racinaire).

Les plantes résistantes sont plantées en serre pour obtenir des graines R2.

Semis des graines R2 (40 graines): sélection des plantes susceptibles d'être *homozygotes* (toutes les plantes sont résistantes) et *hétérozygotes* (mélange de plantes résistantes et sensibles).

## **Les stress abiotiques**

### **L'éthylène**

Le traitement à l'éthylène se fait par injection du gaz dans des enceintes hermétiques de 3 litres contenant les plantes. La concentration est vérifiée par chromatographie en phase gazeuse.

Pour analyser la triple réponse chez *Arabidopsis* (environ 50 graines) et la tomate (30 graines), le traitement se fait à l'obscurité, après avoir semé les graines stérilisées sur un milieu gélosé et après un passage à 4°C durant 4 jours pour lever la dormance. Trois jours de traitement à l'obscurité suffisent pour *Arabidopsis*. Pour la tomate, le traitement à l'éthylène se fait sur des graines germées et dure 5 jours. Pour obtenir la concentration 0 en éthylène, du  $\text{KMnO}_4$  est utilisé pour piéger l'éthylène résiduel ou l'éthylène émis par les plantes.

### **Le méthyl jasmonate**

Le traitement se fait sur plante entière dans des enceintes de 25 litres ( $4\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Il faut mélanger 5 $\mu\text{L}$  de la solution liquide commerciale de méthyl jasmonate (Sigma) avec 50  $\mu\text{L}$  d'éthanol absolu pour avoir une solution au 1%. Le mélange ainsi obtenu est déposé sur un morceau de papier et enfermé avec les plantes dans l'enceinte hermétique.

### **L'acide salicylique**

Le traitement se fait en pulvérisant une solution contenant 4mM d'acide salicylique (Sigma) dissout dans 300µL d'éthanol absolu. Le contrôle est fait avec de l'eau et la même quantité d'éthanol.

### **La blessure**

Les feuilles sont blessées par pincements réguliers avec des pinces fines. Les feuilles sont laissées sur la plante jusqu'au moment du prélèvement (de 15 min jusqu'à 5 heures).

### **MCP + blessure**

Les plantes ont été traitées une nuit avec 1-méthylcyclopropène (MCP) dans des enceintes hermétiques et le lendemain on fait la blessure décrit ci-dessus. Le tissu est congelé 2 et 5 heures après le traitement.

### **Température**

Des plantes de tomate de six semaines ont été traitées 1 h à 48°C et 1h à 51 °C et replacées dans le phytotron.

Pour les plantes d'*Arabidopsis* le traitement a été à 48°C 45 min et après les plantes ont été replacées dans le phytotron. Les lignées surexprimantes sont: LeMBF1a: 4.6, 13.8;96.10; LeMBF1b: 5.11, 8.2, LeMBF1c: 11.4.2; 11.2.2; 9.6.2; LeMBF1/ER24: 36.6.

### **Paraquat**

50 µM de paraquat est pulvérisé jusqu'à saturation sur des plantes tomate de 6 semaines et 40 µM sur de plantes d'*Arabidopsis* de 8 jours. Les plantes traitées sont incubées à 25 °C sous lumière constante pendant 24 heures et ensuite les plates sont replacées dans le phytotron.

## Expression transitoire d'une protéine de fusion LeMBF1::GFP

Toutes les ORF de MBF1a, MBF1b, MBF1c et ER24, ont été introduites dans le site Smal du vecteur pGreen PGr2935SOME GFP (Dr Julie Cullimore, INRA Toulouse). Les amplifications PCR ont été réalisées avec l'ADN polymérase Vent (Biolabs) et de l'ADNc de tomate.

Ce vecteur permet l'expression transitoire de la protéine en fusion avec la GFP en C-terminal. Les protoplastes sont préparés à partir d'une culture cellulaire de BY-2 de tabac. La lyse des parois se fait en incubant les cellules dans 10 mL d'un tampon contenant 1.0% (p/v) cellulase 345, 0.2% (p/v) pectolyase Y-23 (Seishin Pharmaceutical, Tokyo), 0,6 M mannitol et 25 mM MES-KOH, pH 5,5, à 37°C pendant 90 minutes. Les protoplastes sont isolés et transfectés par par du polyéthylène glycol. Brièvement, 0,3 ml d'une suspension de protoplastes ( $0,5 \times 10^6$ ) sont transfectés avec 50 µg de sperme de saumon comme transporteur et 20 µg de plasmides (LeMBF1::GFP ou 35S::GFP). Les protoplastes transfectés sont incubés pendant 16 heures à 25°C. Les expériences sont répétées au moins trois fois. Les images sont analysées par microscopie confocale (Leica TCS SP, Leica DM IRBE; Microsystems, Wetzlar, Allemagne). Les échantillons sont éclairés avec un laser d'une longueur d'onde de 488 nm pour voir la fluorescence de la GFP.

## Le double hybride

LeER24 et LeMBF1a ont été clonés dans le vecteur de expression pEG202 qui contient le promoteur du gène de l'alcool dehydrogenase (ADH1) et comme marqueur le gène *HIS3*. Les protéines LeER24 et LeMBF1 ont été utilisées comme hameçons et sont produites fusionnées avec la protéine de liaison à l'ADN LexA.

Avec ces hameçons on a criblé une bibliothèque de fruit clonée dans le vecteur pJG4-5 qui contient un domaine de activation pour LexA et le marqueur de sélection *TRP1*. Les séquences codantes sont sous le contrôle du promoteur GAL1.

Les levures (souche EGY48) ont été transformées avec les deux vecteurs et le vecteur LacZ reporter qui contient l'opéron pour LexA fusionné avec un promoteur minimal de GAL1, le gène LacZ et le marqueur de sélection *URA3*.

Les levures transformées sont étalées sur plaques Petri avec du milieu minimal sans uracil, triptofane ni histidine. Les colonies sont répliquées sur plaques Petri avec le même milieu de culture additionné de X-Gal.



## Références bibliographiques

---

Abeles FB, Morgan Pw and Saltveit ME Jr. (1992) Ethylene in plant biology. San Diego: Academic. 2nd ed.

Adams DO and Yang SF. (1979) Ethylene biosynthesis: identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **76**: 170–4.

Adams-Phillips L, Barry C, Kannan P, Leclercq J, Bouzayen M and Giovannoni J. (2004) Evidence that CTR1-mediated ethylene signal transduction in tomato is encoded by a multigene family whose members display distinct regulatory features. *Plant Mol. Biol.*, **54**: 387-404.

Alba R, Payton P, Fei Z, McQuinn R, Debbie P, Martin GB, Tanksley SD and Giovannoni JJ. (2005) Transcriptome and selected metabolite analyses reveal multiple points of ethylene control during tomato fruit development. *Plant Cell*, **17**: 2954-65.

Alexander L and Grierson D. (2002) Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climacteric fruit ripening. *J Exp Bot.*, **53**: 2039-55.

Allen MD, Yamasaki K, Ohme-Takagi M, Tateno M and Suzuki M. (1998) A novel mode of DNA recognition by a beta-sheet revealed by the solution structure of the GCC-box binding domain in complex with DNA. *EMBO J.*, **17**: 5484-96.

Alonso JM, Hirayama T, Roman G, Nourizadeh S and Ecker JR. (1999) EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in Arabidopsis. *Science*, **284**: 2148-52.

Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W and Lipman DJ. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, **25**: 3389-402.

Apel K and Hirt H. (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **55**: 373-99.

Aravind L and Koonin EV. (1999) DNA-binding proteins and evolution of transcription regulation in the archaea. *Nucleic Acids Res.*, **27**: 4658-70.

Asada K (1994) Mechanism of scavenging reactive molecules generated in chloroplasts under light stress. In: Baker NR, Bowyer JR (eds). *Photo inhibition of photosynthesis. From molecular mechanisms to the field.* Bios Scientific Publishers, Oxford, pp 129-142.

Barry CS, Llop-Tous MI and Grierson D. (2000) The regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase gene expression during the transition from system-1 to system-2 ethylene synthesis in tomato. *Plant Physiol.*, **123**: 979-86.

Beaudoin N, Serizet C, Gosti F and Giraudet J. (2000) Interactions between abscisic acid and ethylene signaling cascades. *Plant Cell*, **12**: 1105-18.

Benfey PN. (2002) Auxin action: slogging out of the swamp. *Curr Biol.*, **12**: R389-90.

Bewley JD and Black M. (1994) *Seeds - Physiology of development and germination.*; 2nd Edition. Plenum Press, New York, NY.

Bidonde S, Ferrer MA, Zegzouti H, Ramassamy S, Latche A, Pech JC, Hamilton AJ, Grierson D and Bouzayen M. (1998) Expression and characterization of three tomato 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase cDNAs in yeast. *Eur. J. Biochem.*, **253**: 20-6.

Bleecker AB, Esch JJ, Hall AE, Rodriguez FI and Binder BM. (1998) The ethylene-receptor family from Arabidopsis: structure and function. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, **353**: 1405-12.

Bleecker AB and Kende H. (2000) Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. *Annu Rev. Cell Dev. Biol.*, **16**: 1-18.

Brendel C, Gelman L and Auwerx J. (2002) Multiprotein bridging factor-1 (MBF-1) is a cofactor for nuclear receptors that regulate lipid metabolism. *Mol. Endocrinol.*, **16**: 1367-77.

Brennan T and Frenkel C. (1977) Involvement of hydrogen peroxide in the regulation of senescence in pear. *Plant Physiol.*, **59**: 411-6.

Brivanlou AH and Darnell JE. (2002) Signal transduction and the control of gene expression. *Science*, **295**: 813-8.

Brown RL, Kazan K, McGrath KC, Maclean DJ and Manners JM. (2003) A role for the GCC-box in jasmonate-mediated activation of the PDF1.2 gene of Arabidopsis. *Plant Physiol.*, **132**: 1020-32.

Budiman MA, Mao L, Wood TC, Wing RA. (2000) A deep-coverage tomato BAC library and prospects toward development of an STC framework for genome sequencing. *Genome Res.*, **10**:129-36.

Burley SK and Roeder RG. (1996) Biochemistry and structural biology of transcription factor IID (TFIID). *Annu. Rev. Biochem.*, **65**: 769-99.

Busk PK, Wulf-Andersen L, Strom CC, Enevoldsen M, Thirstrup K, Haunso S and Sheikh SP. (2003) Multiprotein bridging factor 1 cooperates with c-Jun and is necessary for cardiac hypertrophy in vitro. *Exp. Cell. Res.*, **286**: 102-14.

Cancel JD and Larsen PB. (2002) Loss-of-function mutations in the ethylene receptor ETR1 cause enhanced sensitivity and exaggerated response to ethylene in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, **129**: 1557-67.

Chakravarthy S, Tuori RP, D'Ascenzo MD, Fobert PR, Despres C and Martin GB. (2003) The tomato transcription factor Pti4 regulates defense-related gene expression via GCC box and non-GCC box cis elements. *Plant Cell*, **15**: 3033-50.

Chen YF, Randlett MD, Findell JL and Schaller GE. (2002) Localization of the ethylene receptor ETR1 to the endoplasmic reticulum of Arabidopsis. *J. Biol. Chem.*, **277**: 19861-6.

Cheong YH, Moon BC, Kim JK, Kim CY, Kim MC, Kim IH, Park CY, Kim JC, Park BO, Koo SC, Yoon HW, Chung WS, Lim CO, Lee SY and Cho MJ. (2003) BWMK1, a rice mitogen-activated protein kinase, locates in the nucleus and mediates pathogenesis-related gene expression by activation of a transcription factor. *Plant Physiol.*, **132**: 1961-72.

Chiwocha SD, Cutler AJ, Abrams SR, Ambrose SJ, Yang J, Ross AR and Kermode AR. (2005) The *etr1-2* mutation in Arabidopsis thaliana affects the abscisic acid, auxin, cytokinin and gibberellin metabolic pathways during maintenance of seed dormancy, moist-chilling and germination. *Plant J.*, **42**: 35-48.

Ciardì JA and Klee HJ. (2001) Regulation of ethylene-mediated responses at the level of receptor. *Annals of Botany*, **88**: 813-22.

Clark KL, Larsen PB, Wang X and Chang C. (1998) Association of the Arabidopsis CTR1 Raf-like kinase with the ETR1 and ERS ethylene receptors. Proc. Natl. Acad. Sci USA., 95: 5401-6. Erratum in: Proc. Natl. Acad. Sci USA., **95**: 9060.

Cordes S, Deikman J, Margossian LJ and Fischer RL. (1989) Interaction of a developmentally regulated DNA-binding factor with sites flanking two different fruit-ripening genes from tomato. Plant Cell, **1**: 1025-34.

Coupe SA, Deikman J. (1997) Characterization of a DNA-binding protein that interacts with 5' flanking regions of two fruit-ripening genes. Plant J. Jun; **11(6)**:1207-18

Cunningham FX and Gantt E (1998). Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. Annu. Rev. Plant Phys. Plant Mol. Biol., **49**: 557-83.

D'Agostino IB, Deruere J and Kieber JJ. (2000) Characterization of the response of the Arabidopsis response regulator gene family to cytokinin. Plant Physiol., **124**: 1706-17.

Deikman J, Xu RL, Kneissl ML, Ciardi JA, Kim KN and Pelah D. (1998) Separation of cis elements responsive to ethylene, fruit development and ripening in the 5'-flanking region of ripening-related E8 gene. Plant Mol Biol., **37**: 1001-11.

Dharmasiri N, Dharmasiri S and Estelle M. (2005) The F-box protein TIR1 is an auxin receptor Nature, **435**: 441-5.

Dikstein R, Zhou S and Tjian R. (1996) Human TAFII 105 is a cell type-specific TFIID subunit related to hTAFII130. Cell, **87**: 137-46

Dill A, Jung HS, Sun TP. (2001) The DELLA motif is essential for gibberellin-induced degradation of RGA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **98**: 14162-7.

Dragoni I, Mariotti M, Consalez GG, Soria MR, Maier JA. (1998) EDF-1, a novel gene product down-regulated in human endothelial cell differentiation. J. Biol. Chem., **273**: 31119-24.

Eyal Y, Meller Y, Lev-Yadun S and Fluhr R. (1993) A basic-type PR-1 promoter directs ethylene responsiveness, vascular and abscission zone-specific expression. Plant J., **4**: 225-34.

Fainsod A, Bogarad LD, Ruusala T, Lubin M, Crothers DM and Ruddle FH. (1986) The homeo domain of a murine protein binds 5' to its own homeo box. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **83**: 9532-6.

Finkelstein RR, Wang ML, Lynch TJ, Rao S and Goodman HM. (1998) The Arabidopsis abscisic acid response locus ABI4 encodes an APETALA 2 domain protein. *Plant Cell*, **10**: 1043-54.

Finkelstein RR, Gampala SS and Rock CD. (2002) Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell*, **14**: Suppl: S15-45.

Fleet CM and Sun TP. (2005) A DELLAcate balance: the role of gibberellin in plant morphogenesis. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **8**: 77-85.

Fujimoto SY, Ohta M, Usui A, Shinshi H and Ohme-Takagi M. (2000) Arabidopsis ethylene-responsive element binding factors act as transcriptional activators or repressors of GCC box-mediated gene expression., *Plant Cell*, **12**: 393-404.

Gao Z, Chen YF, Randlett MD, Zhao XC, Findell JL, Kieber JJ and Schaller GE. (2003) Localization of the Raf-like kinase CTR1 to the endoplasmic reticulum of Arabidopsis through participation in ethylene receptor signaling complexes. *J. Biol. Chem.*, **278**: 34725-32.

Ghassemian M, Nambara E, Cutler S, Kawaide H, Kamiya Y and McCourt P. (2000) Regulation of abscisic acid signaling by the ethylene response pathway in Arabidopsis. *Plant Cell*, **12**: 1117-26.

Gillaspy G, Ben-David H and Gruissem W. (1993) Fruits: A Developmental Perspective. *Plant Cell*, **5**: 1439-51.

Godoy AV, Zanetti ME, San Segundo B and Casalongue CA. (2001) Identification of a putative *Solanum tuberosum* transcriptional coactivator up-regulated in potato tubers by *Fusarium solani* f. sp. *eumartii* infection and wounding. *Physiol Plant.*, **112**: 217-22.

Gomi K and Matsuoka M. (2003) Gibberellin signalling pathway. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **6**: 489-93

Goodrich JA and Tjian R. (1994) TBP-TAF complexes: selectivity factors for eukaryotic transcription. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **7**: 344-55.

Gray WM, Kepinski S, Rouse D, Leyser O and Estelle M. (2001) Auxin regulates SCF(TIR1)-dependent degradation of AUX/IAA proteins. *Nature*, **414**: 271-6.

Griffiths and Anthony J F. (2001) Modern genetic analysis: integrating genes and genomes. 2nd ed. New York : W.H. Freeman and Co.

Gu YQ, Yang C, Thara VK, Zhou J and Martin GB. Pti4 is induced by ethylene and salicylic acid, and its product is phosphorylated by the Pto kinase. *Plant Cell*, (2000) **12**: 771-86.

Gubler F, Chandler PM, White RG, Llewellyn DJ and Jacobsen JV. (2002) Gibberellin signaling in barley aleurone cells. Control of SLN1 and GAMYB expression. *Plant Physiol.*, **129**: 191-200.

Guilfoyle T, Hagen G, Ulmasov T and Murfett J. (1998) How does auxin turn on genes. *Plant Physiol.*, **118**: 341-7.

Guo H and Ecker JR. (2004) The ethylene signaling pathway: new insights. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **7**: 40-9.

Hall AE, Findell JL, Schaller GE, Sisler EC and Bleecker AB. (2000) Ethylene perception by the ERS1 protein in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, **123**: 1449-58.

Hamilton G. Chemical models and mechanisms for oxygenases. (1974) In: Hayaishi O ed<sup>o</sup>. Molecular mechanisms of oxygen activation. Academic press. New York, pp 405-451.

Hamilton AJ, Lycett GW and Grierson D. (1990) Antisense gene that inhibits synthesis of the hormone ethylene in transgenic plants *Nature* **346**: 284-287

Heyl A and Schmulling T. (2003) Cytokinin signal perception and transduction. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **6**: 480-8.

Himmelbach A, Yang Y and Grill E. (2003) Relay and control of abscisic acid signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **6**: 470-9.

Hochheimer A and Tjian R. (2003) Diversified transcription initiation complexes expand promoter selectivity and tissue-specific gene expression. *Genes Dev.*, **17**: 1309-20.

Hua J and Meyerowitz EM. (1998) Ethylene responses are negatively regulated by a receptor gene family in Arabidopsis thaliana. *Cell*, **94**: 261-71.

Hwang I and Sheen J. (2001) Two-component circuitry in Arabidopsis cytokinin signal transduction. *Nature*, **413**: 383-9.

Inoue T, Higuchi M, Hashimoto Y, Seki M, Kobayashi M, Kato T, Tabata S, Shinozaki K and Kakimoto T. (2001) Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from Arabidopsis. *Nature*, **409**: 1060-3.

Itzhaki H, Maxson JM and Woodson WR. (1994) An ethylene-responsive enhancer element is involved in the senescence-related expression of the carnation glutathione-S-transferase (GST1) gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **91**: 8925-9.

Jimenez A, Creissen G, Kular B, Firmin J, Robinson S, Verhoeyen M and Mullineaux P. (2002) Changes in oxidative processes and components of the antioxidant system during tomato fruit ripening. *Planta*, **214**: 751-8.

Jindra M, Gaziova I, Uhlirova M, Okabe M, Hiromi Y and Hirose S. (2004) Coactivator MBF1 preserves the redox-dependent AP-1 activity during oxidative stress in *Drosophila*. *EMBO J.*, **23**: 3538-47.

Jofuku KD, den Boer BG, Van Montagu M and Okamoto JK. (1994) Control of Arabidopsis flower and seed development by the homeotic gene APETALA2. *Plant Cell*, **6**: 1211-25.

Johnson PR and Ecker JR. (1998) The ethylene gas signal transduction pathway: a molecular perspective. *Annu. Rev. Genet.*, **32**: 227-54.

Kabe Y, Goto M, Shima D, Imai T, Wada T, Morohashi K, Shirakawa M, Hirose S and Handa H. (1999) The role of human MBF1 as a transcriptional coactivator. *J. Biol. Chem.*, **274**: 34196-202.

Kaneko M, Itoh H, Inukai Y, Sakamoto T, Ueguchi-Tanaka M, Ashikari M and Matsuoka M. (2003) Where do gibberellin biosynthesis and gibberellin signaling occur in rice plants. *Plant J.*, **35**: 104-15.

Kende H, van der Knaap E and Cho HT. (1998) Deepwater rice: A model plant to study stem elongation. *Plant Physiol.*, **118**: 1105-1110.

Khalil Ahmad, Q. Isolement et analyse fonctionnelle de deux promoteurs de genes exprimes dans le fruit chez la tomate. Thèse Institut National Polytechnique de Toulouse. 2003

Kepeczynski J and Kepeczynska E. (1997) Ethylene in seed dormancy and germination. *Physiol. Plant.*, **101**: 720-26.

Kepinski S and Leyser O. (2005) The Arabidopsis F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature*, **435**: 446-51.

Kieber JJ, Rothenberg M, Roman G, Feldmann KA and Ecker JR. (1993) CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in Arabidopsis, encodes a member of the raf family of protein kinases. *Cell*, **72**: 427-41.

Kitajima S and Sato F. (1999) Plant pathogenesis-related proteins: molecular mechanisms of gene expression and protein function. *J. Biochem.*, **125**: 1-8.

Klessig DF, Durner J, Noad R, Navarre DA, Wendehenne D, Kumar D, Zhou JM, Shah J, Zhang S, Kachroo P, Trifa Y, Pontier D, Lam E and Silva H. Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **97**: 8849-8855

Kneissl ML, Deikman J. (1996) The Tomato E8 Gene Influences Ethylene Biosynthesis in Fruit but Not in Flowers. *Plant Physiol. Oct*; **112(2)**: 537-547

Knoester M, van Loon LC, van den Heuvel J, Hennig J, Bol JF, Linthorst JM (1998) Ethylene-insensitive tobacco lacks nonhost resistance against soil-borne fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **95**: 1933-7

Lashbrook CC, Tieman DM and Klee HJ. (1998) Differential regulation of the tomato ETR gene family throughout plant development. *Plant J.*, **15**: 243-52.

Leclercq J, Adams-Phillips LC, Zegzouti H, Jones B, Latche A, Giovannoni JJ, Pech JC, Bouzayen M. (2002) LeCTR1, a tomato CTR1-like gene, demonstrates ethylene signaling ability in Arabidopsis and novel expression patterns in tomato. *Plant Physiol.* **130**:1132-42

Lelievre JM, Tichit L, Dao P, Fillion L, Nam YW, Pech JC and Latche A. (1997) Effects of chilling on the expression of ethylene biosynthetic genes in Passe-Crassane pear (*Pyrus communis* L.) fruits. *Plant Mol. Biol.*, **33**: 847-55.

Lemon B and Tjian R. (2000) Orchestrated response: A symphony of transcription factors for gene control. *Genes and Dev.*, **14**: 2551-69.

Lescot M, Déhais P, Thijs G, Marchal K, Moreau Y, Van de Peer Y, Rouzé P and Rombauts S. (2002) PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Res.*, **30**: 325-7.

Li FQ, Ueda H and Hirose S. (1994) Mediators of activation of fushi tarazu gene transcription by BmFTZ-F1. *Mol. Cell Biol.*, **14**: 3013-21.



Lin Z, Hackertt RM, Payton S and Grierson D. (1998) A tomato sequence (AJ005077) encoding an Arabidopsis CTR1 homologue. *Plant phys.*, **117**: 1125.

Lincoln JE, Coredes S, Read E and Fischer RL. (1987) Regulation of gene expression ethylene during *Lycopersicon esculentum* (tomato) fruit development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **84**: 2793-7.

Lincoln JE and Fischer RL. (1988). Diverse mechanisms for the regulation of ethylene-inducible gene expression. *Mol. Gen. Genet.*, **212**: 71-5.

Liu QX, Jindra M, Ueda H, Hiromi Y and Hirose S. (2003) *Drosophila* MBF1 is a co-activator for Tracheae Defective and contributes to the formation of tracheal and nervous systems. *Development*, **130**: 719-28.

Locke JM, Bryce JH, Morris PC. (2000) Contrasting effects of ethylene perception and biosynthesis inhibitors on germination and seedling growth of barley (*Hordeum vulgare* L.). *J. Exp. Bot.*, **51**: 1843-9.

Lorenzo O, Piqueras R, Sanchez-Serrano JJ and Solano R. (2003) ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *Plant Cell*, **15**: 165-78.

Lund ST, Stall RE and Klee HJ. (1998) Ethylene regulates the susceptible response to pathogen infection in tomato. *Plant Cell*, **10**: 371-82.

MAPK Group. (2002). Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature *Trends Plant Sci*, **7**: 301-308

Mariotti M, De Benedictis L, Avon E and Maier JA. (2000) Interaction between endothelial differentiation-related factor-1 and calmodulin in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.*, **275**: 24047-51.

Matsushita Y, Miyakawa O, Deguchi M, Nishiguchi M and Nyunoya H. (2002) Cloning of a tobacco cDNA coding for a putative transcriptional coactivator MBF1 that interacts with the tomato mosaic virus movement protein. *J. Exp. Bot.*, **53**: 1531-2.

Mayordomo I and Sanz P. (2002) The *Saccharomyces cerevisiae* 14-3-3 protein Bmh2 is required for regulation of the phosphorylation status of Fin1, a novel intermediate filament protein. *Biochem. J.*, **365**: 51-6.

Mitchell PJ and Tjian R. (1989) Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science*, **245**: 371-8.

Mittler R, Merquiol E, Hallak-Herr E, Rachmilevitch S, Kaplan A and Cohen, M. (2001) Living under a dormant canopy: a molecular acclimation mechanism of the desert plant *Retama raetam*. *Plant J.*, **25**: 407-16.

Mok DW and Mok MC. (2001) CYTOKININ METABOLISM AND ACTION. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.*, **52**: 89-118

Møller SG and Chua NH. (1999) Interactions and intersections of plant signaling pathways. *J. Mol. Biol.*, **293**: 219-34.

Montgomery J, Goldam S, Deikman J, Margossian L and Fischer RL. (1993) Identification of an ethylene-responsive region in the promoter of a fruit ripening gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **90**: 5939-43.

Moore S., Vrebalov J., Payton P., and Giovannoni JJ. (2002) Use of genomics tools to isolate key ripening genes and analyse fruit maturation in tomato. *J. Exp. Bot.*, **53**: 2023-30.

Mueller L. A., Solow T. H., Taylor N., Skwarecki B., Buels R., Binns J., Lin C., Wright M. H., Ahrens R., Wang Y., Herbst E. V., Keyder E. R., Menda N., Zamir D., and Tanksley S. D. (2005) The SOL Genomics Network. A Comparative Resource for Solanaceae Biology and Beyond. *Plant Phys.*, **138**: 1310-7.

Munné-Bosch S, Penuelas J, Asensio D and Llusia J. (2004) Airborne ethylene may alter antioxidant protection and reduce tolerance of holm oak to heat and drought stress. *Plant Physiol.*, **136**: 2937-47.

Nicholass FJ, Smith CJ, Schuch W, Bird CR, Grierson D. (1995) High levels of ripening-specific reporter gene expression directed by tomato fruit polygalacturonase gene-flanking regions. *Plant Mol Biol.* **28**:423-35

Nole-Wilson S and Krizek BA. (2000) DNA binding properties of the Arabidopsis floral development protein AINTEGUMENTA. *Nucleic Acids Res.*, **28**: 4076-82. Erratum in: *Nucleic Acids Res.*, (2001) **29**: 1261.

Oeller P W, Min-Wong L, Taylor L P, Pike D A Theologis A (1991) Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA. *Science*, **254**: 436-439.

Ogawa M, Hanada A, Yamauchi Y, Kuwahara A, Kamiya Y and Yamaguchi S. (2003) Gibberellin biosynthesis and response during Arabidopsis seed germination. *Plant Cell.* **15**: 1591-604. Erratum in: *Plant Cell.* (2004) **16**:783.

Ohme-Takagi M and Shinshi H. (1995) Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. *Plant Cell.*, **7**: 173-82.

Ohta M, Matsui K, Hiratsu K, Shinshi H and Ohme-Takagi M. (2001) Repression domains of class II ERF transcriptional repressors share an essential motif for active repression. *Plant Cell*, **13**: 1959-68.

Onate-Sanchez L and Singh KB. (2002) Identification of Arabidopsis ethylene-responsive element binding factors with distinct induction kinetics after pathogen infection. *Plant Physiol.* **128**: 1313-22.

Ouaked F, Rozhon W, Lecourieux D and Hirt H. (2003) A MAPK pathway mediates ethylene signaling in plants. *EMBO J.*, **22**: 1282-8.

Ozaki J, Takemaru KI, Ikegami T, Mishima M, Ueda H, Hirose S, Kabe Y, Handa H and Shirakawa M. (1999) Identification of the core domain and the secondary structure of the transcriptional coactivator MBF1. *Genes Cells*, **4**: 415-24.

Park JM, Park CJ, Lee SB, Ham BK, Shin R and Paek KH. (2001) Overexpression of the tobacco Tsi1 gene encoding an EREBP/AP2-type transcription factor enhances resistance against pathogen attack and osmotic stress in tobacco. *Plant Cell*, **13**: 1035-46.

Payton S, Fray RG, Brown S and Grierson D. (1996) Ethylene receptor expression is regulated during fruit ripening, flower senescence and abscission. *Plant Mol. Biol.*, **31**: 1227-31.

Peng J and Harberd NP. (2002) The role of GA-mediated signalling in the control of seed germination. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **5**: 376-81.

Picton S, Barton SL, Bouzayen M, Hamilton AJ and Grierson D. (1993) Altered fruit ripening and leaf senescence in tomatoes expressing an antisense ethylene-forming enzyme transgene. *Plant J.*, **3**: 469-81.

Pnueli L, Hallak-Herr E, Rozenberg M, Cohen M, Goloubinoff P, Kaplan A and Mittler R. (2002) Molecular and biochemical mechanisms associated with dormancy and drought tolerance in the desert legume *Retama raetam*. *Plant J.*, **31**: 319-30.

Qu X and Schaller GE. (2004) Requirement of the histidine kinase domain for signal transduction by the ethylene receptor ETR1. *Plant Physiol.*, **136**: 2961-70.

Raven, PH, Evert RF and Eichhorn SE. (1992). *Biology of Plants*, 6e édition Ed DeBoeck .

Reed JW. Roles and activities of Aux/IAA proteins in Arabidopsis. (2001) *Trends Plant Sci.*, **6**: 420-5.

Riechmann JL, Heard J, Martin G, Reuber L, Jiang C, Keddie J, Adam L, Pineda O, Ratcliffe OJ, Samaha RR, Creelman R, Pilgrim M, Broun P, Zhang JZ, Ghandehari D, Sherman BK and Yu G. (2000) Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science*, **290**: 2105-10.

Rizhsky L, Liang H and Mittler R. (2002) The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. *Plant Physiol.*, **130**: 1143-51.

Rizhsky L, Liang H, Shuman J, Shulaev V, Davletova S and Mittler R. (2004) When defense pathways collide. The response of Arabidopsis to a combination of drought and heat stress. *Plant Physiol.*, **134**: 1683-96.

Schaller GE and Bleecker AB. (1995) Ethylene-binding sites generated in yeast expressing the Arabidopsis ETR1 gene. *Science*, **270**: 1809-11.

Seo S, Sano H and Ohashi Y. (1999) Jasmonate-based wound signal transduction requires activation of WIPK, a tobacco mitogen-activated protein kinase. *Plant Cell*, **11**: 289-98.

Shaulian E and Karin M. (2002) AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat. Cell Biol.*, **4**: E131-6.

Sheen J. (2002) Phosphorelay and transcription control in cytokinin signal transduction. *Science* **296**: 1650-2. Erratum in: *Science* (2002) **298**:1172.

Shinozaki K and Yamaguchi-Shinozaki K. (1997) Gene Expression and Signal Transduction in Water-Stress Response. *Plant Physiol.*, **115**: 327-34.

Singh K, Foley RC and Onate-Sanchez L. (2002) Transcription factors in plant defense and stress responses. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **5**: 430-6.

Smith ML, Johanson RA, Rogers KE, Coleman PD and Slemmon JR. (1998) Identification of a neuronal calmodulin-binding peptide, CAP-19, containing an IQ motif. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, **62**: 12-24.

Solano R, Stepanova A, Chao Q and Ecker JR. (1998) Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1. *Genes Dev.*, **12**: 3703-14.

Song CP, Agarwal M, Ohta M, Guo Y, Halfter U, Wang P and Zhu JK. (2005) Role of an Arabidopsis AP2/EREBP-type transcriptional repressor in abscisic acid and drought stress responses. *Plant Cell*, **17**: 2384-96.

Suzuki T, Miwa K, Ishikawa K, Yamada H, Aiba H and Mizuno T. (2001) The Arabidopsis sensor His-kinase, AHk4, can respond to cytokinins. *Plant Cell Physiol.*, **42**: 107-13.

Suzuki N, Rizhsky L, Liang H, Shuman J, Shulaev V and Mittler R. (2005) Enhanced tolerance to environmental stress in transgenic plants expressing the transcriptional coactivator multiprotein bridging factor 1c. *Plant Physiol.*, **139**: 1313-22.

Tanksley SD, Ganai MW, Prince JP, de-Vicente MC, Bonierbale MW, Broun P, Fulton TM, Giovannoni JJ, Grandillo S, Martin GB, Messeguer R, Miller JC, Miller L, Paterson AH, Pineda O, Roder MS, Wing RA, Wu W. and Young ND. (1992) High density molecular linkage map of the tomato and potato genome. *Genetics*, **132**: 1141-60

Takemaru K, Li FQ, Ueda H and Hirose S. (1997) Multiprotein bridging factor 1 (MBF1) is an evolutionarily conserved transcriptional coactivator that connects a regulatory factor and TATA element-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **94**: 7251-6.

Takemaru K, Harashima S, Ueda H and Hirose S. (1998) Yeast coactivator MBF1 mediates GCN4-dependent transcriptional activation. *Mol. Cell Biol.*, **18**: 4971-6.

Thara VK, Tang X, Gu YQ, Martin GB and Zhou JM. (1999) *Pseudomonas syringae* pv tomato induces the expression of tomato EREBP-like genes *pti4* and *pti5* independent of ethylene, salicylate and jasmonate. *Plant J.*, **20**: 475-83.

Theologis A. (1992) One rotten apple spoils the whole bushel: the role of ethylene in fruit ripening. *Cell*, **70**: 181-4.

Tieman DM and Klee HJ. (1999) Differential expression of two novel members of the tomato ethylene-receptor family. *Plant Physiol.*, **120**: 165-72.

Tieman DM, Ciardi JA, Taylor MG and Klee HJ. (2001) Members of the tomato LeEIL (EIN3-like) gene family are functionally redundant and regulate ethylene responses throughout plant development. *Plant J.*, **26**: 47-58.

- Tournier B, Sanchez-Ballesta MT, Jones B, Pesquet E, Regad F, Latche A, Pech JC and Bouzayen M. (2003) New members of the tomato ERF family show specific expression pattern and diverse DNA-binding capacity to the GCC box element. *FEBS Lett.*, **550**: 149-54.
- Tsuchisaka A and Theologis A. (2004) Unique and overlapping expression patterns among the Arabidopsis 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase gene family members. *Plant Physiol.*, **136**: 2982-3000.
- Tsuda K, Tsuji T, Hirose S and Yamazaki K. (2004) Three Arabidopsis MBF1 homologs with distinct expression profiles play roles as transcriptional co-activators. *Plant Cell Physiol.*, **45**: 225-31.
- Tsuda K and Yamazaki K. (2004) Structure and expression analysis of three subtypes of Arabidopsis MBF1 genes. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1680**: 1-10.
- Ueguchi C, Sato S, Kato T and Tabata S. (2001) The AHK4 gene involved in the cytokinin-signaling pathway as a direct receptor molecule in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol.* **42**: 751-5.
- Ulmasov T, Hagen G and Guilfoyle TJ. (1999) Activation and repression of transcription by auxin-response factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **96**: 5844-9.
- Van Haaren MJ and Houck CM. (1993) A functional map of the fruit-specific promoter of the tomato 2A11 gene. *Plant Mol. Biol.*, **21**: 625-40.
- Ververis P and John P. (1991) Complete recovery in vitro of ethylene forming enzyme activity. *Phytochemistry*, **30**: 725-7.
- Vrebalov J, Ruezinsky D, Padmanabhan V, White R, Medrano D, Drake R, Schuch W and Giovannoni J. (2002) A MADS-box gene necessary for fruit ripening at the tomato ripening-inhibitor (rin) locus. *Science*, **296**: 343-6.
- Wilkinson JQ, Lanahan MB, Yen HC, Giovannoni JJ and Klee HJ. (1995) An ethylene-inducible component of signal transduction encoded by never-ripe. *Science*, **270**: 1807-9.
- Yang SF and Hoffman NE. (1984) Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annu. Rev. Plant. Physiol.*, **35**: 155-89.
- Yokotani N, Tamura S, Nakano R, Inaba A and Kubo Y. (2003) Characterization of a novel tomato EIN3-like gene (LeEIL4). *J. Exp. Bot.*, **54**: 2775-6.

Zanetti ME, Blanco FA, Daleo GR and Casalongue CA. (2003) Phosphorylation of a member of the MBF1 transcriptional co-activator family, StMBF1, is stimulated in potato cell suspensions upon fungal elicitor challenge. *J. Exp. Bot.*, **54**: 623-32.

Zegzouti H, Jones B, Frasse P, Marty C, Maitre B, Latch A, Pech JC and Bouzayen M. (1999) Ethylene-regulated gene expression in tomato fruit: characterization of novel ethylene-responsive and ripening-related genes isolated by differential display. *Plant J.*, **18**: 589-600.

Zenser N, Ellsmore A, Leasure C and Callis J. (2001) Auxin modulates the degradation rate of Aux/IAA proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **98**: 11795-800.

Zhang H, Huang Z, Xie B, Chen Q, Tian X, Zhang X, Zhang H, Lu X, Huang D and Huang R. (2004) The ethylene-, jasmonate-, abscisic acid- and NaCl-responsive tomato transcription factor JERF1 modulates expression of GCC box-containing genes and salt tolerance in tobacco. *Planta*, **220**: 262-70.

Zhou D, Kalaitzis P, Mattoo AK and Tucker ML. (1996) The mRNA for an ETR1 homologue in tomato is constitutively expressed in vegetative and reproductive tissues. *Plant Mol. Biol.*, **30**: 1331-8.

Zhou J, Tang X and Martin GB. (1997) The Pto kinase conferring resistance to tomato bacterial speck disease interacts with proteins that bind a cis-element of pathogenesis-related genes. *EMBO J.*, **16**: 3207-18.

Zhu J, Gong Z, Zhang C, Song CP, Damsz B, Inan G, Koiwa H, Zhu JK, Hasegawa PM and Bressan RA. (2002) OSM1/SYP61: a syntaxin protein in Arabidopsis controls abscisic acid-mediated and non-abscisic acid-mediated responses to abiotic stress. *Plant Cell*, **14**: 3009-28.

**TITRE:** La régulation transcriptionnelle dépendant de l'éthylène. Caractérisation fonctionnelle d'un cofacteur transcriptionnel du type MBF1 et d'un facteur de transcription de la famille des ERF chez la tomate.

**RESUME:** La phytohormone éthylène contrôle des étapes importantes de la vie de la plante comme la germination, la maturation des fruits et la réponse aux stress biotiques et abiotiques. L'éthylène exerce ses effets physiologiques en modulant l'expression de gènes cibles par l'intermédiaire des facteurs de transcription. De ce fait, la caractérisation des facteurs de transcription associés à la réponse à l'éthylène est une étape fondamentale pour la compréhension des processus régulés physiologiques régulés par cette hormone. Ce travail décrit l'isolement et la caractérisation fonctionnelle de la famille de coactivateurs transcriptionnels de type MBF1 (Multiprotéine Bridging Factor 1) et d'un facteur de transcription de la famille des ERF (Ethylene Response Factor) chez la tomate. Notre étude montre que la famille des MBF1 chez la tomate comprend quatre gènes (*LeMBF1a*, *LeMBF1b*, *LeMBF1c* et *LeMBF1/ER24*) qui sont tous capables de compléter un mutant de la levure indiquant qu'il y a une parfaite conservation fonctionnelle de ces gènes de la levure aux plantes supérieures. Les études d'expression révèlent un profil spécifique pour ER24 qui est fortement exprimé en réponse à l'éthylène, au cours de la maturation des fruits et en réponse à différents stress abiotiques. Le criblage par double-hybride de la levure a permis d'identifier plusieurs partenaires des protéines MBF1 chez la tomate parmi lesquels des protéines associées à la maturation et aux stress abiotiques. La surexpression du gène *LeMBF1/ER24* chez *Arabidopsis* confère une tolérance au stress thermique. Par ailleurs, nous avons isolé et caractérisé le gène *LeERF2* de la tomate qui appartient à la grande famille des ERF (Ethylene Response Factor) codant pour des facteurs de transcription spécifiques aux plantes. L'expression du gène *LeERF2* est induite durant la maturation des fruits et en réponse à la blessure. La surexpression de ce gène dans la tomate induit une germination précoce des graines et affecte la formation du crochet apical, un processus de développement régulé par l'éthylène. L'expression du gène de la mannanase2, un marqueur de la germination, est fortement induite dans les graines transgéniques sur-exprimant le gène *LeERF2* suggérant que *LeERF2* stimule la germination à travers l'induction de ce gène. Ce travail a permis d'identifier de nouveaux acteurs de la régulation transcriptionnelle associée à l'action de l'éthylène et d'apporter un nouvel éclairage sur le mode d'action de cette hormone.

**MOTS CLES:** Ethylène, transcription, fruit, tomate, stress abiotique, germination.

**TITLE:** Ethylene-dependent transcriptional regulation. Functional characterisation of a MBF1 type transcriptional coactivator and an ERF transcription factor in tomato.

**ABSTRACT:** The plant hormone ethylene controls important developmental processes such as seed germination, fruit ripening and responses to biotic and abiotic stresses. Transcription factors are key regulators by which ethylene modulates the expression of target genes. Therefore, the characterisation of ethylene transcription factors is a fundamental step towards understanding the mechanisms by which ethylene impacts plant development. We report here the isolation and functional characterisation of the MBF1 (Multiprotein Bridging Factor 1) family of transcriptional coactivators and *LeERF2*, a member of the ERF (Ethylene Response Factor) family of transcription factors in the tomato. We show that in the tomato, MBF1 is encoded by a small multigene family of four members (*LeMBF1a*, *LeMBF1b*, *LeMBF1c* et *LeMBF1/ER24*) all capable to rescue the yeast MBF1 mutant indicating a functional conservation of these genes from yeast to higher plants. Expression studies revealed a distinct pattern for ER24 whose transcripts accumulate in response to ethylene, during fruit ripening and upon abiotic stress treatments. A number of putative MBF1-partner proteins were isolated in the tomato by yeast-two-hybrid screening among which abiotic stress and ripening-associated proteins. Transgenic *Arabidopsis* lines expressing the *LeMBF1/ER24* gene exhibited enhanced tolerance to heat-shock. This research project also dealt with the isolation and characterisation of *LeERF2* a tomato member of the plant specific ERF (Ethylene Response Factor) family of transcription factors. *LeERF2* showed a distinctive ripening and wound-induced pattern of expression. Over-expression of the *LeERF2* gene in the tomato resulted in premature seed germination and altered ethylene response as assessed by abnormal hook formation in the seedlings. The expression of the *mannanase2* gene is dramatically enhanced in the transgenic expressing seeds suggesting that *LeERF2* stimulates seed germination via the induction of the *mannanase2* gene. The work presented here identifies novel components of ethylene-associated transcriptional regulation in the tomato and brings new insight on the complex mode of action of this phytohormone.

**KEY WORDS:** Ethylene, transcription, fruit, tomato, abiotic stress, germination.