



HAL
open science

**Etude du rôle des inhibiteurs de
kinases-cycline-dépendantes (CKI) de la classe des
SIM/SMR en réponse au stress abiotique chez
Arabidopsis thaliana**

Geneviève Lamy

► **To cite this version:**

Geneviève Lamy. Etude du rôle des inhibiteurs de kinases-cycline-dépendantes (CKI) de la classe des SIM/SMR en réponse au stress abiotique chez Arabidopsis thaliana. Sciences agricoles. Université de Strasbourg, 2013. Français. NNT : 2013STRAJ013 . tel-00919383

HAL Id: tel-00919383

<https://theses.hal.science/tel-00919383>

Submitted on 16 Dec 2013

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.

ÉCOLE DOCTORALE Sciences de la vie et de la santé
Institut de Biologie Moléculaire des Plantes

THÈSE présentée par :

Geneviève LAMY

soutenue le : **29 mai 2013**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : **ASPECTS MOLECULAIRE ET CELLULAIRE DE LA
BIOLOGIE**

**Etude du rôle des inhibiteurs de
kinases-cycline-dépendantes (CKI) de la
classe des SIM/SMR en réponse au
stress abiotique chez *Arabidopsis
thaliana***

THÈSE dirigée par :

M. GENSCHIK Pascal

Directeur de recherche, université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mme GRANIER Christine

Directrice de recherche, LEPSE

M. CHEVALIER Christian

Directeur de recherche, INRA Bordeaux

AUTRES MEMBRES DU JURY :

M. SCHNITTGER Arp

Directeur de recherche, IBMP

Université De Strasbourg

Thèse de Doctorat

Discipline : Sciences du Vivant

Discipline : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

présentée

à la Faculté des Sciences de la Vie

par

Geneviève Lamy

Pour obtenir le titre de

Docteur de l'Université De Strasbourg

**Etude du rôle des inhibiteurs de kinases-cycline-dépendantes (CKI) de la classe des
SIM/SMR en réponse au stress abiotique chez *Arabidopsis thaliana***

Soutenue le 29 mai 2013 devant le jury composé de :

Dr Christine Granier

Rapporteur externe

Dr Christian Chevalier

Rapporteur externe

Dr Arp Schnittger

Examineur

Dr Pascal Genschik

Directeur de thèse

Unité de Recherche

Institut de Biologie Moléculaires des Plantes

UPR CNRS 2357

Remerciements

Je remercie Pascal Genschik de m'avoir accueillie dans son équipe pendant ces quatre années, d'avoir dirigé ce travail de thèse, et de m'avoir ainsi permis d'évoluer dans le domaine de la recherche.

Je tiens à remercier les Docteurs Christine Granier, Christian Chevalier et Arp Schnittger de me faire l'honneur de juger mon travail de thèse.

Je remercie les Professeurs Lieven De Veylder et Dirk Inzé pour m'avoir accueillie au PBS-VIB, et également aux membres de leurs équipes, Pieter Clauw, Hilde Van den Daele, Sara Maes, Lieven Volckaert et Nathalie Gonzalez pour m'avoir apporté leur expertise technique : Danku !

Je remercie le Professeur John Larkin pour le matériel biologique qu'il m'a confié.

Je remercie les responsables de plateformes Valérie Cognat, Malek Alioua et Nicolas Baumberger ainsi que Hélène Zuber pour le support technique qu'ils m'ont apporté en bioinformatique, séquençage, purification de protéine et analyse statistique.

Je remercie Pascaline Ulmann pour son soutien, son engagement et sa passion communicative pour l'enseignement.

Je remercie chaleureusement tous les membres du labo 612, les anciens, les présents et les désormais 626, pour leurs soutiens et les conseils prodigués tout au long de cette thèse. Merci Sandra pour ton aide et surtout pour ton soutien attentif et bienveillant. Merci Thomas pour tes conseils scientifiques toujours pertinents et pour les nombreux services que tu m'as rendus. Merci Patrick pour avoir encadré mon travail avec beaucoup de sérieux et de bonne humeur dans mes premières années de thèse. Merci Esther pour ta disponibilité et ton soutien amical (et pour tes fameux gâteaux bien sûr !). Merci Benoît pour ton écoute et ton soutien amical. Merci Marie-Claire pour ton soutien toujours discret et sincère. Merci Jean-Michel pour les grands services que tu m'as rendus et pour ta bienveillance. Merci aux experts des solutions-à-toutes-sortes-de-pépins : Sabrina, Alexis, Thomas et Michaël, merci aussi pour votre bonne humeur. Les inoubliables, Yves et Marina, merci pour vos sourires. Merci à tous membres du « 4^{ème} » pour avoir été présents dans les moments difficiles, merci pour votre sens du service et de l'écoute et votre optimisme.

Je remercie affectueusement tous mes proches, ma famille, Bénédicte, Ségolène, Marguerite, Armand Marion, Nabil, Florian, Adèle mes amis et ma famille aussi, Laure, Anne, Laetitia, Sofia, Gaëlle, Dorothée, Hélène, Emilie, Muriel, Rossella, Youn-Jeong, Magali, mes colocs, Audrey, Lucie, Isabel, Morgane, Antoine, José, Tarik, Pierre et Schweppes... bref tous ceux qui ont été à mes côtés au long cours de ma vie étudiante, pour votre amitié : merci !

A mes héroïnes Bénédicte, Sofia, Lucie, Audrey, Gaëlle, Flore, Dorothée, Laetitia, Laure, Esther, Muriel, Anne et Isabel, et toutes celles qui dissimulent derrière un sourire leur courage inépuisable, vous m'inspirez tous les jours, merci !

SOMMAIRE

I - INTRODUCTION

I - PRINCIPES GENERAUX DU CYCLE CELLULAIRE CHEZ LES EUKARYOTES

I-1 MECANISMES GENERAUX DE LA MITOSE	19
I-1-1 Les grands évènements du cycle cellulaire eucaryote	19
I-1-2 Les complexes Cyclines/CDK associés aux CKI sont les régulateurs fondamentaux du cycle cellulaire	20
I-1-2-1 Le mécanisme fondamental de régulation du cycle repose sur l'activité des CDK	20
I-1-2-1-1 Les complexes Cyclines/CDK : clés de voûte de la progression du cycle	20
I-1-2-1-2 L'activité des kinases de type CDK : un mécanisme sous haute régulation	21
I-1-2-2 Les régulateurs fondamentaux du cycle	23
I-1-2-2-1 Les différentes CDK chez les eucaryotes	23
I-1-2-2-2 Les différentes cyclines (CYC) chez les eucaryotes	24
I-1-2-2-3 Les inhibiteurs de cycline/CDK (CKI)	24
I-2 LES VARIANTES DU CYCLE CELLULAIRE	25
I-2-1 Les divisions asymétriques	27
I-2-2 L'endocycle	27
I-3 LES BASES MOLECULAIRES DU MECANISME DE PROGRESSION ENTRE LES PHASES DU CYCLE	29
I-3-1 Comparaison du nombre de régulateurs de base du cycle cellulaire chez les eucaryotes	29
I-3-2 La transition G1/S	30
I-3-3 La transition G2/M	32
I-3-4 La transition cycle mitotique/endoréplication	33
I-3-4-1 La répression de l'activité kinase des CDK par les CKI	33
I-3-4-2 La dégradation spécifique des cyclines	34
I-3-4-3 L'induction de la machinerie de réplication	34
I-3-4-4 Le maintien de l'endocycle	35
I-4 LE MECANISME DE REGULATION DU CYCLE CELLULAIRE PAR PROTEOLYSE UBIQUITINE 26S PROTEASOME-DEPENDANTE	35
I-4-1 La base du mécanisme	35
I-4-2 Les acteurs de la voie d'ubiquitination	37
I-4-2-1 L'ubiquitine	37
I-4-2-2 L'enzyme d'activation, E1	37
I-4-2-3 L'enzyme de conjugaison de l'ubiquitine, E2	37
I-4-2-4 L'enzyme de liaison de l'ubiquitine, E3	38
I-4-2-5 L'enzyme E4	39
I-4-3 La protéolyse par le protéasome 26S	40
I-4-4 La régulation par modification du substrat cible	40
I-4-5 Le cas de la régulation des CKI par l'UPS lors du cycle cellulaire	40
I-4-3-1 Cas de la régulation de Sic1 par l'UPS chez la levure	41
I-4-3-2 Cas de la régulation des CIP/KIP par l'UPS chez les mammifères	41
I-4-3-3 Cas de la régulation des KRP par l'UPS chez les plantes	42
II – LES CKI SPECIFIQUES DES PLANTES DE LA FAMILLE SIM/SMR CHEZ ARABIDOPSIS THALIANA	42
II-1 PHYLOGENIE ET STRUCTURE DES PROTEINES DES FAMILLES KRP ET SIM/SMR	43
II-2 FONCTIONS DES KRP	45
II-3 FONCTIONS DES SIM/SMR DANS LE CYCLE CELLULAIRE	46
II-3-1 La caractérisation du mutant <i>sim</i> révèle le rôle de SIM comme régulateur du cycle cellulaire	46
II-3-2 Le phénotype drastique du surexpresser de SIM met en exergue sa fonction de régulateur du cycle	47
II-3-3 La fonction des SIM/SMR au niveau moléculaire	48
II-4 REGULATION TRANSCRIPTIONNELLE DES <i>SIM/SMR</i>	50
II-4-1 L'induction de SIM par les facteurs de transcription de type GLABRA	50

II-4-2 Influence des voies de signalisation hormonales sur l'expression des CKI	50
II-4-3 Modulation de l'expression des CKI en réponse aux stress environnementaux	51
III – L'EFFET DU STRESS HYDRIQUE SUR LA CROISSANCE CHEZ ARABIDOPSIS	52
III-1 LA CROISSANCE DES FEUILLES EN CONDITION STANDARD CHEZ ARABIDOPSIS	52
III-2 EFFETS DU STRESS HYDRIQUE SUR LES PARAMETRES DE CROISSANCE DES PLANTES	54
III-3 TECHNIQUES EXPERIMENTALES D'APPLICATION DU STRESS HYDRIQUE ET DE PHENOTYPAGE	56
II - MATERIEL ET METHODES	61
<hr/>	
I - MATERIEL	63
I-1- MATERIEL VEGETAL	63
I-1-1 <i>Arabidopsis thaliana</i>	63
I-1-1-1 <i>Arabidopsis thaliana</i> sauvages	63
I-1-1-2 <i>Arabidopsis thaliana</i> mutantes	63
I-1-1-3 Autres lignées <i>Arabidopsis thaliana</i> transgéniques	64
I-1-2- <i>Nicotiana benthamiana</i>	64
I-2 SOUCHES BACTERIENNES	65
I-2-1 <i>Escherichia coli</i>	65
I-2-1-1 <i>Escherichia coli</i> , souche DB3.1 (Invitrogen)	65
I-2-1-2 <i>Escherichia coli</i> , souche Top10 (Invitrogen)	65
I-2-2 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	66
II - METHODES	66
II-1 TECHNIQUES RELATIVES AUX PLANTES	66
II-1-1 Conditions de culture	66
II-1-1-1 Culture d' <i>Arabidopsis thaliana</i> in vitro	66
II-1-1-2 Culture d' <i>Arabidopsis thaliana</i> en sol	67
II-1-2 Techniques de transformation de plantes	67
II-1-2-1 Transformation stable d' <i>Arabidopsis</i>	67
II-1-2-2 Transformation transitoire de <i>Nicotiana benthamiana</i>	67
II-1-2-3 Transformation transitoire de cellules BY-2	68
II-1-3 Traitements au cycloheximide et au MG132	68
II-1-4 Expérimentations de stress hydrique sur plantes d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	69
II-1-4 -1 Stress hydrique sévère en sol	69
II-1-4 -1-1 Conditions « serres IBMP »	69
II-1-4 -1-2 Conditions « serres PSB-VIB »	69
II-1-4 -1-3 Conditions en chambre de culture « SANYO »	70
II-1-4 -2 Stress hydrique modéré en sol dans le WIWAM	70
II-2 TECHNIQUES RELATIVES AUX ANALYSES ADN	72
II-2-1 Purification d'ADN	72
II-2-2 Purification des produits de PCR	72
II-2-3 Techniques de clonage « Gateway » (Invitrogen)	72
II-3 TECHNIQUES ASSOCIEES AU CLONAGE BACTERIEN	73
II-3-1 Préparation de bactéries compétentes	74
II-3-2 Transformation des bactéries par choc thermique et électroporation	74
II-3-3 Analyse des clones bactériens	75
II-4 TECHNIQUES RELATIVES AUX ANALYSES ARN	75
II-4-1 Extraction des ARN totaux de plante	75
II-4-2 Retro-transcription de l'ARN et PCR quantitative	75
II-5 TECHNIQUES D'ANALYSES PROTEIQUES	76
II-5-1 Extraction de protéines totales de plantes	76
II-5-2 Quantification de protéines totales à l'Amidoblack	77
II-5-3 Western-blot	77
II-5-4 Coloration GUS	78
II-6 TECHNIQUES DE MICROSCOPIE ET DE MESURE CELLULAIRE	79

II-6-1 Microscopie	79
II-6-2 Surface foliaire sur « série de feuilles »	79
II-6-3 Comptage cellulaire	79
II-6-4 Mesure de la ploïdie par cytométrie de flux	80
II-7 TECHNIQUES DE BIOINFORMATIQUE ET DE STATISTIQUE	80
II-7-1 Alignement de séquences protéiques	80
II-7-2 Analyse phylogénétique	81
II-7-3 Prédiction de séquence d'adressage	81
II-7-4 Analyse statistique	81
III - RESULTATS	83
I- PHYLOGENIE ET STRUCTURE DES PROTEINES CKI	85
I-1- ANALYSE PHYLOGENETIQUE DES 2 FAMILLES DE PROTEINES CKI CHEZ <i>ARABIDOPSIS</i>	85
I-2 ANALYSE COMPARATIVE DE LA FAMILLE SIM/SMR CHEZ <i>A. THALIANA</i>	86
I-3 ANALYSE COMPARATIVE DES DOMAINES DE LIAISON AUX CYCLINES/CDK DES CKI CHEZ <i>ARABIDOPSIS</i>	87
I-4 ANALYSE COMPARATIVE DES SEQUENCES HOMOLOGUES DE AT-SIM CHEZ DIFFERENTES ESPECES DE PLANTES	90
II- ETUDE DE LA REGULATION DES CKI D'<i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	91
II-1- ETUDE DE LA REGULATION TRANSCRIPTIONNELLE	91
II-1-1 L'expression des CKI d'après les données publiques de « microarray »	91
II-1-2 Analyse quantitative de l'expression de gènes <i>SIM/SMR in planta</i>	92
II-1-3 Etudes des profils d'expression des gènes <i>SIM/SMR</i> dans les plantules	93
II-2- ETUDES DE LA LOCALISATION SUBCELLULAIRE ET DE LA REGULATION POST-TRADUCTIONNELLE	97
II-2-1- Etude de la compartimentation des protéines CKI d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	97
II-2-1-1- Etude de la compartimentation des CKI <i>in planta</i>	97
II-2-1-2- Etude de la séquence d'adressage de SIM et KRP2	97
II-2-2- Etude de la régulation post-traductionnelle des CKI d' <i>A. thaliana</i>	99
II-2-3- Etude des éléments de régulation par la voie UPS des CKI d' <i>A. thaliana</i>	103
II-2-3-1 Etude du motif « dégron »	103
II-2-3-2 Etude du rôle des lysines	103
III- ETUDE DE LA FONCTION DES SIM/SMR EN CONDITION NORMALE DE DEVELOPPEMENT	105
III-1- CARACTERISATION DU PHENOTYPE DEVELOPPEMENTAL DES MUTANTS <i>SIM/SMR</i>	105
III-1-1 Etude du phénotype des trichomes des mutants <i>sim/smr</i>	105
III-1-2 Etude de l'endoréplication au niveau des feuilles des mutants <i>sim/smr</i>	107
III-1-3- Etude du phénotype racinaire des mutants <i>sim/smr</i>	109
III-1-4- Etude du phénotype des rosettes des mutants <i>sim/smr</i>	111
III-1-4-1 Etude du nombre de feuilles et de l'aire des rosettes des mutants	111
III-1-4-2 Etude de l'aire des feuilles des mutants	113
III-1-4-3 Etude de la croissance en longueur des feuilles et des pétioles des mutants	113
III-1-4-4 Etude de l'aire des cellules épidermales des mutants	115
III-1-5- Etude du phénotype stomatal des mutants	115
III-2- CARACTERISATION DE LA LIGNEE SUREXPRESSEUR DE SIM, OE SIM	116
III-2-1 Caractérisation du phénotype du surexpresser OE SIM	116
III-2-2 Etude de l'expression de la protéine SIM recombinante chez OE SIM	117
IV- ETUDE DE LA FONCTION DES SIM/SMR EN CONDITION DE STRESS ABIOTIQUE	120
IV-1- ETUDE DE LA FONCTION DES GENES SIM/SMR EN CONDITION DE SECHERESSE DU SOL	120
IV-1-1- Implication des gènes <i>SIM/SMR</i> lors d'un stress hydrique sévère	120
IV-1-1-1 Etude de l'expression des gènes <i>SIM/SMR</i> en réponse à un stress hydrique sévère	120
IV-1-1-1 Etude de la sensibilité des mutants <i>sim/smr</i> à un stress hydrique sévère	123
IV-1-2- Etude des mutants en condition de stress hydrique modéré	125
IV-1-2-1 Etude du phénotype des rosettes des mutants <i>sim/smr</i>	127
IV-1-2-1-1 Etude de la croissance des rosettes des mutants	127
IV-1-2-1-2 Etude de l'aire des feuilles des mutants	129

IV-1-2-1-3 Etude de l'aire des cellules épidermales des mutants	129
IV-1-2-2 Etude du phénotype stomatal des mutants	131
IV-1-2-3 Etude de l'endoréplication au niveau des feuilles des mutants <i>sim/smr</i>	132
IV-2- ETUDE DE LA FONCTION DES SIM/SMR EN CONDITION DE STRESS OSMOTIQUE	133
IV-2-1- Etude de l'expression des <i>SIM/SMR</i> en réponse à un stress salin	133
IV-2-2- Etude de l'effet du stress osmotique sur l'endoréplication	135
IV-3 ETUDE DE L'EXPRESSION DES SIM/SMR EN CONDITION DE STRESS HORMONAL	135
V. BILAN COMPARATIF DES PHENOTYPES DE CROISSANCE DES MUTANTS <i>SIM/SMR</i> EN CONDITION NORMALES DE CROISSANCE ET EN CONDITION DE STRESS HYDRIQUE	136
IV - DISCUSSION	141
I- LA REGULATION PROTEIQUE DES SIM/SMR PAR LA VOIE UPS	143
I-1 LA REGULATION DES SIM/SMR EST DEPENDANTE DU PROTEASOME 26S	143
I-2 RECHERCHE DU DEGRON	143
I-3 CONCEPTION D'UNE VERSION NON-DEGRADABLE DE SIM ET SMR1	144
I-4 IMPORTANCE DE LA VOIE DE DEGRADATION PAR LE PROTEASOME	145
II- LA REGULATION DU NIVEAU D'EXPRESSION DES <i>SIM/SMR</i> : CONDITIONS NORMALES DE CULTURE ET STRESS HYDRIQUE	146
II-1 LA PROTEINE SIM RESTE FAIBLEMENT EXPRIMEE EN CONDITIONS NORMALES DE CULTURE DES PLANTES	146
II-2 L'EXPRESSION DES TRANSCRITS <i>SIM/SMR</i> EST INDUITE DIFFERENTIELLEMENT EN REPONSE A UN STRESS HYDRIQUE	147
II-3 L'INDUCTION DE L'EXPRESSION DE CERTAINS <i>SIM/SMR</i> EN REPONSE AU STRESS SERAIT ABA-DEPENDANTE	149
II-4 LA FONCTION DES SIM/SMR DANS L'ADAPTATION AU STRESS HYDRIQUE	150
II-5 MODELE DE LA REGULATION DES <i>SIM/SMR</i> EN CONDITIONS DE STRESS HYDRIQUE	151
III- MODELE DE CONCLUSION : ROLE ET REGULATION DE LA FAMILLE DES <i>SIM/SMR</i> DANS LA MODULATION DU CYCLE CELLULAIRE EN REPONSE A UN STRESS HYDRIQUE	155
IV PERSPECTIVES	156
IV-1 PERSPECTIVES CONCERNANT LA REGULATION DES SIM/SMR	156
IV-2 PERSPECTIVES CONCERNANT LA FONCTION DES SIM/SMR	157
BIBLIOGRAPHIE	161
ANNEXES	181

ABBREVIATIONS

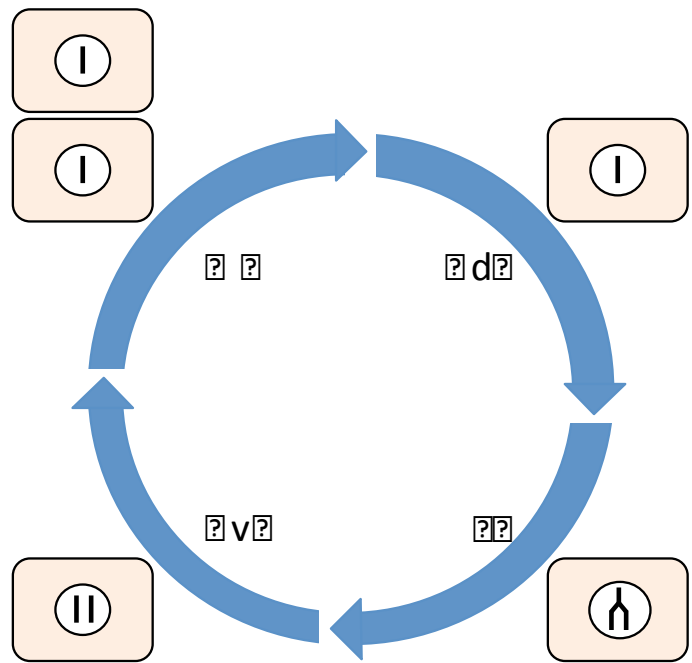
ABREVIATIONS

ABA	Acide Abscissique
ABRE	ABA Responsive Element
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADNc	AND complémentaire
ANOVA	ANalysis Of Variance
APC	Anaphase Promoting Complex
ARN	Acide Ribonucléique
ATP	Adenosyl TriPhosphate
BiFC	Bimolecular Fluorescence Complementation
BY-2	suspension cellulaire de tabac Bright Yellow
CAK	CDK activating kinase
CCS52A	Cell Cycle Switch Protein 52 A
CDC	Cell-Division Cycle
CDK	Cyclin-Dependent Kinase
CHX	Cycloheximide
Cip/Kip	CDK Inhibiting Protein/Kinase Inhibitory Protein
CKI	CDK Inhibitor
CUL	Culline
CYC	Cycline
Da	Dalton
DAPI	Di Aminido Phenyl Indol
DDB1	Damage-specific DNA binding protein 1
DDM1	Decrease in DNA Methylation1
DNTP	Désoxynucléotides triphosphate
DO	Densité Optique
DTT	Dithiothréitol
E1	Ubiquitin-activating enzyme
E2	Ubiquitin-conjugating enzyme
E3	Ubiquitin-ligase
EDTA	Ethylène Diamine Triphosphate
EMS	Ethylméthane Sulfonate
GA	Gibberellin

GFP	Green Fluorescence Protein
GAI	GA Insensitive
GMC	Guard Mother Cell
GUS	β -glucuronidase
HECT	Homologous to E6-AP Carboxyl Terminus
hrs	heures
ICK	Inhibitor of CDK
INK	INHibitor of CDK
KRP	Kip-Related Protein
LGO	Loss of Giant cells from Organs (SMR1)
LRR	Leucine Rich Repeat
Lys	Lysine
min	minute
MMC	Meristemoid Mother Cell
MS	Murashige Skoog
MSA	M-specific activators
MYB	Myeloblastosis
NLS	Nuclear Localisation Signal
PAGE	PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PCR	Polymerase Chain Reaction
RB	Retinoblastoma
RBR	Retinoblasma-Related
RBX	Ring box1
RD29B	Responsive to Dessication 29B
RING	Really Interesting New Gene
RNR	Ribonucleotide reductase
RT-PCR	Reverse-Transcriptase-PCR
SCF	Skip1 Cullin1 F-box
SDS	Sodium dodecyl sulfat
SIM	SIAMESE
SKP1	Skip1
SKP2	Skip2

SMR	SIAMESE-Related
TBS	Tris Buffered Saline
Thr	Threonine
Tris	hydroxyméthyl aminométhane
UPS	Ubiquitin Proteasome System
WD	domaine riche en tryptophane et en acide aspartique
WIWAM	Weighing Imaging and Watering Machine
X-gluc	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide

I - INTRODUCTION



Il est possible de trouver des informations sur les différents types de données et sur les méthodes de traitement de ces données dans le manuel de l'utilisateur. Les données sont collectées et traitées de manière automatisée et les utilisateurs sont informés de la manière dont les données sont collectées et traitées. Les données sont collectées et traitées de manière automatisée et les utilisateurs sont informés de la manière dont les données sont collectées et traitées. Les données sont collectées et traitées de manière automatisée et les utilisateurs sont informés de la manière dont les données sont collectées et traitées.

I - Principes généraux du cycle cellulaire chez les eucaryotes

I-1 Mécanismes généraux de la mitose

L'existence des cellules est observée pour la première fois en 1665 par Robert Hooke chez un organisme végétal, le chêne-liège. La théorie cellulaire, selon laquelle la matière vivante est constituée de cellules, est complétée en 1855 par Rudolf Virchow qui proclame que « toute cellule provient d'une cellule », ce qui mène au concept de reproduction cellulaire par division. Ce principe est constitutif de l'ensemble du vivant des procaryotes aux eucaryotes.

I-1-1 Les grands évènements du cycle cellulaire eucaryote

Le cycle cellulaire est l'ensemble des évènements par lesquels les composants d'une cellule mère, notamment le génome, sont dupliqués puis répartis en deux cellules filles (Morgan, 2007). La division cellulaire conditionne l'ensemble du développement d'un organisme. Les mécanismes fondamentaux qui régulent le cycle cellulaire sont hautement conservés chez tous les organismes eucaryotes, incluant les plantes, les levures et les animaux. Les organismes modèles fréquemment utilisés pour l'étude du cycle cellulaire sont les levures *Saccharomyces cerevisiae* et *Schizosaccharomyces pombe*, les embryons de grenouille *Xenopus* et de Drosophile, et les cellules de mammifères en culture. Contrairement aux animaux, le développement des végétaux est largement post-embryonnaire. La régulation du cycle cellulaire est d'une importance centrale pour la croissance et le développement des plantes et les modèles végétaux les plus utilisés dans ce domaine sont notamment la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, le riz *Oryza sativa* et les cultures de cellules de tabac BY2 .

Chez les eucaryotes, le cycle cellulaire est divisé en quatre phases successives présentées en figure I.1. Le génome est répliqué pendant la phase de synthèse (S). Le génome dupliqué et les autres composants cellulaires se répartissent en deux pôles et sont divisés en deux cellules filles par cytokinèse (aussi appelée cytotérièse) pendant la phase de mitose (M). Chez les cellules animales, la cytokinèse fait intervenir un anneau contractile de microfilaments qui forme un sillon de clivage dans la structure de la

membrane plasmique. Chez les cellules végétales, encastrées dans une paroi pecto-cellulosique semi-rigide, la cytokinèse fait intervenir une structure particulière, composée notamment de filaments du cytosquelette, le phragmoplaste (Azimzadeh *et al.*, 2001 ; Sasabe et Machida, 2012). Ce phragmoplaste fait converger de nombreuses vésicules, dont les vésicules Golgiennes, vers le plan de division, permettant la synthèse d'une nouvelle paroi et de nouvelles membranes plasmiques, dans chacune des cellules filles, par fusion des vésicules en partant du centre du plan de division jusqu'à la membrane plasmique. Entre la phase S et la phase M, il y a deux phases de pause dites, Gap phase 1 (G1) et Gap phase 2 (G2) pendant lesquelles la cellule se prépare et vérifie les points de contrôle respectivement, avant l'entrée en phase S et l'entrée en phase M. A l'issue du cycle de division, les cellules filles peuvent entrer dans un nouveau cycle de division, se différencier, ou encore entrer dans un processus de sénescence ou de mort cellulaire.

Des dérégulations du cycle cellulaire peuvent avoir des conséquences importantes sur l'organisme, par exemple chez les animaux, la prolifération excessive et incontrôlée des cellules peut être à l'origine de cancers. Chez les plantes, en raison de leur mode de vie ancré, la modulation du développement et de la croissance représente un mécanisme fondamental qui permet de s'adapter aux conditions changeantes de leur environnement. Dans ce contexte, la progression du cycle cellulaire constitue un processus hautement régulé.

I-1-2 Les complexes Cyclines/CDK associés aux CKI sont les régulateurs fondamentaux du cycle cellulaire

I-1-2-1 Le mécanisme fondamental de régulation du cycle repose sur l'activité des CDK

I-1-2-1-1 Les complexes Cyclines/CDK : clés de voûte de la progression du cycle

La progression du cycle cellulaire chez les eucaryotes est liée à l'activité d'une famille de protéines sérine-thréonine kinases dites « kinase cycline-dépendante » (CDK). Leur activité en tant que protéine kinase est de catalyser l'attachement covalent d'un groupement phosphate dérivé de l'ATP à une protéine substrat. Cette modification post-traductionnelle de phosphorylation des protéines cibles a pour effet, en général, de

modifier leurs activités enzymatiques ou leurs interactions avec d'autres protéines (souvent en les inhibant) ou encore de modifier leur stabilité. Les CDK sont généralement exprimées de façon constante au cours du cycle mais leur activité est dépendante de l'association à une protéine de la famille des cyclines (CYC), formant ainsi différents complexes cycline-CDK au cours des différentes phases du cycle cellulaire. La progression du cycle cellulaire est régulée par l'expression cyclique de ces différentes cyclines (Dorée, 2003 ; Nurse, 2001 ; Viallard *et al.*, 2001). Les différents complexes cyclines/CDK se formant au cours du cycle cellulaire sont spécifiques de substrats différents.

I-1-2-1-2 L'activité des kinases de type CDK : un mécanisme sous haute régulation

Des modifications de la conformation structurale sont nécessaires à l'activation des CDK. Ainsi, une boucle T bloque le site actif des CDK, mais la liaison aux cyclines active les CDK en déplaçant la boucle T de l'entrée du site actif (Gould *et al.*, 1991 ; Rosso *et al.*, 1996). Les cyclines sont régulées au niveau de leur transcription mais aussi au niveau de leur protéolyse rapide et spécifique par la voie ubiquitine 26S protéasome-dépendante. Les cyclines sont aussi sujettes à un contrôle de localisation sub-cellulaire, elles sont exclues du noyau quand leur activité n'est pas désirée. Ce processus est contrôlé par des modifications post-traductionnelles de type phosphorylation.

L'activité des CDK est également modulée par des modifications post-traductionnelles. En effet, si comme indiqué la liaison des cyclines aux CDK déplace la boucle T, cet effet n'est pas suffisant pour l'activation complète des CDK. Une phosphorylation de la thréonine dans la boucle T provoque l'ajustement final pour activer les CDK. L'enzyme qui catalyse cette réaction a reçu le nom de CAK pour « CDK activating kinase ». A l'inverse, la phosphorylation de certains résidus au niveau du site de liaison à l'ATP de la CDK a un effet inhibiteur sur l'activité de la CDK. Des kinases, telles que Wee1 ou Myt1, peuvent phosphoryler des résidus dans le site actif des CDK et ainsi inhiber leur activité (Booher et Beach, 1989). L'action d'une phosphatase, telle que Cdc25, peut réactiver la CDK en enlevant les phosphates mis par Wee1 (Russell et Nurse, 1986 ; Gautier *et al.*, 1991 ; Kumagai et Dunphy, 1991).

Finalement, l'activité des CDK est également régulée par la liaison avec les « inhibiteurs de CDK » dits CKI. Les CKI inhibent l'activité des CDK de deux façons : soit ils se fixent aux complexes cycline/CDK ce qui a pour effet de bloquer directement l'activité kinase,

soit ils se fixent uniquement à la CDK ce qui a pour effet de bloquer la liaison à la cycline (Sheer et Roberts, 1999).

I-1-2-2 Les régulateurs fondamentaux du cycle

Les complexes cyclines/CDK associés aux CKI ainsi que les CAK et les activateurs de l'APC (Anaphase Promoting Complex) sont les régulateurs fondamentaux du cycle cellulaire. Ils interagissent avec plusieurs autres catégories de protéines clés du cycle. La liste des régulateurs présentée ici n'a pas de visée exhaustive ; elle est orientée sur les CKI, objets de la présente étude, et leurs interactants directs : les complexes cyclines/CDK. Les différents modules cycline/CDK – CKI sont resitués selon les phases du cycle chez *Arabidopsis* en figure I.2 d'après Van Leene *et al.* (2010).

I-1-2-2-1 Les différentes CDK chez les eucaryotes

Chez la levure, il existe un unique gène CDK (Mitchison et Creanor, 1971). Chez les levures bourgeonnantes, telles que *Saccharomyces cerevisiae*, la CDK est codée par le gène *Cdc28*. Chez les levures se divisant par scissiparité, telles que *Schizosaccharomyces pombe*, la CDK est codée par le gène *cdc2*.

Chez l'homme, il existe plusieurs CDK dont CDK1, 2, 4 et 6 lesquelles sont des kinases essentielles du cycle cellulaire (Malumbres et Barbacid, 2009). Les CDK4 et CDK6 n'ont pas d'orthologue connu chez les plantes (Inzé, 2005).

Chez les plantes, les CDK se répartissent en six catégories appelées: A, B, C, D, E, F (Menges *et al.*, 2005; Francis, 2007). Les CDKA possèdent le motif PSTAIRE conservé avec les CDK de levures et les CDK animales (Segers *et al.*, 1996). Elles sont actives pendant les phases S, G2 et M, et en particulier, les transitions G1/S et G2/M. Les CDKB sont elles spécifiques des plantes (Boudolf *et al.*, 2009; Magyar *et al.*, 1997). Les CDKC, les CDKE, et les CDKG agissent sur la transcription (Fulop *et al.*, 2005 ; Wang et Chen, 2004 ; Menges *et al.*, 2005 ; Van Leene *et al.*, 2010). Les CDKD et les CDKF phosphorylent des CDK (Umeda *et al.*, 2005 ; Umeda *et al.*, 2005 ; Shimotohno *et al.*, 2004). Il existe également des protéines proches des CDK appelées CDK-like (CKL) (Menges *et al.*, 2005).

Chez *Arabidopsis*, il existe une unique CDKA, quatre CDKB (CDKB1;1 et 2 et CDKB2;1 et 2), deux CDKC (CDKC1 et 2), trois CDKE (CDKE1 à 3), une CDKF et deux CDKG (CDKG1 et 2)(Van leene et al., 2010). CDKB1;1 et CDKB1;2 sont exprimées précocement lors du

cycle cellulaire depuis la réplication de l'ADN jusqu'en phase M, tandis que l'expression de CDKB2;1 et CDKB2;2 est confinée à la transition G2/M. Les plantes pourraient former au moins 92 complexes cycline-CDK différents, ce qui souligne le rôle essentiel de régulation du cycle cellulaire dans la plasticité de leur développement (Van Leene *et al.*, 2010).

I-1-2-2-2 Les différentes cyclines (CYC) chez les eucaryotes

La première cycline a été découverte en 1983 chez des embryons d'oursins (Evans *et al.*, 1983). Chez l'homme, les cyclines A et B (B1, B2 et B3) sont dites mitotiques, leur pic d'expression se situant en G2/M. Les cyclines C et les cyclines D (D1, D2 et D3) atteignent leur pic d'expression en phase G1. La cycline E atteint un pic d'expression en fin de phase G1, à la transition G1/S (Viallard *et al.*, 2001).

La première cycline de plante identifiée a été une cycline de type A (Hata *et al.*, 1991). Chez les plantes, les cyclines de type A, B et D sont bien caractérisées (De Veylder *et al.*, 2011 ; Van Leene *et al.*, 2011). De même que leurs homologues chez les animaux, les cyclines A et B sont qualifiées de mitotiques car elles préparent et contrôlent l'entrée en mitose. Les cyclines de type D préparent et contrôlent l'entrée en phase S. Chez *Arabidopsis*, il existe dix cyclines A de trois types: CYCA1 (CYCA1 ;1 et 2), CYCA2 (CYCA2 ;1 à 4) et CYCA3 (CYCA3 ;1 à 4). On distingue également, onze cyclines B de trois types: CYCB1 (CYCB1 ;1 à 4), CYCB2 (CYB2 ;1 à 4) et CYCB3 ;1, et enfin, dix cyclines D de sept types: CYCD1 ;1, CYCD2 ;1, CYCD3 ;1 à 3, CYCD4 ;1 et 2, CYCD5 ;1, CYCD6 ;1 et CYCD7 ;1. D'autres cyclines ont été identifiées mais leur rôle reste encore mal connu, il s'agit des cyclines CYCC (1 et 2), CYCH ;1, CYCL1, CYCP (1 à 7), CYCT (1 à 5) et SDS (Solo DancerS) (Van Leene *et al.*, 2011).

I-1-2-2-3 Les inhibiteurs de cycline/CDK (CKI)

Chez les animaux, deux grandes familles d'inhibiteurs des complexes cycline/CDK ont été décrites (Starostina et Kipreos, 2012) : les Cip/Kip (CDK Inhibiting Protein/Kinase Inhibitory Protein) et les INK (INhibitor of CDK). Les CKI de la famille INK s'associent aux CDK pour bloquer la liaison aux cyclines. Les CKI de la famille Cip/Kip s'associent aux complexes Cyclines/CDK inhibant ainsi leur activité kinase. Plus précisément, chez les mammifères, les protéines CIP/KIP comprennent les protéines p21^{Cip1/WAF1} (p21), p27^{Kip1} et p57^{Kip2} (Starostina et Kipreos, 2012). Ces protéines partagent la propriété d'inhiber la plupart des complexes cycline/CDK. A l'opposé, les protéines de la famille

INK4 (INhibitor of CDK4), p16^{INK4A/MTS1/CDKN2/CDK4I} (p16), p15^{INK4B/MTS2} (p15), p18^{INK4C/INK6A} (p18), et p19^{INK4D/INK6B} inhibent spécifiquement CDK4 et CDK6. Leur action d'inhibition se fait par l'intermédiaire d'un domaine situé en position N-terminale et relativement conservé entre les trois protéines (Toyoshima et Hunter, 1994 ; Viallard et al., 2001).

Chez les plantes, les CKI se répartissent en deux familles : l'une homologue des CIP/KIP des animaux, l'autre spécifique aux plantes et ne présentant aucun homologue connu dans les autres règnes. Aucun homologue des CKI de type INK n'est connu chez les plantes. Chez *Arabidopsis*, ces deux familles sont nommées « Kip-Related Protein » (KRP) ou également « Interactors of Cdc2 Kinase » (ICK), et SIAMESE/SIAMESE-Related Proteins (SIM/SMR) (Wang *et al.*, 1997 ; De Veylder *et al.*, 2001 ; Walker *et al.*, 2000 ; Churchman *et al.*, 2006 ; Van Leene *et al.*, 2010 ; Skirycz *et al.*, 2011b). La famille KRP, homologue aux Cip/Kip des animaux, compte 7 membres KRP1 à KRP7. ICK1/KRP1 et ICK2/KRP2 ont été initialement identifiés comme interactants de la CDK Cdc2 de la levure dans un criblage double hybride (Wang *et al.*, 1997). La famille SIM/SMR, spécifique des plantes, compte 14 membres : SIAMESE (SIM), SMR1 aussi appelé LGO (Loss of Giant cells from Organs) (Walker *et al.*, 2000 ; Roeder *et al.*, 2010), et les SMR2 à 13. SIM a été le premier membre identifié (Walker *et al.*, 2000), puis SMR1, SMR2 et SMR3 ont été identifiés (Churchman *et al.*, 2006), suivi de SMR4 et SMR5 (Peres *et al.*, 2007) et plus récemment les SRM6 à 13 (Van Leene *et al.*, 2010). Des orthologues des SIM/SMR ont été décrites chez *Solanum lycopersicum*, *Solanum tuberosum*, *Zea mays*, *Oryza sativa*, *Populus tremula*, *Glycine max* (Churchman *et al.*, 2006). L'orthologue de SIM chez *Oryza sativa* porte le nom de EL2 (Churchman *et al.*, 2006 ; Peres et al., 2007). Les protéines CKI de plantes dont les séquences ont été analysées à ce jour partagent un motif de liaison aux complexes cyclines/CDK (Peres *et al.*, 2007).

I-2 Les variantes du cycle cellulaire

Chez les eucaryotes, il existe des variantes au cycle cellulaire qui modulent la répartition des contenus cellulaires. Un exemple correspond à la première division de méiose, dite réductionnelle, où les chromosomes homologues se séparent, diminuant ainsi par deux le niveau de ploïdie (n) des cellules filles par rapport à la cellule mère.

?

?

?

?

?

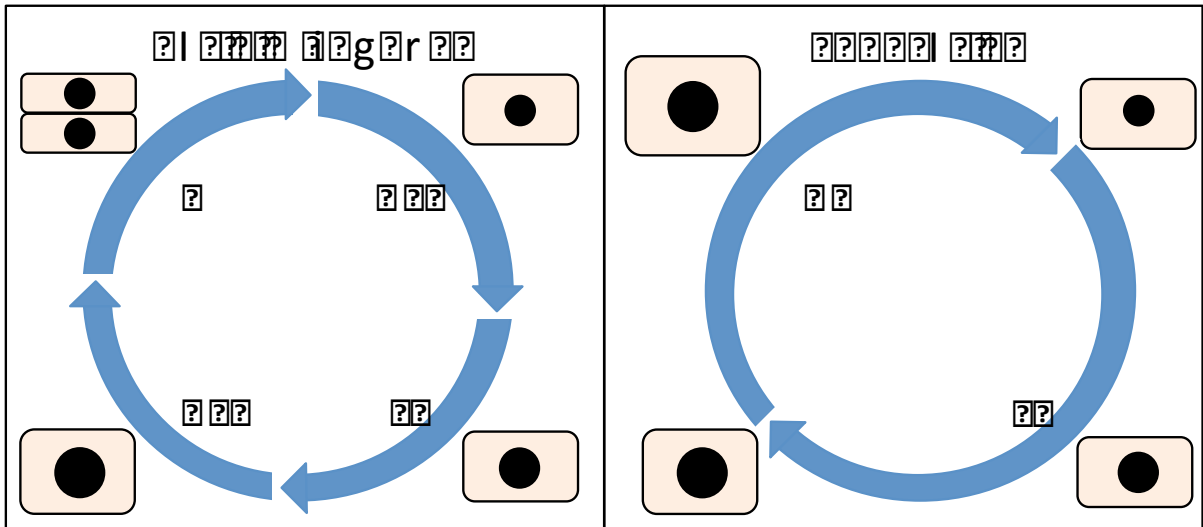
?

?

?

?

?



Il processo di produzione è un ciclo continuo che si ripete ogni volta che viene richiesto un prodotto. Il ciclo di produzione è un processo continuo che si ripete ogni volta che viene richiesto un prodotto. Il ciclo di produzione è un processo continuo che si ripete ogni volta che viene richiesto un prodotto.

?

?

?

?

«à

Toutefois je ne développerai pas ici la régulation de la méiose, je me limiterai au cycle cellulaire des cellules somatiques chez les animaux et végétatives chez les plantes.

I-2-1 Les divisions asymétriques

Les divisions asymétriques sont fréquentes au cours du développement d'organismes multicellulaires (animaux et plantes) où elles contribuent à la production de la diversité cellulaire. Dans ce processus, le contenu cytoplasmique est réparti inégalement entre les deux cellules filles, permettant de générer des types cellulaires. Chez les animaux et les plantes, les divisions asymétriques sont essentielles pour le maintien des cellules souches dites cellules quiescentes: une cellule souche doit se diviser asymétriquement pour donner une nouvelle cellule souche et une seconde cellule qui aura un nouveau destin cellulaire. Ces divisions asymétriques qui génèrent deux cellules filles ayant un destin différent permettent la formation de nouveaux types cellulaires, tissus et organes (De Veylder *et al.*, 2007). Par exemple, dans le processus de genèse des cellules de garde chez les végétaux, une première division asymétrique d'une cellule mère méristémoïde produit une grande cellule pavimentaire et une petite cellule méristémoïde (Peterson *et al.*, 2010). Cette cellule peut alors soit se diviser symétriquement pour produire deux cellules de garde, soit cette cellule peut se diviser asymétriquement pour produire des méristémoïdes satellites. Le plan de division est orienté de telle façon que le nouveau méristémoïde est placé à distance du stomate préexistant ou d'une cellule précurseur. Une CDK de type B, spécifique des plantes CDKB1 ;1, est impliquée dans la division asymétrique des cellules mères méristémoïdes (Boudolf *et al.*, 2004).

I-2-2 L'endocycle

La variante la plus commune du cycle cellulaire, dit mitotique, est l'endocycle qui permet l'augmentation du contenu en ADN (valeur C) de cellules somatiques chez les animaux ou végétatives chez les plantes (Figure I.3). Il se déroule à l'issue du cycle cellulaire dans des cellules engagées dans le processus de différenciation. L'endocycle est un cycle cellulaire incomplet dont l'arrêt programmé intervient après la réplication de l'ADN et avant la mitose. Il en résulte que le niveau de ploïdie de la cellule augmente ; ce

phénomène est appelé l'endopolyploïdisation (Edgar et Orr-Weaver, 2001). Cet endocycle peut se produire chez les eucaryotes pluricellulaires dans certains types cellulaires appartenant aux tissus somatiques. Il en résulte plusieurs niveaux de ploïdie au sein d'un même organisme (Barow, 2006 ; Edgar et Orr-Weaver, 2001 ; Joubès et Chevalier, 2000).

Différentes variantes de l'endocycle sont distinguées en fonction du stade auquel le cycle s'arrête. Le cycle peut s'arrêter en cours de mitose, après la séparation du noyau en deux et avant la cytokinèse, ce qui donne une cellule multinucléée ou syncytium. Ce processus a lieu, par exemple, dans les cellules musculaires cardiaques chez les mammifères, ou dans les embryons d'insectes (Edgar et Orr-Weaver, 2001). Le cycle peut s'arrêter après la séparation des chromosomes en métaphase et juste avant la division du noyau et la cytokinèse, il en résulte que le nombre de chromosomes (n) double dans le noyau de la cellule; ce cycle est appelé endomitose. Ce processus a lieu dans les mégacaryocytes de la moelle hématopoïétique chez les mammifères (Edgar et Orr-Weaver, 2001).

Enfin, l'endoréplication, aussi appelée endoréduplication, est la variante la plus commune de l'endocycle. L'ADN se réplique mais les chromatides restent attachées au niveau du centromère, ce qui donne des chromosomes polytènes, le cycle s'arrête avant la métaphase (De Veylder, 2011). Cependant, la distinction entre polyténie et polyploïdie n'est pas absolue et des configurations intermédiaires d'ADN existent dans les cellules endorépliquatives. Des exemples d'endoréplication existent chez les animaux, principalement chez les insectes. Ainsi, les cellules de larves de *Drosophila melanogaster* atteignent un contenu en ADN de plus de 2000 C (Edgar et Orr-Weaver, 2001). Mais ce processus est surtout prévalant chez les plantes. En effet, le processus d'endoréplication a un rôle important dans le développement et la croissance de tissus ou organes végétaux. Certains de ces tissus présentent par ailleurs un intérêt agricole, c'est le cas de l'endosperme des graines de céréales et du péricarpe des fruits charnus (Sabelli, 2012 ; Joubès et Chevalier, 2000 ; Chevalier *et al.*, 2011), ou encore lors de la fixation symbiotique de l'azote chez les légumineuses qui nécessite des cellules végétales endorépliquées (Kowles et Phillips, 1985 ; Joubès et Chevalier, 2000 ; Sabelli, 2012 ; Bourdon *et al.*, 2012 ; Vinardell *et al.*, 2003). En terme de développement des plantes, un des rôles de l'endoréplication fréquemment évoqué est son lien avec la taille et l'activité métabolique de la cellule; elle permettrait de maintenir un certain ratio entre le contenu

en ADN nucléaire et le contenu cytoplasmique et les organites (Breuer *et al.*, 2007). Ce processus est notamment associé chez les plantes à la différenciation de cellules de grande taille telles que les trichomes (Sugimoto-Shirasu et Roberts, 2003), mais plus globalement, il est associé à la croissance de la plante (Massonnet *et al.*, 2011). L'endoréplication jouerait également un rôle important dans le processus de différenciation des cellules post-mitotiques. En effet le début de l'endocycle coïncide souvent avec la transition entre la prolifération et la différenciation cellulaire (Bramsiepe *et al.*, 2010). Dans ce contexte, chez *Arabidopsis thaliana*, les trichomes sont utilisés comme type cellulaire modèle pour l'étude de l'endoréplication (Walker *et al.*, 2000 ; Schnittger et Hülskamp, 2002 b).

I-3 Les bases moléculaires du mécanisme de progression entre les phases du cycle

Comme nous l'avons vu, la progression entre les phases successives du cycle cellulaire est liée à l'activité kinase des complexes Cycline/CDK, qui phosphorylent d'autres protéines déclenchant ainsi une cascade d'évènements conduisant à la phase suivante. Cette activité est régulée à de multiples niveaux et fait intervenir de nombreux autres facteurs. Voyons maintenant quels mécanismes moléculaires au niveau de ces principaux régulateurs permettent la progression vers les phases successives du cycle mitotique ou de l'endocycle. Ces mécanismes sont globalement assez conservés chez tous les eucaryotes et je me limiterai à décrire les principales transitions, à savoir G1/S, G2/M et cycle mitotique/endocycle, chez la plante modèle *Arabidopsis*.

I-3-1 Comparaison du nombre de régulateurs de base du cycle cellulaire chez les eucaryotes

Depuis la découverte de la première cycline il y a 30 ans (Evans *et al.*, 1983), quelques 71 gènes codants pour des régulateurs fondamentaux du cycle cellulaire ont été découverts chez la plante modèle *Arabidopsis*, contre 15 chez la levure et 23 chez l'humain (Vandepoele *et al.*, 2002, Menges *et al.*, 2005, Van Leene *et al.*, 2010). Les

nombre des cinq types de régulateurs du cycle cellulaire, cyclines, CDK, CAK, CKI et activateurs de l'APC, sont présentés chez *Arabidopsis thaliana*, *Saccharomyces cerevisiae* et *Homo sapiens* en tableau I.1 issu de la publication Van Leene *et al.*, 2010 (qui elle-même reprend des données publiées antérieurement; Capron *et al.*, 2003; Menges *et al.*, 2005; Morgan, 2007; Peres *et al.*, 2007; Quimbaya *et al.*, 2012). Bien que la division cellulaire chez les plantes partage les mêmes mécanismes de base que les autres eucaryotes, les plantes ont développé de nouvelles molécules qui régulent le cycle cellulaire. Certains régulateurs, tels que les cyclines et les CKI (inhibiteurs de cycline/CDK), sont particulièrement nombreux chez les plantes. Ainsi au moins 92 complexes cycline-CDK différents pourraient se former chez *Arabidopsis* (Van Leene *et al.*, 2010). Cette diversification est probablement liée à la remarquable capacité des plantes à moduler leur développement post-embryonnaire (Inzé et De Veylder, 2006).

Tableau I.1: Comparaison du nombre de régulateurs de base du cycle cellulaire (d'après Van Leene *et al.*, 2010).

Le nom et leur nombre sont indiqués respectivement à gauche et à droite de chaque case.

	<i>S. cerevisiae</i>	<i>H. sapiens</i>	<i>A. thaliana</i>
Cyclin-dependent kinases	Cdk1 (cdc28) 1	Cdk1, 2, 4, 6 4	CDKA;1, CDKB1;1-2, CDKB2;1-2 5
Cyclins	Cln1, 2, 3 9	Cyclin D1-3, Cyclin E 4	10 D-Type cyclins 10
	Clb1, 2, 3, 4, 5, 6	Cyclin A1-2, Cyclin B1-2 4	10 A-Type cyclins, 11 B-Type cyclins 21
CDK-activating kinases	Cak1 1	Cdk7 (+ cyclin H) 2	CDKD;1-3 (+ CYCH;1) CDKF;1 5
APC activators	Cdc20, Cdh1, Ama1 3	Cdc20, Cdh1 2	Cdc20;1-6, CCS52A1-2,B 9
CDK inhibitor proteins	Sic1 1	Cip1, Kip1-2 3	KRP1-7 7
		Ink4a-d 4	SIM, SMR1-13 14
Total	15	23	71

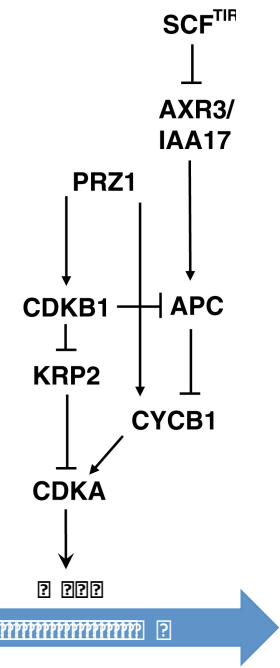
I-3-2 La transition G1/S

Dans les cellules animales, en début de phase G1, les protéines de la famille dite RB, pour rétinoblastome, bloquent le passage vers la phase S en réprimant l'activité transcriptionnelle des facteurs de transcription de la famille E2F (Ramirez-Parra *et al.*, 1999 ; Magyar *et al.*, 2000 ; Sekine *et al.*, 1999 ; Ramirez-Parra *et al.*, 2000). Les facteurs

Abolition de l'impôt sur le revenu

?

Il est prévu que les personnes physiques et les sociétés de droit français qui ont opté pour l'imposition au forfait sur le revenu de 2015 à 2017, pourront bénéficier de l'abolition de l'impôt sur le revenu à compter du 1er janvier 2018. Cette mesure s'applique aux personnes physiques et aux sociétés de droit français qui ont opté pour l'imposition au forfait sur le revenu de 2015 à 2017. Les personnes physiques qui ont opté pour l'imposition au forfait sur le revenu de 2015 à 2017, pourront bénéficier de l'abolition de l'impôt sur le revenu à compter du 1er janvier 2018. Cette mesure s'applique aux personnes physiques et aux sociétés de droit français qui ont opté pour l'imposition au forfait sur le revenu de 2015 à 2017. Les personnes physiques qui ont opté pour l'imposition au forfait sur le revenu de 2015 à 2017, pourront bénéficier de l'abolition de l'impôt sur le revenu à compter du 1er janvier 2018. Cette mesure s'applique aux personnes physiques et aux sociétés de droit français qui ont opté pour l'imposition au forfait sur le revenu de 2015 à 2017.



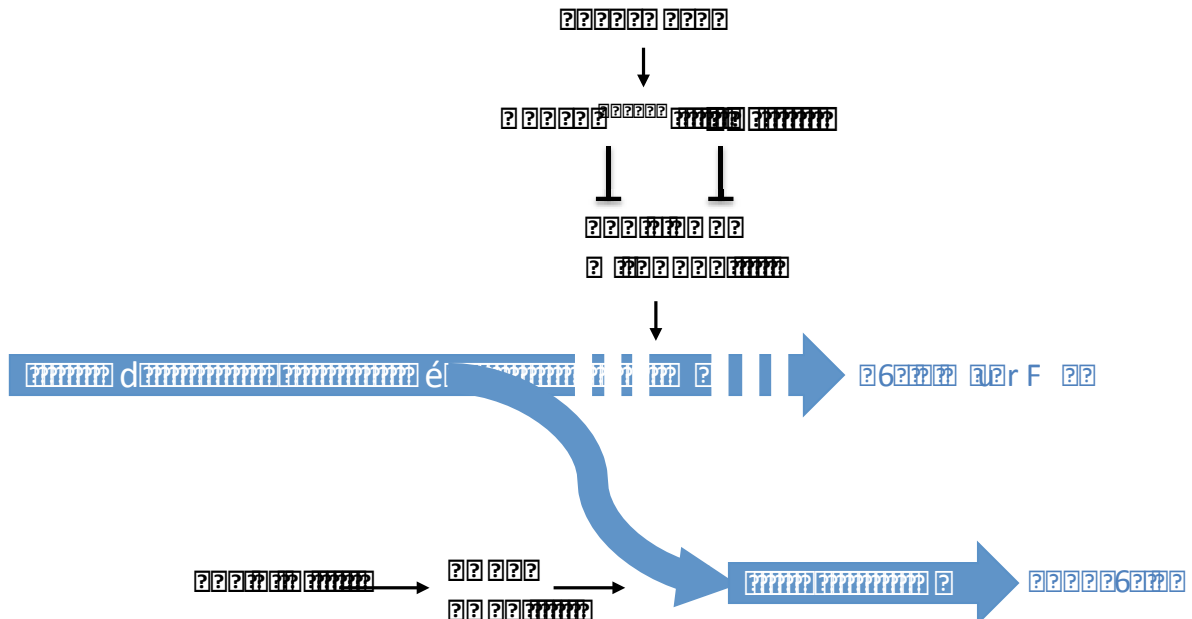
Le rôle de l'axe SCF^{TR} / AXR3/IAA17 / PRZ1 / CDKB1 / KRP2 / CDKA est crucial pour la régulation du cycle cellulaire. L'axe SCF^{TR} / AXR3/IAA17 / PRZ1 / CDKB1 / KRP2 / CDKA est crucial pour la régulation du cycle cellulaire. L'axe SCF^{TR} / AXR3/IAA17 / PRZ1 / CDKB1 / KRP2 / CDKA est crucial pour la régulation du cycle cellulaire.

?

?

Évaluation des risques liés à la pandémie de COVID-19

Le 30 mars 2020, le Comité de gestion des risques de la Société a examiné les données relatives à l'épidémie de COVID-19 et a conclu que la pandémie de COVID-19 constitue un risque systémique majeur pour la Société. Le Comité de gestion des risques a également examiné les données relatives à l'épidémie de COVID-19 et a conclu que la pandémie de COVID-19 constitue un risque systémique majeur pour la Société. Le Comité de gestion des risques a également examiné les données relatives à l'épidémie de COVID-19 et a conclu que la pandémie de COVID-19 constitue un risque systémique majeur pour la Société.



Le présent document est un document de travail préparé pour la Commission de l'accès à l'information et est diffusé en vertu de la Loi sur l'accès à l'information. Il n'est pas destiné à être utilisé comme preuve et ne constitue pas un avis juridique. Les renseignements contenus dans ce document sont susceptibles de changer sans préavis.

Évaluation des risques liés à la pandémie de COVID-19

Le 30 mars 2020, le Comité de gestion des risques de la Société a examiné les données relatives à l'épidémie de COVID-19 et a conclu que la pandémie de COVID-19 constitue un risque systémique majeur pour la Société. Le Comité de gestion des risques a également examiné les données relatives à l'épidémie de COVID-19 et a conclu que la pandémie de COVID-19 constitue un risque systémique majeur pour la Société. Le Comité de gestion des risques a également examiné les données relatives à l'épidémie de COVID-19 et a conclu que la pandémie de COVID-19 constitue un risque systémique majeur pour la Société.

from Organs (LGO) sont également impliquées dans le contrôle de l'endoréplication respectivement au niveau des trichomes et des sépales (Walker *et al.*, 2000, Roeder *et al.*, 2010). Il a été montré que SIM est un régulateur positif de la transition cycle mitotique/endocycle; SIM interagit avec les complexes formés d'une cycline de type D et d'une CDK de type A telle que CYCD3/CDKA; 1 (Churchman *et al.*, 2006). SIM et SMR1 pourraient également cibler CDKB1; 1 (Van Leene *et al.*, 2010).

I-3-4-2 La dégradation spécifique des cyclines

La transition de la mitose à l'endoréplication nécessite l'inactivation de l'activité CDK, et en particulier, du complexe CYCA2;3/CDKB1;1 (Boudolf *et al.*, 2004 ; Boudolf *et al.*, 2009). L'inactivation de ce complexe CDK est obtenue par la destruction protéolytique de son partenaire cycline de type A (Boudolf *et al.*, 2009). Les cyclines mitotiques sont sélectivement ciblées pour leur destruction par l'Anaphase Promoting Complexe/Cyclosome (APC/C), un acteur de la voie ubiquitine-dépendante et du protéasome 26S. Chez les plantes, l'activité de l'APC/C est en partie déterminée par son association avec les sous-unités d'activation, connues sous le nom Cell Cycle Switch 52A (CCS52A) (Cebolla *et al.*, 1999, De Veylder *et al.*, 2011). CCS52A a été montrée comme nécessaire pour l'endoréplication chez la tomate (Mathieu-Rivet *et al.*, 2010b), ainsi qu'au niveau des feuilles et des trichomes d'*Arabidopsis* (Lammens *et al.*, 2008, Larson-Rabin *et al.*, 2008, Kasili *et al.*, 2010). Le complexe APC/C^{CCS52A} (par convention, la protéine adaptatrice est notée en exposant) vise les cyclines mitotiques CYCB1;1 et CYCB1;2 (Kasili *et al.*, 2010), ainsi que CYCA2;3 et CYCA3;1 (Boudolf *et al.*, 2009, Mathieu-Rivet *et al.*, 2010a). La transcription de *CCS52A* est elle-même contrôlée par le facteur de transcription E2Fe/DEL1 (Lammens *et al.*, 2008, Vlieghe *et al.*, 2005).

I-3-4-3 L'induction de la machinerie de réplication

L'induction de l'endoréduplication requiert la voie RB-E2F qui induit des gènes cibles de E2F codant pour des protéines de réplication, comme CDC6 et CDT1 (Castellano *et al.*, 2004 ; Park *et al.*, 2005 ; Noir *et al.*, 2013). Chez les plantes, les deux types de facteurs E2Fa (De Veylder *et al.*, 2003; Guttierrez, 2009) et E2Fb (Magyar *et al.*, 2005) ont une fonction probable dans ce processus.

I-3-4-4 Le maintien de l'endocycle

Contrairement à la compréhension de l'initiation de l'endocycle, le processus de maintien des cycles d'endoréplication est mal connu. Probablement, chaque cycle d'endoréplication nécessite une alternance d'activité faible et modérée des CDK (De Veylder *et al.*, 2011). CDKA est nécessaire pour la progression d'endocycles, notamment pour le maintien de la réplication de l'ADN. Les CKI telles que KRP1/2 et SIM sont des candidats pour établir l'oscillation de l'activité de CDKA lors des cycles d'endoréplication (Roodbarkelari *et al.*, 2010).

I-4 Le mécanisme de régulation du cycle cellulaire par protéolyse ubiquitine 26S protéasome-dépendante

Comme nous l'avons vu, la protéolyse médiée par la voie de l'ubiquitine et du protéasome 26S, dite UPS (Ubiquitin Protéasome System) intervient pour dégrader spécifiquement un grand nombre de protéines clés du cycle cellulaire. En effet, les cyclines, les CKI, les facteurs E2F et leur co-facteur RB sont des cibles de cette protéolyse. L'UPS constitue ainsi un mécanisme fondamental régulant la présence des acteurs clés du cycle cellulaire (Mocciaro *et al.*, 2012 ; Teixeira et Reed, 2013, Marrocco *et al.*, 2010) permettant un contrôle efficace et rapide des étapes du cycle cellulaire.. Voyons maintenant comment ce mécanisme de protéolyse spécifique fonctionne et quels en sont les principaux acteurs.

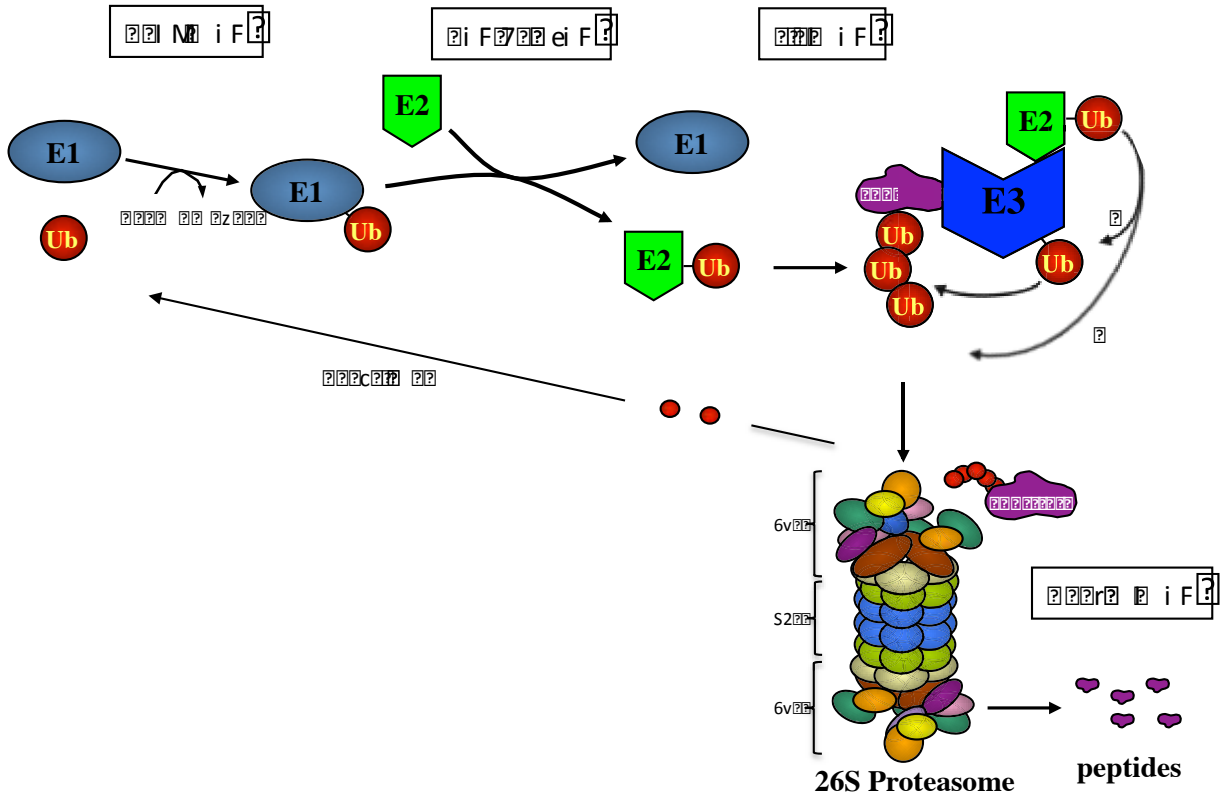
I-4-1 La base du mécanisme

La poly-ubiquitination des protéines cibles permet leur reconnaissance par le protéasome (Ciechanover *et al.*, 1980 ; Hershko *et al.*, 1980 ; Baldin et Coux, 2004). Elle comprend trois étapes, faisant intervenir l'activité successive de trois types d'enzymes (figure I.7). Une enzyme d'activation « ubiquitin-activating » ou E1, prend en charge l'ubiquitine libre et la transfère sur une enzyme de conjugaison ou E2. L'ubiquitine est ensuite liée de façon covalente au substrat par l'intermédiaire d'une « ubiquitine-ligase » ou E3. D'autres molécules d'ubiquitine sont ajoutées pour générer une chaîne à même

?

?

?



Il sistema ubiquitina-proteasoma è un sistema di degradazione proteolitica che agisce su una vasta gamma di substrati, regolando così l'equilibrio proteico e svolgendo un ruolo cruciale in processi cellulari come la segnalazione, la crescita e la differenziazione. La ubiquitina, una piccola proteina di 76 aminoacidi, viene attivata da E1 (ubiquitina-attivante) e trasferita a E2 (ubiquitina-carriera), che a sua volta trasferisce la ubiquitina a E3 (ubiquitina-ligasi). E3, in collaborazione con un substrato proteico, forma una catena di ubiquitina che viene riconosciuta e degradata dal proteasoma (26S), un complesso proteolitico costituito da due subunità 14S (S2) e due subunità 6S (S1). La degradazione del substrato produce peptidi, mentre E1 e E2 vengono riciclati per nuove cicli di ubiquitinazione.

?

?

?

?

»à

d'être reconnue par le protéasome 26S, un complexe multi-protéique siège de la protéolyse. L'ensemble de cette voie de dégradation est conservée chez tous les eucaryotes (Hershko *et al.*, 1992).

I-4-2 Les acteurs de la voie d'ubiquitination

I-4-2-1 L'ubiquitine

L'ubiquitine a été découverte en 1975 (Golstein *et al.*, 1975), sans que l'on n'en connaisse la fonction. Plus tard, un peptide impliqué dans un système de dégradation de protéine ATP-dépendant a été identifié (Ciechanover *et al.*, 1978), par la suite, ce peptide s'est avéré être l'ubiquitine (Wilkinson *et al.*, 1980). L'ubiquitine est constituée de 76 acides aminés et sa séquence protéique est très conservée chez tous les eucaryotes (Hershko et Ciechanover, 1992). Elle est codée par plusieurs types de gènes : soit en fusion avec une protéine ribosomale, soit sous forme de poly-ubiquitine. Dans tous les cas, le produit de traduction est mûri par des ubiquitine-protéases pour donner de l'ubiquitine libre.

I-4-2-2 L'enzyme d'activation, E1

L'enzyme E1 active l'ubiquitine en consommant une molécule d'ATP pour former une liaison thio-ester entre le résidu glycine C-terminal de l'ubiquitine et un résidu cystéine interne de l'enzyme E1 (Hershko et Ciechanover, 1992).

Il existe un seul gène E1 chez *Saccharomyces cerevisiae*, deux chez *Arabidopsis thaliana* et cinq chez *Caenorhabditis elegans*. Les enzymes E1 ne sont pas spécifiques d'un processus ou d'une voie particulière, elles sont utilisées par différentes enzymes E2.

I-4-2-3 L'enzyme de conjugaison de l'ubiquitine, E2

L'enzyme E2 fixe l'ubiquitine activée de la E1 au niveau d'une cystéine puis la transfère à la protéine substrat au niveau d'une lysine. Certaines E2 présentent une spécificité vis-à-vis des ubiquitines protéine-ligases E3 avec lesquelles elles fonctionnent (Hauser *et al.*, 1998 ; Farmer *et al.*, 2010).

I-4-2-4 L'enzyme de liaison de l'ubiquitine, E3

L'enzyme E3 permet la fixation de l'ubiquitine activée sur un résidu lysine du substrat qu'elle reconnaît spécifiquement, généralement en rapprochant la E2 du substrat pour favoriser le transfert de l'ubiquitine. Le motif de la protéine cible reconnu spécifiquement par la E3 ligase porte le nom de dégron. Il existe plusieurs classes d'enzymes E3 dont trois sont impliquées dans la régulation des acteurs clés du cycle cellulaire : l'APC, les « Cullin RING » et les « RING » (figure I.8 ; Marrocco *et al.*, 2010). Les E3 ligases à motif « RING-finger » sont monomériques, alors que l'APC (Anaphase Promoting Complex) et les « Cullin RING » sont des complexes E3 multimériques nécessitant une protéine RING.

Les protéines E3 à motif « RING-finger » possèdent le motif consensus CX2CX(9-39)CX(1-3)HX(2-3)C/HX2CX(4-48)CX2C qui interagit avec l'enzyme de type E2 et participe au processus d'ubiquitination de la protéine substrat (Jackson *et al.*, 2000).

L'Anaphase Promoting Complex (APC) est un complexe protéique comportant une protéine à domaine RING-finger. Le complexe APC est formé d'au moins 11 sous-unités structurales et de 3 sous-unités régulatrices, la plupart des sous-unités sont conservées chez tous les eucaryotes. Ce complexe cible un grand nombre de protéines clés du cycle cellulaire dont les cyclines. D'ailleurs, l'activité de l'APC a été mise en évidence à partir d'études biochimiques sur la dégradation de la cycline B dans les oocytes de palourdes (Hershko *et al.*, 1994, McLean *et al.*, 2011).

Les E3 de type Cullin RING Ligase (CRL) sont des complexes protéiques où la protéine culline joue le rôle de « charpente » entre un module catalytique et un module chargé de la spécificité de substrat (Deshaies, 1999). Les CRL sont impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire (Marrocco *et al.*, 2010). Ils se répartissent en deux sortes en fonction de la protéine Cullin associée : les complexes CRL1 contiennent une Cullin1 et les complexes CRL4 contiennent une Cullin4. Parmi les CRL1, le premier type de complexe ayant été identifié est le complexe SCF (SKP1/Cullin1/F-box). Il est formé d'une partie conservée commune à chaque complexe SCF constituée des sous-unités Cullin1, RBX (Ring-BoX protein), SKP1 (S-phase kinase-associated protein 1) et SGT1 (Suppressor of G2 allele of Skp1), et d'une partie variable qui est la F-box (Kamura *et al.*, 1999 ;

I-4-3 La protéolyse par le protéasome 26S

Le protéasome 26S est un gros complexe protéique composé d'un complexe 20S (Core Particule 20S » ou CP 20S), en forme de tunnel, responsable de l'activité protéolytique et de deux « coiffes » 19S ou RP19S (« Regulatory Particule »), une de chaque côté, responsables de la spécificité de substrat (Fruh *et al.*, 1994).

Le complexe 20S est composé de quatre anneaux de sept sous-unités. Les deux anneaux extérieurs sont composés de sous-unités de type α et les deux anneaux intérieurs sont formés de sous-unités de type β , à l'intérieur desquels la protéolyse a lieu.

La « coiffe » 19S est composée d'une base formée d'un anneau de six protéines et d'un couvercle formé de neuf sous-unités.

Les protéines cibles reconnues par la coiffe sont alors dé-ubiquitinées, puis dénaturées et pénètrent dans le tunnel où elles sont hydrolysées en peptides de 7 à 9 acides aminés.

I-4-4 La régulation par modification du substrat cible

De nombreux substrats de la voie d'ubiquitination doivent être modifiés pour être reconnus par les enzymes E3. La phosphorylation est très fréquemment utilisée notamment chez les cibles de complexes SCF (Verma *et al.*, 1997). Le substrat peut parfois être hydroxylé sur un résidu proline (Kim *et al.*, 2003), N-glycosylé (Yoshida *et al.*, 2002) ou encore isomérisé (Dharmasiri *et al.*, 2003).

I-4-5 Le cas de la régulation des CKI par l'UPS lors du cycle cellulaire

L'activation successive des différents complexes cycline/CDK provient de la destruction des inhibiteurs de type CKI au cours du cycle. Cette destruction est médiée par la voie de l'ubiquitine et du protéasome 26S, dite UPS (Ubiquitin Protéasome System). Les E3 ligases multimériques, APC et SCF, jouent un rôle prépondérant dans la dégradation des CKI lors du cycle cellulaire.

I-4-3-1 Cas de la régulation de SiC1 par l'UPS chez la levure

Chez la levure, l'inhibiteur de CDK, SiC1, est phosphorylé par CDK et cette phosphorylation permet à SiC1 d'être reconnu par le SCF^{CDG34} pour être envoyé à la dégradation par le protéasome 26S (Verma *et al.*, 1997).

I-4-3-2 Cas de la régulation des CIP/KIP par l'UPS chez les mammifères

Chez les mammifères, la famille des CKI de type CIP/KIP comprend trois membres : p21, p27 et p57. Au moins douze E3 ligases dirigent ces protéines vers la dégradation par le protéasome (Starostina et Kipreos, 2012). En effet, les CKI, CIP/KIP, présentent une flexibilité moléculaire et n'ont pas de structure tertiaire prédéfinie avant leur interaction avec d'autres protéines (Galea *et al.*, 2008). Cette flexibilité semble leur permettre d'interagir avec un grand nombre de protéines en acquérant différentes structures tertiaires en fonction de la protéine liée. Une stratégie utilisée par les E3 serait de cibler les CKI seulement lorsqu'elles sont liées à une protéine spécifique.

Ainsi le complexe SCF^{Skp2} reconnaît les CKI en complexes avec les CYC/CDK, ce qui permet de s'assurer que seules les CKI qui régulent activement le cycle sont ciblées pour la dégradation (Abbas et Dutta, 2009 ; Starostina et Kipreos, 2012). Le complexe SCF^{Skp2} est la E3 majoritaire dans la régulation de p21, p27 et p57. Skp2 est une protéine F-box contenant un motif Leucine-rich repeats. De la fin de la phase G1 au début de phase S, SCF^{Skp2} cible les CKI qui sont liées aux complexes Cycline E/CDK2 ou Cycline A/CDK2 et sont phosphorylées par ces mêmes kinases au niveau des résidus Sérine pour p21, ou des Thréonines pour p27 et p57 (Lu et Hunter, 2010). Un autre exemple est le complexe CRL4^{Cdt2} lequel cible p21 lorsqu'il est lié au PCNA grâce au motif PIP (PCNA Interacting Protein) pendant la phase S (Havens et Walter, 2009). Durant la mitose, p21 est aussi ciblé par le complexe APC/C^{Cdc20} qui reconnaît les substrats contenant un motif spécifique de destruction appelé D-box (McLean *et al.*, 2011, Amador *et al.*, 2007). Ces niveaux de régulation sont d'autant plus complexes que non seulement la dégradation de la protéine p27 est médiée par le SCF^{SKP2} (Auld *et al.*, 2007; Ungermannova *et al.*, 2005), mais p27 est également ubiquitylée par une E3 de type Kip : KPC (Kip1 ubiquitylation-Promoting Complex). De même, p57 est régulée aussi par le complexe SCF^{FBL12} (Starostina et Kipreos, 2012).

I-4-3-3 Cas de la régulation des KRP par l'UPS chez les plantes

Chez *Arabidopsis*, KRP6 et KRP7 sont reconnues pour leur dégradation par le SCF^{FBL17} au niveau du grain de pollen (Kim *et al.*, 2008, Gusti *et al.*, 2009). Cette dégradation semble importante pour la première division mitotique post-méiose dans ce processus de gamétogenèse. KRP6 est de plus la cible des E3 ligases, RHF1a et RHF1b, de type RING au cours du développement du gamétophyte (Liu *et al.*, 2008). De même, il a été montré que KRP1 est la cible d'au moins deux types de E3 ligases : SCF^{SKP2b}, un complexe de type SCF, et RPK, une E3 monomérique de type RING (Ren *et al.*, 2008). Les E3 de type complexe Cullin4 RING CRL4 joueraient également un rôle dans la dégradation de KRP1 au cours des cycles d'endoréplication successifs ayant lieu dans les trichomes (Roodbarkelari *et al.*, 2010). Concernant KRP2, il a pu être observé que cette protéine est dégradée par la voie du protéasome 26S mais la E3 ligase spécifique de KRP2 n'est cependant pas connue (Verkest *et al.*, 2005b).

L'implication de plusieurs E3 ligases dans la dégradation des protéines KRP permettrait donc un contrôle très fin de la quantité de CKI au cours du cycle cellulaire., ce qui permet un fonctionnement dose-dépendant de la régulation du cycle cellulaire (Verkest *et al.*, 2005b ; Inzé et De Veylder, 2006). Avec un faible niveau d'accumulation des KRP, l'activité CDK serait insuffisante pour promouvoir le cycle cellulaire mitotique mais l'endoréplication serait permise, tandis qu'avec un niveau élevé d'accumulation des CKI, la division cellulaire et l'endoréplication sont stoppées (De Veylder *et al.*, 2011).

Notons que la voie de dégradation des protéines SIM/SMR, l'autre famille de CKI existant chez les plantes, n'est pas connue.

II – Les CKI spécifiques des plantes de la famille SIM/SMR chez *Arabidopsis thaliana*

Rappelons que chez *Arabidopsis thaliana* les CKI se répartissent en deux familles: la famille KRP (ou ICK), homologue des Cip-Kip chez les animaux, qui compte 7 membres de 1 à 7 (Wang *et al.*, 1997 ; De Veylder *et al.*, 2001) et la famille SIM/SMR, spécifique des plantes, qui compte 14 membres : SIAMESE (SIM, Walker *et al.*, 2000), et

les SMR de 1 à 13 (Churchman *et al.*, 2006 ; Van Leene *et al.*, 2010 ; Skiryycz *et al.*, 2011 b). Tandis que de nombreuses études traitent de la structure, de la fonction et de la régulation des protéines KRP dans le cycle cellulaire et le développement de la plante, la caractérisation structurelle et fonctionnelle ainsi que la régulation des protéines SIM/SMR demeurent largement inconnues (De Veylder *et al.*, 2011). Mon travail de thèse vise à mieux connaître le rôle et la régulation de la famille SIM/SMR dans le contrôle du développement chez *Arabidopsis thaliana*. Voyons l'état des connaissances dans ce domaine publiées à ce jour.

II-1 Phylogénie et structure des protéines des familles KRP et SIM/SMR

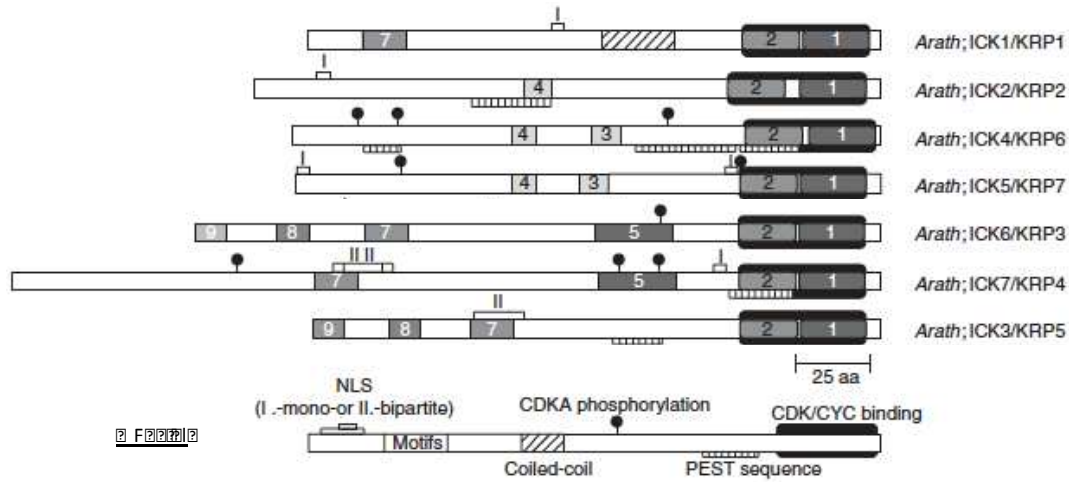
SIM est une petite protéine de 14 kDa et les protéines SMR pèsent entre 8 et 19 kDa. Par ailleurs, il a été montré que SIM, SMR1, SMR2 et SMR3 sont des protéines nucléaires (Churchman *et al.*, 2006). Les protéines KRP pèsent entre 19 et 32 kDa et l'ensemble des KRP sont nucléaires (Bird *et al.*, 2007 ; Wang *et al.*, 2008). Plus précisément, KRP1 est également cytoplasmique et pourrait même être exportée vers les cellules voisines (Weinl *et al.*, 2005), néanmoins elle serait active dans le noyau uniquement (Jakoby *et al.*, 2006). En terme de structure (figure I.9), le dégron de KRP1, c'est à dire le motif reconnu par une E3 ligase, est situé parmi les 108 premiers acides aminés (aa) en N-terminale de la protéine, le signal de localisation nucléaire (NLS) est situé dans la partie centrale de la protéine entre les aa 109 et 180 (Zhou *et al.*, 2003). Le motif NLS de KRP2 serait situé dans les 26 premiers acides aminés de la protéine (Bird *et al.*, 2007).

Les homologues de KRP et de SIM ont été identifiés sur la base du motif consensus de liaison aux cyclines/CDK (Churchman *et al.*, 2006, Peres *et al.*, 2007, Nafati *et al.*, 2010, Torres Acosta *et al.*, 2011). Ainsi, des orthologues de At-SIM chez la plante monocotylédone *Oryza sativa* ont été identifiés sous le nom de EL2 et EL2-like (Peres *et al.*, 2007). Des homologues de SIM sont aussi connus chez *Solanum lycopersicum* (Sl-SMR1, Sl-SMR2, Sl-SIP4), *Solanum tuberosum* (St-SMR1), *Zea mays* (Zm-SMR1, Zm-SMR2), *Populus tremula* (Pt-SMR1) et *Glycine max* (Gm-SMR1) (Churchman *et al.*, 2006). Quant aux KRP, des orthologues des At-KRP ont aussi été identifiés dans différentes

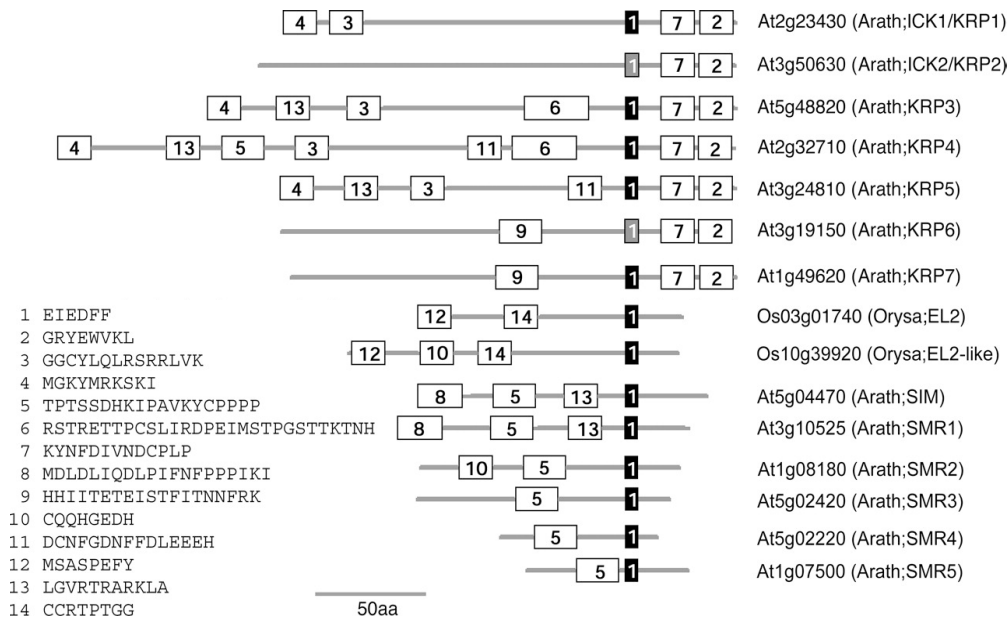
?

?

?



... u... F ... F e ... F ... r ... u ... F ... F ...
KdCC
 ... F ... F e ... F ... u ... u ... r ... F ... F ...
 ... F ... u ... F ...



... u... C... r ... F e ... r ... u ... F ... F ...
KddR
 ... r ... u ... F ... F e ... r ... u ... u ... r ... F ... F ...
 e ... r ... u ... F ... F e ... r ... u ... u ... r ... F ... F ...
 ... F ... u ... F ...

?

?

?

espèces végétales dont *Oryza sativa* (Os-KRP 1 à 6), *Solanum lycopersicum* (Sl-KRP1 et Sl-KRP2) et *Populus tremula* (Pt-ICK1 à 6) (Bisbis *et al.*, 2006 ; Torres Acosta *et al.*, 2011, Nafati *et al.*, 2010).

Aussi, bien que la conservation de séquences entre les SIM/SMR et les KRP soit globalement très faible, les alignements de séquence primaire des protéines CKI de plantes, ont permis d'identifier d'autres domaines de conservation (Churchman *et al.*, 2006, Peres *et al.*, 2007). Une représentation schématique des CKI chez Arabidopsis et le riz est présentée en figure I.10, cette figure révèle les principaux domaines putatifs des protéines At-KRP1 à 7, Os-KRP1 à 5, At-SIM, At-SMR1 à 5, Os-EL2 et Os-EL2-like. On y retrouve le domaine putatif d'interaction aux CYC/CDK, appelé domaine 1 ; sa séquence consensus est E[ILM][ED][EDR][FL]F. Le domaine 13 correspond à un autre domaine putatif de liaison aux cyclines, il s'apparente à un motif connu de liaison aux CYC/CDK présent chez d'autres protéines de régulation du cycle cellulaire comme E2F et RB (Churchman *et al.*, 2006 ; Adams *et al.*, 1996; Wohlschlegel *et al.*, 2001). Ces 2 domaines, notés 1 et 13 (Peres *et al.*, 2007) correspondent, respectivement, aux domaines 4 et 3 identifiés par Churchman *et al.* (2006). D'autres motifs remarquables (i.e. 5 et 8; Peres *et al.*, 2007) n'ont pas à ce jour de fonction établie.

II-2 Fonctions des KRP

Rappelons que la fonction des KRP, au niveau moléculaire, est d'interagir avec les complexes Cycline/CDK pour inhiber la fonction kinase de la CDK donnée. Les différents modules formés au cours des phases du cycle cellulaire par les CKI et les CYC/CDK sont présentés en figure I.2. Cette étude est une approche « interactomique » basée sur les techniques de double hybride, de BiFC (Bimolecular fluorescence complementation) et de TAP (Tandem affinity purification). La revue qui s'y réfère (Van Leene *et al.*, 2011) fournit une vue d'ensemble et la liste exhaustive des 416 interactions détectées entre les régulateurs fondamentaux du cycle chez Arabidopsis, dont 31 impliquent des KRP. Une autre étude interactomique présente 119 interactions entre les KRP et des régulateurs clés du cycle (Boruc *et al.*, 2010). La famille KRP appartenant à la machinerie de base du cycle cellulaire, les fonctions des différentes KRP dans divers processus de

développement et diverses voies d'adaptation à des stress sont pléthoriques (De Clercq *et al.*, 2006 ; Wang *et al.*, 2008). Les KRP jouent un rôle dans l'inhibition du cycle cellulaire et la régulation dose-dépendante de l'endoréplication. Ces processus sont directement liés au nombre et à la taille des cellules et donc plus globalement à la croissance des organes et de la plante (Gonzalez *et al.*, 2012).

Notamment, il a été montré que KRP5 est une protéine multifonctionnelle qui fait le lien entre l'élongation cellulaire et l'endoréplication grâce à la combinaison d'au moins trois modes d'action: l'inhibition de complexes Cycline/CDK, la régulation de la transcription de gènes impliqués dans l'endoréplication, la synthèse de la paroi et l'élongation cellulaire, et dans la modulation de la structure de l'hétérochromatine (Jégu *et al.*, 2013). Les auteurs ont montré que KRP5 interagit avec CYCD3;1 pour inhiber l'activité des complexes CYCD/CDKA, que KRP5 se fixe directement sur la chromatine pour induire l'expression de gènes impliqués dans différentes fonctions, tel que CDC20 qui code pour un activateur de l'APC/C, et que KRP5 décondenserait l'hétérochromatine. Par ailleurs, les auteurs observent que le mutant *kpr5* ne présente que de très légers défauts, ce qui suggère une grande redondance entre les KRP. Chez l'animal, des fonctions analogues d'activation de la transcription et de remodelage de la chromatine ont été attribuées à des CKI telles que p21 et p16, respectivement (Ferrandiz *et al.*, 2012, Becker *et al.*, 2009).

II-3 Fonctions des SIM/SMR dans le cycle cellulaire

II-3-1 La caractérisation du mutant *sim* révèle le rôle de SIM comme régulateur du cycle cellulaire

Le mutant perte de fonction *sim* a été identifié par l'équipe du professeur John C. Larkin grâce à ses trichomes multicellulaires (figure I.11 ; Walker *et al.*, 2000). Le mutant *sim* affecté dans le gène At5g04470 a été identifié lors d'un crible génétique sur une population mutagénisée à l'éthylméthane sulfonate (EMS). Il contient une mutation ponctuelle de substitution qui change le codon « start » ATG en ATA. Chez la plante sauvage, les trichomes sont formés d'une seule cellule. Chez le mutant *sim*, les trichomes sont composés de plusieurs cellules (Walker *et al.*, 2000). Ce phénotype résulte de l'absence d'inhibition de la division de la cellule formant le trichome. Chez un trichome

A2SG212K62ES 2I N2S 222k2 2 22- I N2I S 22222I A2422I - X2S 22- I N2I S 2222k2S 17 2I N2C26 CA2222222
23 sC2I 232NB I 22222222266 62M2C22I 2- CsM622NB I 2M S222N23 2C22S I 2I 3G22S 2222M6 r2322222
. à 2L2»« 2'222A2I - X2S U22 2s M2I 22I N2222A222266 62A22222NC32- 7 2A2As 2- I N2SI 2I 3G22S 22222
M6 r2322C2s 2S N2M2C222MM- CN2S 2A2S G21222 26 2C22r 222k ZZZq 222M2I 22I N222I A22A22266 62A2
s M22C7 262A2M2G27 2I N23C2AK2622I 3G22S 2222I 2- CsM622NB I 2I 2AN2M2A2A3I 3322NC27 2I N2
23 sC2I N2222D26227 S N2I N2As 22- 7 M2Cs 2L2622M2I N22A2S G212222227 S N2I N22AN22- I 22
22C2222C3As 22S 2I 3G22S 222A2NC32- 7 2AK2C2S I 22s 2S N222I 2323NB I 222222223G3A3 I 22266 623C22
2N2SI 2I 3G22S 2222I 2- CsM622NB I 2I s C2S C2I 2226 3222A2NC32- 7 2A222222M2I N22A2S G2122222 2
2AN2 23 A32 2s 2C3N2 2- 7 7 22 SI 2 Cs 1S 62N2S C2 222 622 N2I A3NB I 2 7 3N A2: 2I 2- CsM622NB I 2
V22SC227 2I 22222k ZZZàq2

2



2222222222222222 2222222222 22222222 22 22222 22 222222222222222 222 22222 2222 222222 2222 22222 22

2

2222222222 22 r a m d 2222 v è m è t 2222 t è t v è l d v è è t v 22222222 2g 2222r 22I 2v 2t 22222

22r 2222r 22222222t s 2222t v 22t 22I 2s 222

2

2 2A262I s 2A22222M2I N2A2NC2I A1sI 3ES 2A222UMC37 2I N26221eI 22222 2A SA26222- I N2è 6222S 2
MC- 7 - N2S C2- CN22N22- I AN2S NB 2222 222» w2q22S 2C3CS A2222227 - A22ES 222S 2N2222222I A222- I 22
A2SG21222- 6Z 2I N2S N2sI sCs 2A22N2I 26XAs 2A2M2C22s ES 3M22S 22C 22 2I 222C53 2V22SC227 2I 2
22222k ZZZàq 222A2M22I N2A2MCs A2I N2I N2SI 2 2I 3A7 22As GeC2222N26A2 2S 362A2MCs A2I N2I N222A2
22266 62As M22C7 262A22222U326A22MS A2I C2I 22A2ES 222226A222222M2I N22A2S G2122222 3G22S 2
2222I 2- CsM622NB I 222I A22222S 3622I S7 sC- 2 22AN2S 12627 2I N22 222N2S 22322AN2MS A2S 62Cs 2222D2
22A2M22I N2A2AS C2UMC2AA2S C2222222 22- 7 M2Cs 2L 2226 3222222M2I N22A2S G2122222M2I 22I N22A2
NC32- 7 2A2I 22223 eC2I N2M2A27 2I 3 2AN27 2I N2222222S U2222222M2I N22A2S G2122222N227 g 22

2

équipe a croisé ces lignées surexpresser de SIM avec le mutant *sim*, cette construction ne complémente pas le phénotype du mutant au niveau des trichomes. Les lignées surexprimant la protéine de fusion GFP-SIM sous promoteur 35S ce qui a permis de visualiser l'expression de SIM (Churchman *et al.*, 2006). Le profil d'expression observé est assez aléatoire puisqu'il varie d'une plante à l'autre dans une même lignée. Il peut être au niveau d'une cellule isolée ou en îlot de quelques cellules au niveau des feuilles, des tiges et des racines. D'une manière générale, GFP-SIM est exclue des tissus en division et notamment de la pointe racinaire. Les auteurs suggèrent qu'une pression de sélection forte contre la présence ectopique de cette protéine chez les plantes survivantes pourrait favoriser l'extinction du transgène. On peut aussi faire l'hypothèse que la protéine de fusion SIM-GFP est activement dégradée au niveau de ces tissus. On peut aussi remarquer que le phénotype de surexpression de SIM chez *Arabidopsis* est très similaire à la surexpression de KRP2 (Wang *et al.*, 2000, Verkest *et al.*, 2005b). Ceci suggère que les deux familles de CKI de plantes ont des fonctions similaires lorsqu'elles sont surexprimées.

II-3-3 La fonction des SIM/SMR au niveau moléculaire

La transition cycle mitotique/endocycle requiert notamment la suppression de l'activité des CDK mitotiques. Plusieurs résultats expérimentaux montrent que les SIM/SMR joueraient un rôle dans la suppression de cette activité.

Notamment, SMR1/LGO (Loss of Giant cells from Organs) apparait impliquée dans le contrôle de l'endoréplication dans les feuilles et les sépales (Roeder *et al.*, 2010). En effet, chez la plante sauvage des cellules pavementaires géantes se développent sur l'épiderme de la face abaxiale des feuilles et des sépales, or ces cellules sont absentes du mutant *lgo-1* ciblant le gène *SMR1* dans le fond génétique Landsberg, et les niveaux d'endoréplication dans les feuilles et les sépales du mutant *lgo-1*, et du mutant *lgo-2* ciblant le gène *SMR1* dans le fond génétique Columbia, sont inférieurs à ceux des plantes sauvages, Ler et Col0, respectivement. En revanche, le phénotype des trichomes n'est pas affecté chez le mutant *lgo-1*.

Par ailleurs, l'interaction de SIM, initialement avec CDKA;1 et CYCD2/3/4 a été montrée par FRET (Churchman *et al.*, 2006), et, de manière analogue, EL2, homologue de SIM

II-4 Régulation transcriptionnelle des *SIM/SMR*

Afin de limiter l'action des *SIM/SMR* à des fenêtres de temps court lors des transitions entre les phases du cycle cellulaire, la régulation de cette famille d'inhibiteurs du cycle doit se faire de façon spécifique et rapide. Une régulation post-traductionnelle des *SIM/SMR* doit certainement exister, cependant aucun élément n'est connu à ce sujet. Voyons maintenant les quelques éléments connus dans la régulation transcriptionnelle des *SIM/SMR*.

II-4-1 L'induction de SIM par les facteurs de transcription de type GLABRA

GLABRA 1 (GL1) et GLABRA 3 (GL3) sont des facteurs de transcription connus pour leur rôle essentiel dans la formation des trichomes. GL1 est un facteur de type MYB et GL3 est un facteur de type bHLH (basic Helix-loop-helix) (Payne *et al.*, 2000 ; Morohashi et Grotewold 2009). Le mutant *glabra1 (gl1)* ne possède quasiment pas de trichomes alors que le mutant *gl3* possède des trichomes déficients en terme de taille de cellule, de nombre de branches et de niveaux d'endoréplication (Hulskamp *et al.*, 1994, Payne *et al.*, 2000). Il a été montré par ChIP-chip, que *SIM* est une cible directe de ces deux facteurs de transcription (Morohashi et Grotewold, 2009). Le rôle de GL3 dans l'induction de *SIM* a été confirmé par les travaux de Jakoby *et al.* (2008). Cette régulation transcriptionnelle de *SIM* par GL3 relie directement le contrôle développemental de la destinée cellulaire avec le contrôle du cycle cellulaire (De Veylder *et al.*, 2011). Toutefois, la régulation directe des gènes *SIM/SMR* et les facteurs moléculaires potentiellement impliqués dans cette régulation demeurent largement inconnus.

II-4-2 Influence des voies de signalisation hormonales sur l'expression des CKI

Plusieurs études ont montré une implication de la signalisation hormonale dans la régulation de l'expression des CKI chez *Arabidopsis*.

Chez le mutant *ga1-3*, déficient dans la voie de signalisation des gibbérellines (GA), *KRP2*, *SIM*, *SMR1*, et *SMR2* voient leur expression augmenter d'un facteur deux par

rapport à la plante sauvage (Achard *et al.*, 2009). Chez ce mutant, les protéines DELLA sont fortement accumulées, une situation similaire à celle trouvée lors de certain stress. Les données d'expression des gènes d'Arabidopsis issues d'analyses transcriptomiques disponibles sur le site eFP Browser (bar.utoronto.ca ; Winter *et al.*, 2007) indiquent un niveau absolu d'expression de *SIM* et de *SMR1* plus élevé chez *ga1-3* que chez Col-0, en revanche un traitement aux gibbérellines n'a pas d'effet le niveau d'expression de ces gènes chez ces deux génotypes.

Par ailleurs, l'auxine et l'acide abscissique ont été montrés comme impliqués dans la régulation transcriptionnelle de certaines KRP. L'auxine inhibe *KRP2* au niveau transcriptionnel, elle régulerait aussi *KRP1* et *KRP2* au niveau post-transcriptionnel en favorisant leur protéolyse par la voie du protéasome 26S, ce qui aurait pour effet d'augmenter le potentiel de division cellulaire (Sanz *et al.*, 2011, Verkest *et al.*, 2005 b, Jackoby *et al.*, 2006, Ren *et al.*, 2008). L'acide abscissique (ABA) quant à lui, serait impliqué dans la régulation transcriptionnelle de *KRP1* (Wang *et al.*, 1998). Une CKI homologue des KRP chez le riz serait également induite par l'ABA d'un facteur 3,5 (Yang *et al.*, 2011).

II-4-3 Modulation de l'expression des CKI en réponse aux stress environnementaux

Au niveau transcriptionnel, les gènes de la famille *SIM/SMR* répondent à des stress environnementaux biotiques et abiotiques chez le riz et chez Arabidopsis (Peres *et al.*, 2007). L'expression de *Os-EL2* est induite précocement et fortement (facteur >10) par un traitement à l'acide propionique qui mime l'élicitation par un agent pathogène (stress biotique), *Os-EL2* est également induit de façon très significative (facteur >10) par des stress abiotiques d'exposition au froid et à la sécheresse (Peres *et al.*, 2007). L'analyse des niveaux absolus d'expression des gènes *SIM* et *SMR1* à *SMR5* d'Arabidopsis déduits des analyses transcriptomiques disponibles à partir de eFP Browser (bar.utoronto.ca ; Winter *et al.*, 2007) en réponse à différents stress biotiques et abiotiques montre que la plupart des niveaux d'expression de ces gènes ne varient pas voire, sont réprimés et les inductions, si observées restent plutôt modestes (facteurs d'induction compris entre 2 et 3). Seul le comportement de *SMR5* apparaît singulier, il est induit par toutes les

catégories de stress. Notons également qu'un stress génotoxique semble induire l'expression de *SMR4* et un stress osmotique induirait l'expression de *SMR3*.

Deux publications sont venues confirmer les données de transcriptomique concernant le stress génotoxique par cassure double-brin de l'ADN. Ce stress semble effectivement induire l'expression des gènes *SMR1*, *SMR4* et *SMR5* (Culligan *et al.*, 2006 ; Cools et De Veylder, 2008). Ces données ont aussi été confirmées par les travaux de Adachi *et al.* (2011) pour les gènes *SMR1* (facteur 9) et *SMR5* (facteur 2) et ont montré également l'induction de *SIM* (facteur 15) en réponse à ce stress génotoxique.

Chez d'autres espèces végétales, le stress a également des effets sur l'expression des CKI. Ainsi, le gène *OsiICK6*, codant pour un homologue des KRP chez le riz (*Oryza sativa*), est induit par les stress froid (facteur 2,5), ABA (facteur 3,5) et mannitol (facteur 2,5) (Yang *et al.*, 2011). Et chez le maïs, en conditions d'exposition au froid, *Zm-KRP1* et *Zm-KRP3* sont induits, tandis que *Zm-KRP2* est réprimé (Rymen *et al.*, 2007).

III – L'effet du stress hydrique sur la croissance chez *Arabidopsis*

III-1 La croissance des feuilles en condition standard chez *Arabidopsis*

La croissance des feuilles, comme pour tout autre organe, est le résultat de la division (prolifération) cellulaire et expansion cellulaire. Chez *Arabidopsis*, durant les premiers jours, la croissance d'une feuille est uniquement due à la prolifération cellulaire (figure I.13, Skiryecz et Inzé, 2010b). Au bout de quelques jours (i.e. 6 à 7 jours, selon les conditions de culture), certaines cellules sortent du cycle cellulaire mitotique et entrent dans un processus d'élongation (expansion) cellulaire. Après quelques jours encore (i.e. 11 à 13 jours, selon les conditions de culture), toutes les cellules, à l'exception des méristémoïdes, sont entrées en phase d'élongation (Gonzalez *et al.*, 2012). Au delà de 18 à 20 jours selon les conditions de culture, la croissance des feuilles est dirigée uniquement par l'expansion des cellules. Les cellules proches de la pointe de la feuille arrivent les premières à maturité et stoppent leur croissance. Finalement, le nombre

final de cellules et leur taille constituant une feuille peuvent dépendre de la durée des phases de prolifération et d'expansion des cellules, ainsi que de la durée du cycle cellulaire et du taux d'expansion cellulaire (i.e. expansion par unité de temps). La transition entre la division cellulaire et l'expansion cellulaire est souvent associée à la transition mitose/endoréduplication (Beemster *et al.*, 2005 ; Breuer *et al.*, 2010).

L'expansion cellulaire est principalement due à l'augmentation de la turgescence, au relâchement de la paroi cellulaire et à la synthèse *de novo* de composants de la paroi cellulaire (Harb *et al.*, 2010). Cette paroi est composée de cellulose et d'hémicelluloses dans une matrice de pectines et de protéines (Cosgrove et Daniel, 2005). Les expansines sont les enzymes qui catalysent, à pH acide, la rupture des liaisons hydrogènes entre la cellulose et la matrice environnante, ce qui conduit à un glissement de la pile des composants de la paroi et par conséquent, augmente l'extensibilité de la paroi (McQueen-Mason *et al.*, 1992, Harb *et al.*, 2010).

Le contrôle complexe de la croissance des feuilles nécessite l'intégration des différents procédés tels que le taux de division cellulaire, le moment de la transition division/expansion, la durée de la phase d'expansion et le taux d'expansion des cellules ainsi que le contrôle de la division des méristémoides (Gonzalez *et al.*, 2012). Cette complexité est accentuée par la régulation de ces différents procédés à un niveau hormonal. Ainsi les protéines DELLA, régulateurs négatifs de la voie des gibbérellines, inhibent la croissance de la feuille en altérant le taux de division puis le taux d'expansion cellulaire (Achard *et al.*, 2009). De même, AUXIN RESPONSE FACTOR2 (ARF2), un facteur de transcription qui intervient dans l'expression des gènes en réponse à l'auxine, est un répresseur de la croissance cellulaire affectant la division et l'expansion des cellules (Okushima *et al.*, 2005). Un phénomène de compensation a été observé dans différents mutants où la diminution du nombre de cellules est associée à une augmentation de la taille des cellules, mais ceci ne suffit généralement pas à compenser la diminution de la surface foliaire (Horigushi et Tsukaya, 2011). De même, la surexpression des KRP et de SIM induit un phénotype avec un faible nombre de cellules et une remarquable hypertrophie des cellules, cependant la taille finale des feuilles est bien plus petite que celle de la plante sauvage (De Veylder *et al.*, 2001, Churchman *et al.*, 2006).

mécanismes : l'évitement et la tolérance (Verslues *et al.*, 2006). Par exemple, durant une période de sécheresse, les plantes ferment leurs stomates et accumulent des solutés compatibles pour maintenir un potentiel hydrique faible et éviter la déshydratation (Creelman et Zeevaart, 1985). Ce procédé fait notamment intervenir l'acide abscissique (ABA) décrit comme un régulateur clé de la conductance stomatique (Tardieu et Davies, 1992). Simultanément, des protéines de protection sont synthétisées comme les DEHYDRIN et les anti-oxydants qui vont abaisser le niveau de ROS (Reactive Oxygen Species) émis en réponse au stress, permettant de limiter les dommages pouvant être subis par d'autres protéines, notamment au niveau des membranes (Apel et Hirt, 2004 ; Verslues *et al.*, 2006).

Toujours en réponse au stress, les plantes vont également réduire leur croissance afin d'économiser et de redistribuer leurs ressources. La réduction de la croissance se produit rapidement après le début du stress, et indépendamment du processus de photosynthèse. En effet, cette réduction de croissance constitue une réponse adaptative active et, n'est pas un effet secondaire de la limitation des ressources. Les mécanismes moléculaires d'inhibition de la croissance en réponse au stress sont encore mal caractérisés (Skirycz *et al.*, 2010a et b). La sécheresse réduit la croissance des feuilles en affectant à la fois la division et l'expansion cellulaire (Skirycz *et al.*, 2010a, Aguirrezabal *et al.*, 2006). L'inhibition de la croissance des plantes lors de l'apparition d'un stress hydrique se fait en deux temps : une réponse rapide d'inhibition de la croissance dite réponse d'urgence, puis une réponse adaptative, combinant récupération et adaptation de la croissance de la plante aux nouvelles conditions (figure I.13; Skirycz et Inzé, 2010b). La réaction d'urgence aurait pour but de préparer la plante à une éventuelle aggravation de ses conditions de vie, la réponse adaptative peut être considérée comme la mise en place d'un nouvel état d'équilibre lorsque le stress se prolonge mais reste stable. Lors d'un stress hydrique dans les feuilles d'*Arabidopsis*, l'abaissement du taux d'expansion est compensé par l'allongement de la durée d'expansion (Aguirrezabal *et al.*, 2006).

Enfin, l'acclimatation au stress provoque un ajustement de la structure de la paroi (Harb *et al.*, 2010). Les propriétés physiques de la paroi cellulaire jouent un rôle crucial dans la réponse des plantes au déficit hydrique (Bacon, 1999). Lors d'un stress hydrique sévère

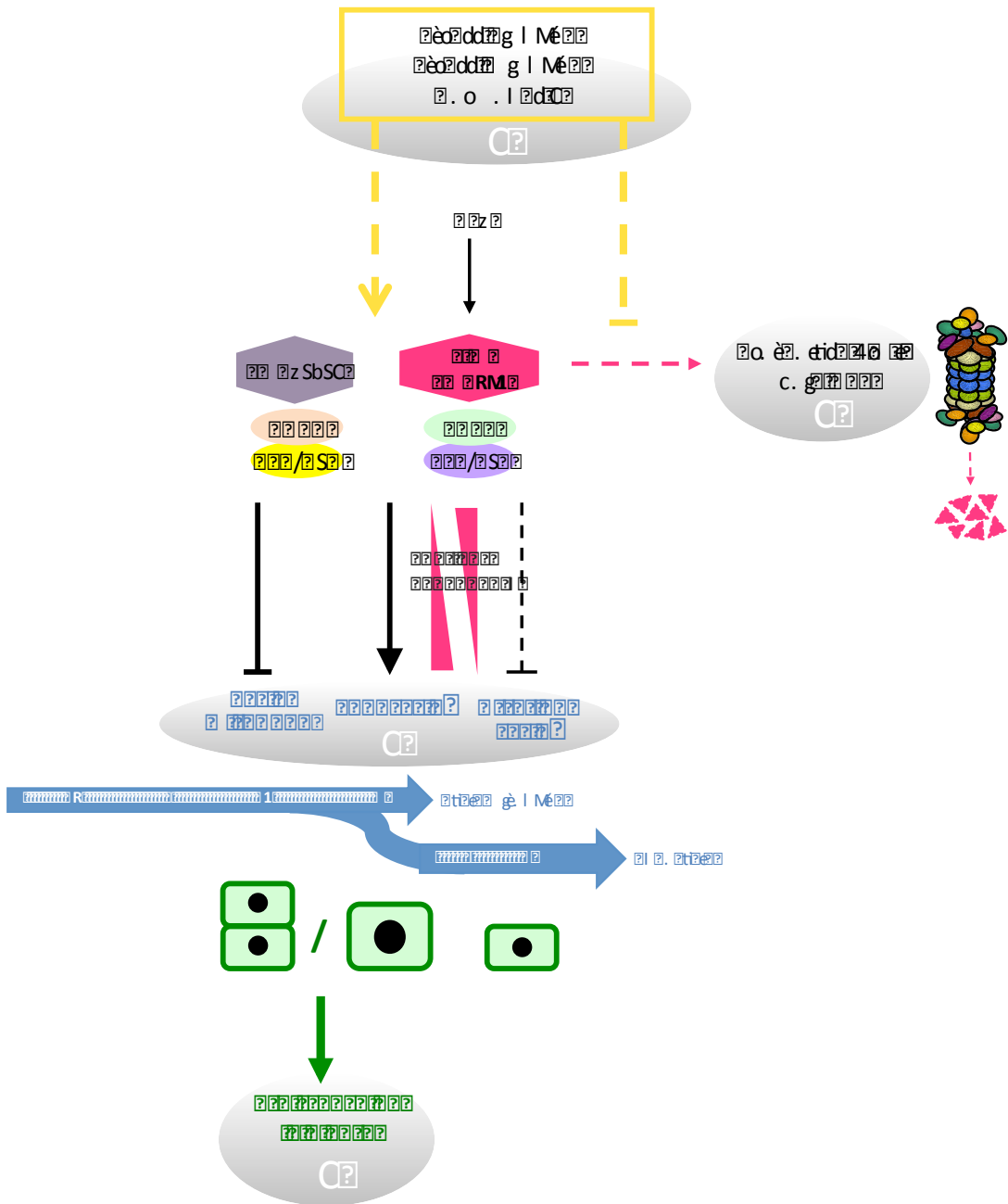
de nombreux gènes codant pour des Expansines sont réprimés (Bray, 2004). En revanche lors d'un stress modéré, les gènes codant pour des Expansines sont induits (Skirycz *et al.*, 2010a). Malgré les nombreuses études sur l'expansion des cellules en réponse à la sécheresse, les bases moléculaires de ce processus dans les réponses des plantes aux stimuli externes sont mal connues (Mathews *et al.*, 1984; Aguirrezabal *et al.*, 2006; Granier et Tardieu, 2009, Harb *et al.*, 2010).

III-3 Techniques expérimentales d'application du stress hydrique et de phénotypage

Le stress hydrique peut être reproduit expérimentalement de différentes manières. La sécheresse en sol est étudiée avec des expériences de défaut d'arrosage dans les conditions de culture d'*Arabidopsis* (Harb *et al.*, 2010). Le stress osmotique induit par le manque d'eau peut être reproduit par des expériences en condition de culture *in vitro* sur un milieu enrichi en sels ou en mannitol (Verslues *et al.*, 2006 ; Claeys *et al.*, 2012 ; Skirycz *et al.*, 2010a). On peut également induire la réponse au stress hydrique par l'application d'une phytohormone exogène: l'acide abscissique (ABA) (Verslues *et al.*, 2006 ; Ruggiero *et al.*, 2004 ; Verelst *et al.*, 2010). Il existe différentes intensités de stress qui peut aller du plus modéré au plus sévère, conduisant à la mort des plantes. Pour reproduire un stress modéré de sécheresse, des plateformes automatisées, telles que le PHENOPSIS et le WIWAM (Weighing Imaging and Watering Machine), permettent quotidiennement de contrôler l'arrosage et de mesurer la taille des rosettes de plantes cultivées dans le sol (Granier *et al.*, 2006 ; Skirycz *et al.*, 2011a). Les graines germent et les plantes sont cultivées dans des conditions de contrôle jusqu'au stade 1,04, c'est à dire que la rosette comporte 4 feuilles d'une longueur supérieure à 1 mm (Boyes *et al.*, 2001). Ensuite l'arrosage est continu pour les plantes témoins, mais il est arrêté pour les plantes stressées jusqu'à ce que le stress atteigne un certain niveau qui sera maintenu constant par la suite. Dans les conditions de stress modéré du WIWAM, le séchage progressif du sol entraîne chez la plante sauvage une diminution progressive du taux de croissance, avec une réduction finale de l'aire de la rosette de l'ordre de 30 à 40% comparé à la croissance en condition normales (Skirycz *et al.*, 2011a). Pour déterminer si les lignées d'intérêt (d'un génotype donné) présentent une réponse spécifique à la

sécheresse significativement différente de celle de la plante sauvage, une analyse statistique doit être effectuée au cours du temps pour déterminer l'interaction « génotype * environnement » entre les deux paramètres indépendants de génotype et de conditions environnementales (Aguirrezabal *et al.*, 2006 ; Skirycz *et al.*, 2011a).

La mesure de l'aire des rosettes et des feuilles nous informe sur la croissance des plantes. Pour connaître la part de la division et de l'expansion cellulaire dans la taille des feuilles, il convient de mesurer le nombre et la taille des cellules composant ces feuilles. Pour cela, la taille et le nombre des cellules épidermales sont analysées, car il s'agit d'un bon indicateur du taux de division (Donnelly *et al.*, 1999).



Écologie de la population et de la communauté : l'impact des interactions et des perturbations sur la structure et la dynamique des populations et des communautés.

Écologie de la population : l'étude de la dynamique des populations, de leur structure et de leur interaction avec l'environnement. Écologie de la communauté : l'étude de la structure et de la dynamique des communautés, de leur interaction avec l'environnement et de leur réponse aux perturbations.

Les populations et les communautés sont influencées par de nombreux facteurs, tels que la disponibilité des ressources, les interactions entre espèces, les conditions environnementales et les perturbations naturelles ou anthropiques. L'étude de ces systèmes permet de mieux comprendre les processus écologiques et de prédire les conséquences des changements environnementaux.

Les modèles mathématiques et les simulations informatiques sont souvent utilisés pour étudier la dynamique des populations et des communautés. Ces outils permettent de tester des hypothèses et de prédire les effets de différentes perturbations sur les systèmes écologiques.

En conclusion, l'écologie de la population et de la communauté est un domaine de recherche essentiel pour comprendre les processus écologiques et pour évaluer l'impact des perturbations sur la biodiversité et les écosystèmes.

MODELE ET OBJECTIFS DE LA THESE

En raison de leur rôle dans la transition cycle mitotique/cycle d'endoréplication et l'induction de leur expression par le stress, les SIM/SMR, comme les KRP, sont considérés comme de bons candidats pour relier l'activité du cycle cellulaire aux stimuli de l'environnement (Rymen *et al.*, 2007, Peres *et al.*, 2007, Skiryecz et Inzé, 2010b, Marrocco *et al.*, 2010). Un modèle spéculatif du rôle et de la régulation des SIM/SMR dans la modulation du cycle cellulaire en réponse à différents stimuli environnementaux et développementaux est présenté en figure I.14. Il situe les questions qui ont orienté mon travail de recherche par rapport aux mécanismes déjà identifiés.

Notons que toutes les SMR ne sont pas complètement redondantes dans leur fonction. De même que leurs homologues les KRP, les SIM/SMR pourraient être dégradées par la voie UPS (Marrocco *et al.*, 2010). Cette protéolyse, potentiellement contrôlée par des signaux de stress ou de développement via des voies de signalisation hormonales, en combinaison avec des voies de régulation transcriptionnelle, pourraient permettre un dosage fin de la quantité de SIM/SMR présentes, contrôlant ainsi le choix de la destinée cellulaire par un mécanisme dose-dépendant de la transition vers l'endoréplication et du maintien ou non de l'endoréplication. Les SIM/SMR pourraient assurer au niveau moléculaire l'intégration des signaux de stress contrôlant la destinée cellulaire et de fait le développement et la croissance de la plante.

En utilisant la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, mon travail de thèse vise à répondre à deux objectifs principaux. Le premier objectif consiste à approfondir les connaissances sur la régulation des CKI aux niveaux transcriptionnel et post-traductionnel. Le deuxième objectif propose de mieux comprendre le rôle de la famille plante-spécifique des SIM/SMR dans l'adaptation du développement de la plante à des conditions de stress hydrique.

II - MATERIEL ET METHODES

I - Matériel

I-1- Matériel végétal

I-1-1 *Arabidopsis thaliana*

I-1-1-1 *Arabidopsis thaliana* sauvages

Des plantes des écotypes Columbia (Col-0) et Landsberg erecta (Ler) ont été utilisées pour les différentes expériences.

I-1-1-2 *Arabidopsis thaliana* mutantes

Le mutant *sim-1*, qualifié par la suite mutant *sim*, ciblant le gène At5g04470 est décrit dans Walker *et al.*, 2000, et Churchman *et al.*, 2006. Il a été identifié dans un crible génétique à l'éthylméthane sulfonate (EMS), le mutant *sim-1* original a été croisé 3 fois avec Col-0 (Lehle). Il contient une mutation ponctuelle de substitution qui change le codon « start » ATG en ATA. Cette mutation a été vérifiée par séquençage.

Les mutants *smr1* (SALK 33905) ciblant le gène At3g10525, *smr2* (SALK 6089) ciblant le gène At1g08180 et *smr5* (SALK 100918) ciblant le gène At1g07500 proviennent de la collection de mutants d'insertion T-DNA du SALK (Alonso *et al.*, 2003). Cette collection a été obtenue par agro-transformation de l'écotype Columbia avec un ADN-T portant un gène de résistance à la kanamycine qui permet sa sélection *in vitro*. Le double mutant *sim.smr1* et le triple mutant *sim.smr1.smr2* ont été obtenus par croisements des simples mutants. Tous les mutants, à l'exception de *smr5*, ont été donnés par le Pr. John Larkin (Department of Biological Sciences College of Science, Louisiana State University, Baton Rouge, USA). Les lignées homozygotes ont été vérifiées par PCR en combinant l'amorce LBa1 (5'-TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG-3'), et respectivement pour les différentes lignées:

- SALK 33905 : LP (5'-AACATGTACCACCCATTGCTC-3'),
RP(5'-CAAACCCTTCTCAACCTCTCAC-3');
- SALK 6098 : LP (5'-CGATGTCTGAATCATTCAATGC-3'),
RP (5'-CTAACTAATTGACTCCGGCATAG-3');
- SALK 100918: LP (5'-GAACGAACAAAAGTGAGCTCG-3'),

RP (5'-TTTCCCAACCTGACAGAAAAC-3').

I-1-1-3 Autres lignées *Arabidopsis thaliana* transgéniques

L'ensemble des constructions a été obtenu par le système « Gateway » (Invitrogen) et les transgènes ont été introduits dans un fond génétique sauvage Col-0. Les lignées transgéniques (tableau II.1) *pSIM::GUS*, *pSIM::SIM-GFP*, *35S::GFP-SIM*, *35S:SMR1-3HA-GFP*, *35S:SMR1 K>R-3HA-GFP*, *pSMR1:SMR1-3HA-GFP* et *pSMR1:SMR1 K>R-3HA-GFP* ont été générées au laboratoire. Les lignées *pSMR1::GUS*, *pSMR2::GUS*, *pSMR3::GUS*, *pSMR4::GUS*, *pSMR5::GUS*, *pSMR5::SMR5-GFP* et *pSMR7::SMR7-GFP* ont été confiées par le Pr. Lieven De Veylder (Plant Systems Biology - Vlaams Instituut voor Biotechnologie « PSB-VIB », Gent University, Belgium).

Tableau II.1. Liste des constructions des lignées *Arabidopsis thaliana* transgéniques

Constrution	Vecteur d'entrée	Vecteur de destination	Amorces F	Amorces R
pSIM:SIM-GFP	pDONR207	pMDC204	1	2
35S:GFP-SIM	pDONR207	pB7WGF2	3	2
35S:GFP-SIM	pDONR221	pB7WGF2	3	2
pSIM:GUS	pDONR207	pBGWFS7	1	4
35S:SMR1-3HA-GFP	pDONR207	pB7FWG2	5	6,7
pSMR1:SMR1-3HA-GFP	pDONR-P4P1r pSMR1, pDONR207 SMR1-3HA-GFP	pK7m34GW	8,5	9,6-7
35S:SMR1 K>R-3HA-GFP	pBluescripT SMR1 K>R, pDONR207 SMR1 K>R-3HA-GFP	pB7FWG2	5	7
pSMR1:SMR1 K>R-3HA-GFP	pDONR-P4P1r pSMR1,pDONR207 SMR1 K>R-3HA-GFP	pK7m34GW	8,5	9,7
pSMR1:GUS	pDONR-P4P1r pSMR1	pMK7S*NFmGW	8	9

Amorces Séquence des Amorces

- 1 GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCTTTTCTGTACCTTTTTTTTTGGGC
- 2 GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATCTTCGTGAACAAGAACGGAA
- 3 GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGATCTTGATTAATAACAAG
- 4 GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGTATATGTTCTTGAAGAGTTG
- 5 GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGATCTTGAATTACTACAAGATTT
- 6 GGATCCTGCATAGTCCGGGACGTCATAGGGATAGCCCGCATAGTCAGGAACATCGTATGGGTAACCAGCACCTCTTCGAGAACAATAAGGGT
- 7 GGGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGTACAGCAGCGTAATCTGGAACGTCATATGGATAGGATCCTGCATAGTCCGGGAC
- 8 GGGGACAAGTTTGTATAGAAAAGTTGACAAGTGCATTTTTAATTTGTAGG
- 9 GGGACTGCTTTTTGTACAAACTTGATCTAAACTTGTGTATGTTTTTG

I-1-2- *Nicotiana benthamiana*

Des plantes *Nicotiana benthamiana* de cinq à sept semaines sont utilisées pour les expériences de localisation et de quantification de protéines fusionnées à la GFP (Tableau II.2) suite à des transformations transitoires réalisées par agroinfiltration dans les feuilles.

Tableau II.2. Liste des constructions infiltrées chez *Nicotiana benthamiana*

Construction	Vecteur d'entrée	Vecteur de destination	Amorces F	Amorces R
35S:GFP-SIM	pDONR207	pB7WGF2	3	2
35S:GFP-SIM N29	pDONR207	pB7WGF2	3	10
35S:GFP-SIM N64	pDONR207	pB7WGF2	3	11
35S:GFP-SIM N85	pDONR207	pB7WGF2	3	12
35S:GFP-SIM c25	pDONR207	pB7WGF2	3	13
35S:GFP-SIM c12	pDONR207	pB7WGF2	3	14
35S:GFP-KRP2	pDONR207	pB7WGF2	16	16
35S:GFP-KRP2 N50	pDONR207	pB7WGF2	17	16
35S:GFP-KRP2 N87	pDONR207	pB7WGF2	18	16
35S:GFP-KRP2 N26	pDONR207	pB7WGF2	19	16
35S:GFP-KRP2 N13	pDONR207	pB7WGF2	20	16
35S:SMR1-3HA-GFP	pDONR207	pB7FWG2	5	6,7
35S:SMR1 K>R-3HA-GFP	pDONR207	pB7FWG2	5	7

Amorces Séquence des Amorces

10	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTACGGCGCGGCTGCACCACT
11	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCGTCGTCTCTCGGCATCAGA
12	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATCGTCAACAAAGATGAGATC
13	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATCATTGGTTGTAACAGAGGAGA
14	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATCAGGCCACCGTGATAGCCGTCG
15	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGCGGCGGTTAGGAGAAG
16	GGGGACCACTTTGTACAGAAAGCTGGGTTTCATGGATTCAATTTAACCC
17	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGTGGAATTGTGGCGAGAAATTC
18	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCGTCGGTTTCGTGTTGTTCTAC
19	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGAGGAGGAAGTGGATTTA
20	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGAGAATGGAGTTACGACGAC

I-2 Souches bactériennes

I-2-1 *Escherichia coli*

I-2-1-1 *Escherichia coli*, souche DB3.1 (Invitrogen)

La souche DB3.1 est utilisée pour l'amplification des plasmides de type « Gateway » (Invitrogen) contenant le gène *ccdB* qui code pour une protéine qui interfère avec la gyrase de la bactérie. Cette souche contient l'allèle *gyr462*, ce qui lui permet de résister aux effets toxiques du gène *ccdB*.

I-2-1-2 *Escherichia coli*, souche Top10 (Invitrogen)

La souche Top10 a été utilisée pour l'amplification des plasmides de types « Gateway » contenant un insert à la place du gène *ccdB*.

I-2-2 *Agrobacterium tumefaciens*

Des Agrobactéries de la souche GV3101 (pMP90) ont été utilisées. Cette bactérie phytopathogène comporte le gène de résistance à la rifampicine sur son chromosome et contient le plasmide Ti désarmé pMP90 portant un gène de résistance à la gentamycine et les gènes de virulence *Vir* capables de mobiliser en *trans* une portion d'ADN situé entre les frontières droite et gauche de l'ADN-T (ADN de transfert) et de l'intégrer dans le génome végétal. Avant transformation dans *Agrobacterium tumefaciens*, les constructions sont vérifiées par séquençage, puis utilisées pour la transformation stable d'*Arabidopsis thaliana* par la méthode d'immersion florale et la transformation transitoire par infiltration de *Nicotiana benthamiana*.

II - Méthodes

II-1 Techniques relatives aux plantes

II-1-1 Conditions de culture

II-1-1-1 Culture d'*Arabidopsis thaliana* in vitro

Les graines d'*Arabidopsis* sont stérilisées par un traitement à l'éthanol 70% en présence d'une goutte de détergent Tween 20. Elles sont placées sous agitation pendant 15 minutes puis lavées 3 fois à l'éthanol 98% pendant 5 minutes. Les graines sont ensuite séchées sous une hotte à flux laminaire. Ces dernières sont étalées sur milieu Murashige & Skoog (MS255 de Duchefa, Past-Agar à 0,7% (p/v), pH 5,8) supplémenté de 1%(p/v) de saccharose et contenant un agent de sélection si nécessaire. Les boîtes sont alors placées à l'obscurité, à 4°C pendant 48h afin d'obtenir une germination synchrone des graines. Elles sont ensuite transférées en logettes (22°C, 16 h de jour, 8 h de nuit) pour permettre la croissance en position horizontale des plantules. Pour les expériences de mesure de la taille des racines, les boîtes sont placées à la verticale.

Pour les expériences de stress osmotique, les plantes sont cultivées sur milieu MS puis après 5 jours transférées sur du milieu MS enrichi en NaCl 100mM, ou après 8 jours sur

du milieu MS enrichi en mannitol 25mM. Les graines sont semées sur une membrane de nylon mesh de 20 µm (Prosep) afin de limiter le stress des plantes lors du transfert. Les expériences de stress hormonal sont réalisées par traitement à l'acide abscissique (ABA). L'hormone ABA exogène, en solution à 100 µM, est répandue en spray sur des plantes de 2 semaines cultivées *in vitro*.

II-1-1-2 Culture d'*Arabidopsis thaliana* en sol

A l'IBMP, les graines sont semées sur le terreau et placées en logette (21°C/18°C, 12 h de jour, 12 h de nuit). Après 2 semaines de culture, les plantules sont transférées dans des pots individuels, et replacées en logette avant leur transfert en serre où la photopériode est de 16h de jour et 8h de nuit (20°C/16°C). Deux à trois semaines après le repotage, les plantes développent une hampe florale dont les fleurs servent aux croisements.

Au PSB-VIB (Gand, Belgique), les graines sont semées individuellement sur des pastilles de terreau Jiffy réhydratées de façon égale et contenues dans des plateaux Jiffy, puis les graines sont placées en serre où la photopériode est de 16 h de jour et 8 h de nuit (20°C/16°C). Une à deux semaines après germination les plantules excédentaires sont éliminées afin d'obtenir une plante par pastille.

II-1-2 Techniques de transformation de plantes

II-1-2-1 Transformation stable d'*Arabidopsis*

La transformation des plantes a été effectuée par la méthode d'immersion florale ou « floral dipping » (Clough *et al.*, 1998). Des plantes transgéniques ont été obtenues par transformation de plantes Col-0. Les transformants T1 ont été sélectionnés *in vitro* sur des milieux sélectifs contenant des antibiotiques en fonction de la résistance qui a été conférée par le vecteur binaire. Les lignées homozygotes pour le transgène (i.e. présentant 100% de résistants en T3) ont été sélectionnées pour la suite des analyses.

II-1-2-2 Transformation transitoire de *Nicotiana benthamiana*

Des cultures d'agrobactéries sur boîte LB (Luria-Bertani, Bacto-Agar 15 g/l, antibiotiques adéquats), contenant d'une part la construction à tester et d'autre part le

gène p19 codant pour un inhibiteur de silencing (Voinnet, 2003), servent à ensemencer 10 ml de culture liquide sous agitation en milieu LB en présence des antibiotiques adéquats pendant environ 20h à 28°C. Ces cultures sont centrifugées (10 min à 3500g) puis resuspendues dans une solution d'infiltration (MgCl₂ 10 mM, Acétylsyringone 200 µM) pour obtenir une densité optique égale à 1. Les 2 cultures d'agrobactéries contenant la construction à tester et le gène p19 sont mélangées et placées sous agitation à température ambiante pendant 1 à 2 h. On infiltre les feuilles, coté inférieur, à l'aide d'une seringue de 1 ml sans aiguille. 3 feuilles de 3 plantes sont infiltrées par construction à tester. Les plantes sont placées 48 h en logette. L'expression des protéines d'intérêt fusionnées à la GFP est vérifiée par microscopie à fluorescence dans les cellules épidermales.

II-1-2-3 Transformation transitoire de cellules BY-2

Des protoplastes de *Nicotiana tabacum* BY-2 sont transformés transitoirement par bombardement (biolistique) avec les plasmides pB7WGF2 35S:GFP-SIM et pB7WGF2 35S:GFP-SIMC12 (tableau II.2) fixés sur des micro-billes d'or. Cette fixation s'effectue en mettant en présence 5 µg de plasmide avec 25 µl de billes d'or en suspension dans une solution de glycérol 50%, 25 µl de CaCl₂ 2,5 M, 10 µl de spermidine 0,1M, puis lavage à l'éthanol 70% et mise en suspension dans 40 µl d'éthanol 100%. 6 µl de cette suspension sont déposés sur un disque de rupture à 1100 psi et l'ensemble est placé dans la chambre d'un canon à particule Particle Delivery System (Biolistic PDS-1000/He) puis projeté sur un tapis de BY-2 sous pression de l'hélium.

II-1-3 Traitements au cycloheximide et au MG132

Des plants de *N. benthamiana* co-exprimant la protéine d'intérêt et le gène p19 ainsi qu'une lignée transformée d'*A. thaliana* sont infiltrés avec une solution de MG132 (100 µM, Euromedex), dit échantillons « MG132 », ou avec de l'eau stérile en tant que contrôle négatif, dit échantillons « eau ». Dans les deux cas, des disques de 5 mm de diamètre sont découpés à l'emporte-pièce. 15 disques issus d'au moins 2 feuilles de 3 plantes infiltrées sont nécessaires à chaque point individuel de mesure pour permettre une homogénéisation des niveaux d'expression des protéines selon les feuilles. Ces disques sont placés dans une solution de MG132 ou dans de l'eau pendant 1h30 pour une

efficacité optimale de l'inhibiteur, en effet le MG132 commence à être efficace à partir de 1 h après infiltration. Puis, on ajoute une solution de cycloheximide (CHX, 100 μ M Sigma-Aldrich) dans tous les échantillons « MG132 » et dans la moitié des échantillons « eau » ; on considère ce moment comme le temps zéro. On infiltre les échantillons à l'aide d'une pompe à vide pendant 10 min. Les échantillons sont prélevés à des temps d'incubation successifs allant de 0 à 3 h et plongés dans l'azote liquide. La quantité relative de la protéine d'intérêt selon les différents traitements (eau, CHX, MG132+CHX) et aux différents temps est mesurée par Western-blot sur les extraits de protéines totales.

II-1-4 Expérimentations de stress hydrique sur plantes d'*Arabidopsis thaliana*

II-1-4 -1 Stress hydrique sévère en sol

II-1-4 -1-1 Conditions « serres IBMP »

Pour reproduire expérimentalement des conditions de sécheresse sur la plante sauvage, les graines sauvages et les mutants sont semées dans les conditions de culture de l'IBMP avec un arrosage quotidien. Après 2 semaines de culture, les plantules sont transférées dans un bac de culture collectif, puis placées en serre où la photopériode est de 16h de jour et 8h de nuit (20°C/16°C) avec un arrosage quotidien pendant 3 semaines. Les plantes, âgées de 5 semaines, restent en conditions normales de culture (lumière et températures) mais cessent d'être arrosées, ce qui correspond au jour zéro de l'expérience.

II-1-4 1-2 Conditions « serres PSB-VIB »

Les graines sont semées individuellement sur des pastilles de terreau Jiffy réhydratées de façon égale et contenues dans des plateaux Jiffy , puis les graines sont placées en serre où la photopériode est de 16 h de jour et 8 h de nuit (20°C/16°C). Une à deux semaines après germination les plantules excédentaires sont éliminées afin d'obtenir une plante par pastille. Deux semaines après germination les plantules viables excédentaires sont éliminées afin d'obtenir une plante par pastille. Les plantes, âgées de 3 semaines, restent en conditions normales de culture mais cessent d'être arrosées ce qui correspond au jour zéro de l'expérience.

II-1-4 -1-3 Conditions en chambre de culture « SANYO »

Le même type d'expérience est conduit dans une armoire de culture SANYO. Les graines sont semées à raison de quatre par pastille de terreau Jiffy préalablement réhydratée avec 50 ml d'eau. Les pastilles sont contenues dans des plateaux Jiffy adéquats. Les graines subissent une stratification de 2 jours à 4°C. Les plateaux sont placés en armoire de culture où la photopériode est de 16 h de jour et 8 h de nuit (21°C/18°C) avec 65% d'humidité. Les plateaux sont tournés à 180° et décalés d'un étage dans l'armoire quotidiennement. Les plantules germant précocement ou tardivement par rapport à la moyenne des graines sont éliminées. Deux semaines après germination les plantules viables excédentaires sont éliminées afin d'obtenir une plante par pastille. Les plantes reçoivent un arrosage quotidien identique dont la quantité augmente de 2 à 5 ml au fur et à mesure de leur croissance afin de maintenir le terreau humide. Les plantes, âgées de 3 semaines, restent en conditions normales mais cessent d'être arrosées à partir du jour zéro de l'expérience. Les plantes sont photographiées quotidiennement pendant la durée de l'expérience.

II-1-4 -2 Stress hydrique modéré en sol dans le WIWAM

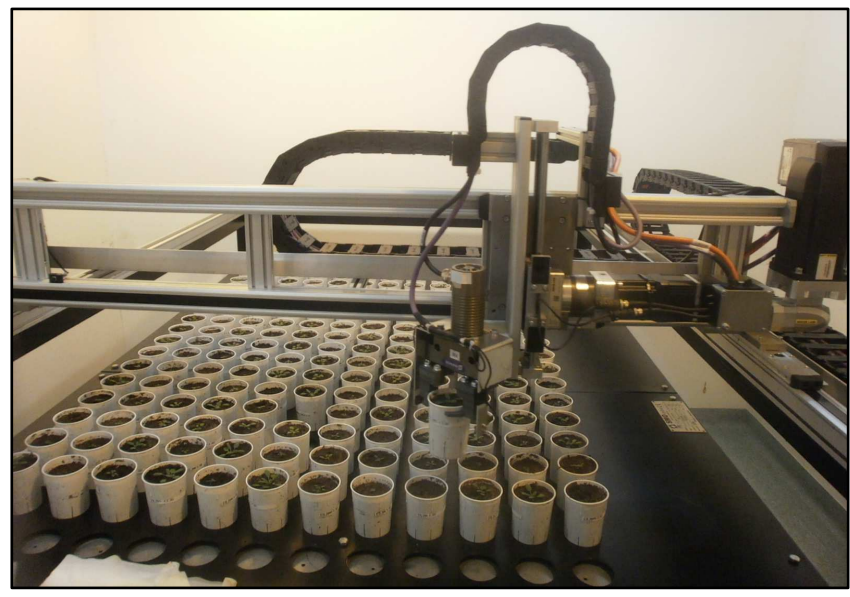
Le WIWAM (Weighing Imaging and Watering Machine) a été conçu par l'équipe du Pr. Dirk Inzé (PSB-VIB, Gand, Belgique) en collaboration avec la société SMO (Eeklo, Belgique) et la supervision des expérimentations est gérée par Pieter Clauw (Skirycz *et al.*, 2011a). Cette plateforme automatique d'arrosage, visible en figure II.1, est capable de photographier et de contrôler l'arrosage de 216 plantes *Arabidopsis* quotidiennement. Lors d'un roulement, chaque pot est prélevé de sa position initiale par un bras robotique, placé sous une caméra et photographié, pesé et complété du volume d'eau correspondant au poids manquant, puis retourne à sa position initiale. Les pots sont identifiés par leurs coordonnées de position dans la plateforme selon une grille de 12x18 pots. Le fichier informatique de départ est renseigné des génotypes et des conditions de traitement de chaque emplacement. L'aire des rosettes en cm² est calculée chaque jour à partir des photographies en s'appuyant sur le contraste de couleur entre la plante et le sol. A la fin, le fichier contient les informations sur l'aire et le périmètre des rosettes, le poids avant et après pesée. Ces données sont utilisées pour calculer le taux de croissance relative et la quantité d'eau ajoutée.

Les graines sont semées sur du terreau en pot et subissent une stratification pendant

22SU4 SCALWIKMS 3A76A7A I NM62s 2A77I A72A77- I 23NB I A7777S 6NS C27777 à 2 7777 SC77N
 è 22SC2A7777 S NLk. ü? 772A7M7I N2A7I 2C7 2I N2NM- SAA7I NM7I 22I N2B E24 SCAT7G277SI 2
 2- I N2I S77I 777S 777I A777A- 6777I . ; '77S 3A77A7M7I N2A7A- I NM62s 2A77I A777M7N7- C7 7 7777
 7 - 3S 77777A7M7I N2A77- I N2I S777I gN2777CC- As 77777779- I 7 77 73 N2I 302 è; 77777- I N2I S77I 2
 77S 777I A7677A- 67M7- I NC- 6777q777N27S N2777 - 3S 7777AA7777I gN2777CC- As 7777AES kI77777ES 77777
 2- I N2I S77I 777S 777S N277LWZ; 777N2AA777q7777ES 37M7I 77I 7 77 24 SCAT777A7M- N2A7- I NM7C- CsA7
 ASC276A777E N2A7M- SC77777s 6 C27767777AAe 72 77 7I N277I 3 76A77M- N277I 77- I 23NB I A7777A I N2
 7 73 N2I SALES I 7NS U7777WZ; 777S 7 323S' 7777777- CC7AM- I 7777S I 7AN2AA2X2CES 777 - 2sCs' 2
 2 7I A7SI 77M- MS 67NB I 7A7SG7I 7777777M7I N2A7AN27AAs 7A776777N2S U7777777C- 3AA7I 7777737 3 S77
 1C27S 2667 2I N277N27A7M7C7 3eC2A773 sC7I 77A7 7A7CG7776A777M7C73AA7I N2G2CA7M 2 77M7CeA777
 2s 2S N27S 777AAe 72 77 7I N27S 7A- 677 77773 77S N273N7 7I N2I 77 7AS C7777 7I N2AS C7777C- 3AA7I 7777
 M2C277M- C777S U77M7I N2A77I 77- I 23NB I 77777N2- I 77- 7 M2C27777N27Cs 2S 2NB I 777777C- 3AA7I 7777
 7I N2776A773 sC7I N277S I - N2M7A7

2

77777777777777 777777 777 77 77 777777777777



2

2

2

2

2

II-2 Techniques relatives aux analyses ADN

II-2-1 Purification d'ADN

Un échantillon de plante d'environ 50 mg est prélevé dans un tube Sarstedt à bouchon à visse et broyé à l'aide de billes de verre dans le broyeur PreCellys® (ENIM). On ajoute 300 µl de tampon (Tri-HCl pH7,5 0,2 M, NaCl 250mM, EDTA 25mM, SDS 0,5%) puis on centrifuge 5 min à 1200 g pour récupérer le surnageant auquel on ajoute 300 µl d'isopropanol. Le mélange incube 5 min à température ambiante puis est centrifugé 10 min à 12000 g. Le culot est mis en solution dans 50 µl de Tris-HCl (10mM pH 8,5) et conservé à -20°C.

II-2-2 Purification des produits de PCR

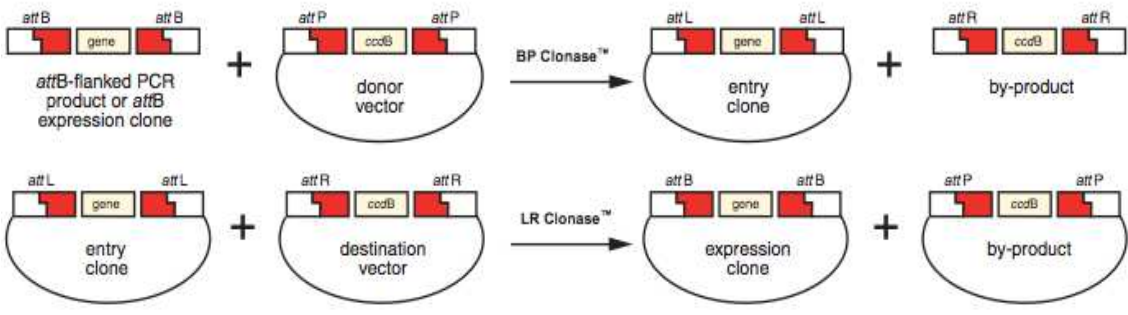
Les produits de PCR visant à être clonés sont extraits en bande après électrophorèse en gel d'agarose puis purifiés à l'aide du kit QIAEX II (Gel Extraction Kit, Qiagen) suivant les instructions du fabricant.

II-2-3 Techniques de clonage « Gateway » (Invitrogen)

La recombinaison en site spécifique du bactériophage lambda permet l'intégration du génome viral dans le chromosome d'*E. coli*. La recombinaison a lieu entre les sites spécifiques d'attachement attB sur le chromosome bactérien et attP sur le chromosome lambda ce qui donne les sites attL et attR (Karimi *et al.*, 2002).

La technique de clonage « Gateway » est basée sur le système de la recombinaison du phage lambda pour transférer une séquence d'ADN hétérologue flanquée des sites att modifiés au sein de plasmides. La séquence d'intérêt est obtenue par PCR (Polymerase Chain Reaction) entre des amorces spécifiques du début et de la fin de la séquence prolongées de la séquence des sites attB modifiés. 2 réactions de recombinaison ont lieu successivement (figure II.2, Gateway® Invitrogen). La réaction BP permet la recombinaison du produit de PCR flanqué des sites attB avec un vecteur donneur (ou donor vector) contenant des sites attP. Ceci forme un vecteur d'entrée (ou entry clone) contenant les sites attL. La réaction LR permet la recombinaison entre les sites attL du vecteur d'entrée et les sites attR du vecteur d'expression, dit vecteur de destination (ou destination vector). Dans certains cas, une réaction LR de triples recombinaisons

AMs ?B 3ES ?A??MS ?g NO?S NBSA ?M S C?H As C?C?? ?I A?SI ?G??NES C????AN? ?NB I ?k ?As ES ?I ??A?
 I - I ?? I ?N I S ?AKSI ?MC- 7 - NES C??N?A I ?Iei ?KBAAS A?? ?I A????A????k ?G??NES CA??K?I N?s ??
 ?- 7 M CNEI N??AAN?A??N??s s C?I N? ?
 ???C? ?NB I ???? ?N?? ?MCsA? ????MC- ?S3N??????G?I ESs ???A?N?A??N??MS C3 ?WZ ?L? ZZ?
 7 - 6??G??G??G??NES C??- I I ?S C?V. wZ ?I 1q??N???? ?G I ?A? ??? ???M? G3C- 1?I q??I ?AS 3G?I N?A?
 ? ANCS ?NB I A??S ???C3??I N???? s G?I 1?? ?S ???N S N?? ?I S ?NL& wü?KMS 3A? Z ? ?I ?L?i ü?? ?I ?
 MCsA? ??? ?I S I ? ?C- 6NO?? ?MC- N? ?I ?A?? ? ? ?I ?AN MM?C?? ?C?S ?NB I ' ?
 ???C? ?NB I ???? ?N?? ?MCsA? ???G??NES C??K?I N?S ?V. wZ ?I 1q??G??NES C????AN? ?NB I ?
 V. wZ ?I 1q??N? ??? ?G I ?A? ??? ???M? G3C- 1?I q??I ?AS 3G?I N?A? ?I ANCS ?NB I A??S ???C3??I N????
 7 s G?I 1?? ?S ???N S N?? ?I S ?NL& wü?KMS 3A? Z ? ?I ?L?i ü?? ?I ?MCsA? ??? ?I S I ? ?C- 6NO?? ?
 MC- N? ?I ?A?? ? ? ?I ?AN MM?C?? ?C?S ?NB I ' ?
 ???C? ?NB I ??? ?M?C?N?S V?? ?- 7 ? ?BA- I ? ?N?? ?MCsA? ???A??G??NES CA??K?I N?S ?V wZ ?I 1?
 ? ? ?SI q??C??NES C????AN? ?NB I ?V. ZZ ?I 1q??N???? ?G I ?A? ??? ???MS A? ?I G3C- 1?I q??I ?
 AS 3G?I N?A? ?I ANCS ?NB I A??S ???C3??I N???? s G?I 1?? ?S ???N S N?? ?I S ?NL& wü?KMS 3A? Z ? ?I
 ?L?i ü?? ?I ?MCsA? ??? ?I S I ? ?C- 6NO?? ?MC- N? ?I ?A?? ? ? ?I ?AN MM?C?? ?C?S ?NB I ' ?
 ?
 ?



BP Clonase™ and LR Clonase™ reactions. BP Clonase™ is used to create entry clones, and LR Clonase™ is used to create expression clones.

?

?

La?é?ée ????é?na?? - ????c?N? - ?

?

?

?

II-3-1 Préparation de bactéries compétentes

Tout d'abord, la souche bactérienne, *E. coli* ou *A. tumefaciens*, est inoculée dans 5ml de milieu LB et cultivée 16 h à 37°C. Cette pré-culture est transférée dans 250 ml de milieu LB contenu dans un erlenmeyer de 1 l. La croissance des cellules se déroule à 37°C sous forte agitation, jusqu'à une DO de 0,7 (600 nm) qui correspond à des cellules en fin de phase exponentielle de croissance. Les étapes qui suivent sont effectuées au froid avec du matériel stérile.

La culture obtenue est centrifugée pendant 15 min à 5000 g, lavée une fois avec une solution de CaCl₂ 0,1 M, reprise ensuite dans 50 ml de cette même solution et incubée toute une nuit à 4°C. Puis, la culture est centrifugée et resuspendue dans 3 ml de tampon CaCl₂ 50mM contenant 15% de glycérol. Cette solution bactérienne est aliquotée dans des tubes individuels, congelée dans de l'azote liquide et stockée à -80°C. Chaque aliquot de 50µl est utilisé pour une transformation. Les bactéries *E. coli* de souche TOP10 ainsi préparées peuvent être transformées par choc thermique.

Les bactéries électrocompétentes sont obtenues à partir de bactéries cultivées jusqu'en phase exponentielle de croissance (0,6<DO<0,8) puis lavées plusieurs fois à l'eau bidistillée stérile froide (4°C), resuspendues dans du glycérol à 10% et congelées dans l'azote liquide sous forme d'aliquot de 50µl.

II-3-2 Transformation des bactéries par choc thermique et électroporation

Cette technique a été utilisée pour toutes les transformations bactériennes réalisées au cours de cette étude. Le vecteur d'intérêt purifié (100ng) est ajouté aux 50µl de bactéries compétentes. Le mélange est incubé 30 min dans la glace puis placé à 42°C pendant 45 s avant d'être ré-incubé 2 min dans la glace.

Les bactéries électrocompétentes sont transformées par électroporation (2,5 kV ; 25µF ; « Gene Pulser » de BioRad). La résistance de l'appareil est réglée sur 200 Ω pour *E. coli* et 400 Ω pour *A. tumefaciens*.

Après transformation, les bactéries sont placées 30 min à 37°C dans 300µl de milieu LB puis étalées sur un milieu contenant l'antibiotique qui permet la sélection des bactéries renfermant le plasmide d'intérêt.

II-3-3 Analyse des clones bactériens

Quelques colonies de bactéries issues de la transformation sont mises en culture dans 3 ml de milieu LB en présence de l'antibiotique de sélection. L'ADN plasmidique est isolé de chacune des cultures par la technique de lyse alcaline grâce au kit de purification des plasmides de Macherey Nagel, en suivant les instructions du fabricant. Les séquences des clones obtenus sont vérifiées par séquençage avec les amorces :

B1 (5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT-3'),

B2 (5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT-3'),

B4 (5'-GGGGACAACCTTTGTATAGAAAAGTTG-3'),

B1r (5'-GGGACTGCTTTTTTGTACAAACTTG-3').

II-4 Techniques relatives aux analyses ARN

II-4-1 Extraction des ARN totaux de plante

Environ 200 mg de plante sont introduits dans un tube Sarstedt à bouchon à visse puis congelés dans l'azote liquide et broyés en fine poudre à l'aide de billes de verre dans le broyeur PreCellys® (ENIM). Les ARN totaux sont extraits à l'aide de la solution « TRIzol® Reagent » (Invitrogen) en suivant les indications du fabricant. Ce réactif, une solution monophasique de phénol et des agents chaotropiques (l'isothiocyanate de guanidine et le thiocyanate d'ammonium), maintient l'intégrité des ARN et permet leur extraction par dénaturation des composants cellulaires. L'addition de chloroforme suivie d'une étape de centrifugation sépare la solution en une phase aqueuse et une phase organique. Les ARN se trouvent exclusivement dans la phase aqueuse. Après précipitation à l'isopropanol, le culot est lavé à l'éthanol 70% puis dissout dans 30 µl d'eau bidistillée stérile. La concentration en ARN est évaluée par mesure de l'absorbance à 260 nm (1 unité de DO équivaut à 40 µg/ml d'ARN).

II-4-2 Retro-transcription de l'ARN et PCR quantitative

1 à 3 µg d'ARN totaux sont traités à la DNase puis rétrotranscrits en utilisant le kit SuperscriptIII (Invitrogen) selon les recommandations du fabricant. La réaction de PCR

qui suit utilise des amorces de gènes spécifiques (1mM) dans un volume réactionnel total de 10µl de « SYBR Green Master mix » (Roche). La réaction s'effectue dans l'appareil « Lightcycler LC480 » (Roche) toujours selon les instructions du fabricant. La valeur moyenne de trois répliquas est normalisée par rapport aux gènes EXPRESSED (AT4G26410) et TIP4-1LIKE (AT4G34270) servant de contrôles internes.

Les couples d'amorces utilisées en PCR quantitatives sont indiqués dans le tableau II.3.

Tableau II.3. Couples d'amorces utilisées en PCR quantitatives

Amorces de q-PCR	Fwd	Rev
DREB2A-F1	GGATTGTAGAAACCTGTCTAGCA	GGTACCGGTCTCTGATTTAAGC
RD29A-F1	GTTACTGATCCCACCAAAGAAGA	GGAGACTCATCAGTCACTTCCA
COR47-F2	AAGAAGGTGAGGAAAAGAAGGAGAA	CGGGATGGTAGTGAAACTGG
SIM	CACAAGATTCTCCACCACAG	CAGAGGAGAAGAACCGCTCGAT
SMR1	CACCCACATCCCAAGAACACAAG	GACGGAGGAGAAGAAACGGTCAA
SMR2	AGAGCAGAAACCCAGAAGCCAAG	GAAATCTCACGCGGTCTTTCTT
SMR3	CGATCACAAGATTCCGGAGGTG	CGGCTCAGATCAATCGGTATGC
SMR4	CGAGAAGCACGATGTATAGGATT	TCACCACCATCAACTTCTTCC
SMR5	CGTGATGATTGCCGGATACC	AAAATATCCCTTCTTCGGTGGTTC
SMR6	GGGCTTCGTTGAAACCAGTCAAG	TTTCTCGGTGCTGGTGGACATTC
SMR7	GCCAAAACATCGATTCCGGGCTTC	TCGCCGTGGGAGTGATACAAAT
SMR8	TAACCTATCTCCCGCGTCACA	GCACTTCAACGACGGTTTACGC
SMR9	GCCACTTCAAGAACCCATCTCC	TCCGGAGTACAACATCCACTCTCT
SMR10	GCAAAGAAGGAGCAACCGTCAAG	CGGTGGACAAATTCTTGGCATCG
SMR11	CTGCTTCGATCTCGGATTGTGTT	GACGAAGGAGGCGGTGTTTTAC
SMR12	GGTATGTCCGAGACGAGCTTGA	GAGTCGGTGTCTTGAACCCATCA
SMR13	GAACCACCAACACCGACAACAAG	GTTCGAGTTTCTCGGCGTCTCT
KRP1	CGGTGATAATGGAGTTTCGTC	TCCCGCTACAACAACAATCTAA
KRP2	GGTGAAACGAAGGAAGATGG	ACAACACGAAACCGACGAA
KRP3	GTGAAATGGAGGAGTTCTTTGC	GCTGAGGGGGATATCATTCA
KRP4	CCCTAGGAGTAATTTGGATTCTG	CACTTTCAGAAACAGAATCAGACC
KRP5	AAAGTGAGATTGAAGACTTCTTTGC	TTGTCCGAGACAATGTCAAAGT
KRP6	GAAACCGAAACCGAAACCTC	CCCTCACTCACTGGACTCGT
KRP7	GCAGGCAGAGCTTGATGACT	TCATTGACGATGTCGTAGTTGTACT
FBL17	CTCGGGATGATCTGCGATGTC	GACTTGGATTCTCTACAAAGGTCTG
EXPRESSED	GAGCTGAAGTGGCTTCAATGAC	GGTCCGACATACCCATGATCC
TIP4-1LIKE	GTGAAAACCTGTTGGAGAGAAGCAA	TCAACTGGATACCCCTTTCGCA

II-5 Techniques d'analyses protéiques

II-5-1 Extraction de protéines totales de plantes

Les échantillons de plantes dans des tubes en polypropylène de type « Safe Lock » (Eppendorf) contenant des billes de verre (diamètre 1 mm) sont réduits en poudre dans

un broyeur Silamat S5 (Ivoclar, Vivadent) après leur congélation dans l'azote liquide. La poudre est resuspendue dans 1 ml de tampon d'extraction dénaturant (Tris (pH6,8) 62mM ; Urée 4M ; SDS 3% (p/v) ; glycérol 10% (p/v) ; bleu de bromophénol 0,1% ; DTT 100mM). Après une étape de dénaturation de 5 min à 95°C, on centrifuge les échantillons 15 min à 15000 rpm à température ambiante ce qui permet la sédimentation des débris cellulaires. Le surnageant contenant les protéines solubles est congelé et conservé à -20°C. Les échantillons sont incubés à 56°C avant utilisation.

II-5-2 Quantification de protéines totales à l'Amidoblack

Cette méthode de dosage est basée sur la précipitation des protéines dans le méthanol en milieu acide et leur coloration à l'Amidoblack. Une aliquote de 10 µl d'extrait protéique est diluée avec 190 µl d'eau stérile et mélangée avec 1ml d'une solution titrée d'Amidoblack (acide acétique 10%(v/v) ; méthanol 90%(v/v) ; Amidoblack 10B (Serra12310) 0,05%(p/v)) (Popov, 1975). Le mélange est centrifugé (15 min, 1400 rpm, RT) pour retirer le surnageant. On ajoute 1 ml de solution de lavage (acide acétique 10% (v/v) ; éthanol 90% (v/v)), on centrifuge et on retire le surnageant. On laisse sécher le culot 10 min puis on met en solution dans 1ml de NaOH (0,2 mM). Une aliquote de 200 µl est placée dans une plaque et quantifiée à l'aide d'un spectrophotomètre. L'absorbance est déterminée à 595nm. La concentration est calculée à partir de la gamme étalon établie avec de la BSA (« Albumine de Sérum Bovin »).

II-5-3 Western-blot

On réalise une électrophorèse de type PAGE-SDS. Le gel est préparé avec le système Mini-Protean III (BioRad). Le gel de résolution est préparé avec une concentration de 12% d'acrylamide permettant une séparation optimale des protéines d'intérêt (H₂O 4ml, solution d'acrylamide à 30% 3,3ml, Tris pH 8,8 1,5M 2,5ml, SDS 10% 0,1ml, ammonium persulfate 10% 0,1ml, TEMED 0,004ml). Le gel de concentration est coulé au-dessus (H₂O 2,7ml, solution d'acrylamide à 30% 0,67ml, Tris pH6,8 1M 0,5ml, SDS 10% 0,1ml, ammonium persulfate 10% 0,1ml, TEMED 0,004ml). Après dépôt des échantillons, l'électrophorèse se fait à 150V dans un tampon Tris-Glycine jusqu'à obtenir la séparation désirée (Tris-base 25mM, glycine 250mM, SDS 0,1%). Après la migration, le

gel est lavé 3 min dans le tampon de transfert (Tris-base 25mM, Glycine 192 mM, éthanol technique 15% v/v) puis placé en contact d'une membrane en PVDF (« PolyFluorure De Vinylidène ») Immobilon-P (Millipore) dans un système d'électrotransfert (« Mini Trans Blot Cell » de BioRad). Un courant de 280 mA est appliqué durant 2 h afin de transférer les protéines du gel sur la membrane. La membrane est rincée 5 min dans du T-TBS 1X (Tris-HCl pH 7,4 20mM, NaCl 150mM, Triton X-100 0,1% v/v) puis mise à saturation dans le tampon lait (Tris-HCl pH7,4 20mM, NaCl 150mM, Triton X-100 0,1% v/v, lait en poudre écrémé 5% p/v) 1 h à température ambiante. Elle est ensuite transférée dans du tampon lait contenant les anticorps primaires et mise à incuber 2 h à température ambiante (ou 16 h à 4°C). La membrane est lavée 3 fois 10 min dans du TBS-T 1x puis mise en présence des anticorps secondaires pendant 1 h. La membrane est lavée 3 fois 10 min dans du T-TBS. La révélation est effectuée par chémiluminescence avec l'ECL Luminata Forte® (Millipore, Western HRP substrate). La membrane est ensuite incubée 2 minutes dans une solution de bleu de Coomassie, un colorant des protéines, puis rincées à l'eau.

L'anticorps anti-GFP-HRP dilué au 1/5000^{ème} (anti-Green Fluorescent Protein-Horseradish Peroxidase, Miltenyi Biotec) est un anticorps monoclonal purifié conjugué à une peroxydase, ce qui permet d'éliminer l'étape de détection avec un anticorps secondaire lors d'un Western-blot. Il détecte la GFP sauvage et ses versions mutées telles que la EGFP.

L'anticorps anti-GFP A-11122 dilué au 1/10000^{ème} (Molecular Probes) est un anticorps polyclonal purifié par chromatographie à échange d'ions.

II-5-4 Coloration GUS

Les tissus végétaux sont prélevés et placés dans une solution d'acétone 80% pour la fixation des tissus. Après 2 h d'incubation à -20°C, les échantillons sont lavés 3 fois avec du tampon phosphate 50 mM pH7,0. Les échantillons incubent ensuite dans la solution de coloration (tampon phosphate 50 mM, EDTA 5mM, Triton X-100 0,05%, K₄Fe(CN)₆ 0,5 mM, K₃Fe(CN)₆ 0,5 mM, X-Gluc 0,5 mg/ml) à 37°C pendant 16h. Elle est arrêtée par deux rinçages dans du tampon phosphate 50 mM puis les tissus sont décolorés dans des bains successifs d'éthanol de 50, 70 et 96% (v/v) de plusieurs heures chacun. L'éthanol

est ensuite remplacé par de l'acide lactique dans le but d'éclaircir les tissus sans perdre la coloration GUS et d'améliorer la conservation des échantillons.

II-6 Techniques de microscopie et de mesure cellulaire

II-6-1 Microscopie

Les images de microscopie confocale à fluorescence ont été réalisées sur un microscope inversé laser LSM700 (Zeiss). La longueur d'onde utilisée pour l'excitation de la GFP est de 488nm. Les observations en microscopie à épifluorescence ont été réalisées sur un microscope SMZ 1500 (Nikon). Les images de macroscopie ont été réalisées sur un microscope Z16 APOA (Leica).

II-6-2 Surface foliaire sur « série de feuilles »

Au dernier jour (jour 21) de l'expérimentation dans le WIWAM (cf paragraphe 1.7.2), on récupère chaque plante et on réalise une « série de feuilles » : toutes les feuilles d'une rosette sont prélevées et alignées dans l'ordre de leur numérotation, c'est à dire de la première feuille qui émerge après les cotylédons à la dernière feuille de la rosette. Les feuilles sont déposées à plat sur de la gélose, les feuilles incurvées sont incisées afin de les aplanir pour permettre une mesure précise de leur aire. Une photographie de chaque série de feuille est prise, traitée sur Photoshop pour créer un contraste blanc/noir et éliminer le bruit de fond. L'analyse de ces images sur Image-J (www.imagej.nih.gov/ij/, Rasband *et al.*, 1997-2012) permet de mesurer l'aire des feuilles et des rosettes.

II-6-3 Comptage cellulaire

La feuille numéro 3 de plantes d'*Arabidopsis* issues des expérimentations utilisant le WIWAM est prélevée à la suite des photographies de série de feuilles. Les feuilles sont placées dans l'éthanol 70% pour décoloration. Après plusieurs jours, les feuilles sont fixées sur des lames avec de l'acide lactique et observées au microscope binoculaire relié à un tube de superposition oculaire. On dessine le contour d'au moins 100 cellules

épidermales abaxiales localisées à 25 et 75 % de la distance entre la base et la pointe de chaque feuille et à mi-chemin de la nervure centrale et du bord de la feuille. Les paramètres suivants sont déterminés : le nombre de cellules pavementaires, le nombre de cellules de garde, l'aire moyenne de ces cellules (moyenne entre les valeurs en position basale et apicale) avec le logiciel ImageJ (www.imagej.nih.gov/ij/, Rasband *et al.*, 1997-2012). On en déduit le nombre de cellules par feuille en divisant l'aire moyenne des feuilles par l'aire moyenne des cellules. Enfin, la densité stomatale est obtenue en divisant le nombre de stomates par la surface foliaire considérée en mm² et l'index stomatal est le résultat du nombre de stomates divisé par le nombre de cellules totales.

II-6-4 Mesure de la ploïdie par cytométrie de flux

Pour mesurer le niveau d'endoréplication, pour chaque génotype 6 feuilles numéro 3 issues des expérimentations utilisant le WIWAM sont prélevées et broyées ensemble au moyen d'une lame de rasoir dans 200 µL de tampon de lyse (Partec) par point de mesure. On ajoute 800 µL de tampon de coloration (CystainUV, Partec) à base de DAPI. Les cellules libres sont séparées des débris végétaux par filtration sur filtre de maille 30 µm (CellTrics, Partec). La fluorescence émise par le DAPI est quantifiée avec un cytomètre de flux (Partec) de cellules tri activé par fluorescence (FACS) sur 20000 noyaux par point de mesure. La valeur d'excitation correspondant au contenu en ADN des cellules est transcrite en valeur de ploïdie avec le logiciel "Flomax". Les valeurs sont ensuite interprétées et présentées sur Microsoft Excel.

II-7 Techniques de bioinformatique et de statistique

II-7-1 Alignement de séquences protéiques

L'alignement multiple des séquences protéiques est réalisée sur « MUSCLE v3.6 » (www.ebi.ac.uk/Tools/muscle/index.html, Edgar *et al.*, 2004), et Jalview (Java Web Start, www.jalview.org) à partir des fichiers de séquences obtenues sur TAIR (www.arabidopsis.org) et enregistrées au format Fasta.

II-7-2 Analyse phylogénétique

L'analyse phylogénétique a été réalisée avec le logiciel « PhyML 3.0 » du site www.phylogeny.fr (Guindon *et al.*, 2010) en utilisant la méthode de maximum de vraisemblance (ou « Maximum Likelihood ») sur la base de l'alignement multiple des séquences protéiques effectué à partir du logiciel « MUSCLE » (Edgar *et al.*, 2004) et affiné avec « Gblocks » (Castresana *et al.*, 2000). La phylogénie a été corrigée par une analyse statistique de type SH-Like (Shimodaira et Hasegawa), et la visualisation de l'arbre a été obtenue avec « TreeDyn » (Chevenet *et al.*, 2006). La conversion des fichiers en format Fasta a été faite avec l'outil en ligne « sequence conversion » (www.sequenceconversion.bugaco.com). L'arbre est assorti d'une échelle de distance. La longueur des branches est proportionnelle à la distance évolutive entre les séquences et leurs ancêtres. Les valeurs dites de « bootstrap » sur les branches, indiquent la robustesse de la jonction calculée selon la méthode "Approximate Likelihood-Ratio Test", elles sont comprises entre 0 et 1.

II-7-3 Prédiction de séquence d'adressage

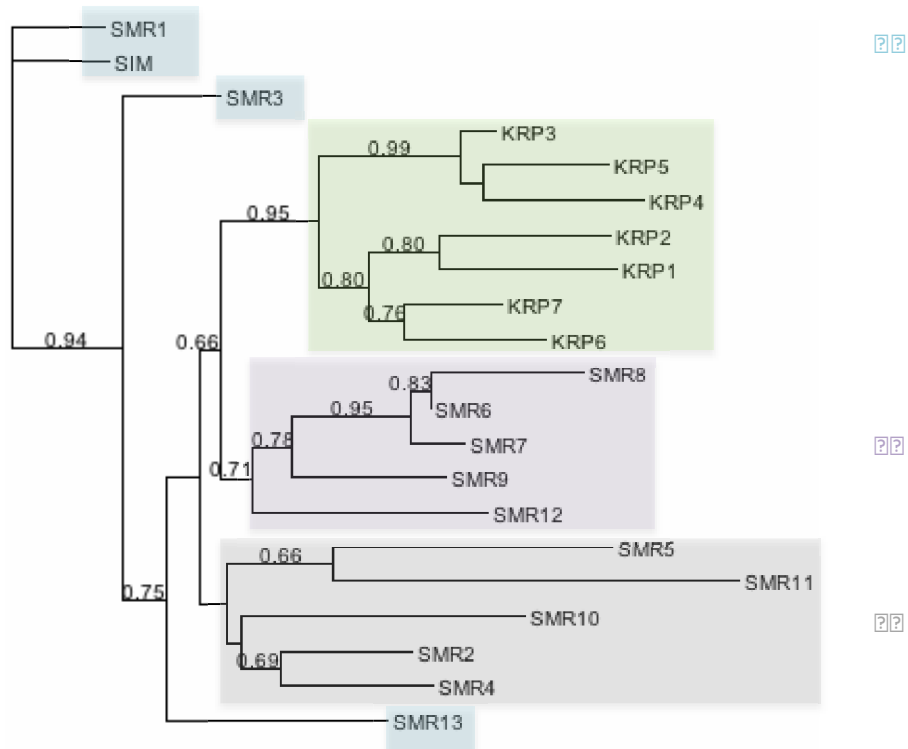
La prédiction des motifs d'adressage des séquences protéiques est réalisée avec les logiciels en ligne « pSORT » (www.psort.hgc.jp/form.html) et « predict NLS » (www.cubic.bioc.columbia.edu/predictNLS).

II-7-4 Analyse statistique

Les tests statistiques d'analyse de la variance à 2 facteurs de type « two-ways ANOVA » (ANALYSIS OF VARIANCE) ont été réalisés avec le logiciel R 2.15.0 (www.R-project.org). Ce même logiciel a servi à concevoir les graphiques de type 'boîtes à moustache'. Les différentes valeurs statistiques de moyenne, d'écart type ($ET = \sqrt{(\sum (x - \bar{x})^2/n)}$ où x est la variable et n la taille de l'échantillon), d'erreur standard ($SE = ET/\sqrt{n}$) et d'écart-type relatif ($ER = (1/x^2) \cdot \sqrt{(\bar{x}^2 \cdot ET^2 + \bar{x}^2 \cdot ET^2)}$) ont été calculées sur Microsoft Excel.

III - RESULTATS

?
 ?
 ?
 ?
 ?
 ?
 ?
 ?
 ?
 ?
 ?
 ?



1. Upravljanje projektima i oblikovanje organizacione strukture
 Upravljanje projektima i oblikovanje organizacione strukture su ključni elementi uspešnog poslovanja. Upravljanje projektima omogućava organizaciji da ostvari svoje strateške ciljeve kroz planirane i kontrolirane aktivnosti. Oblikovanje organizacione strukture omogućava organizaciji da efikasno iskoristi svoje resurse i ostvari svoje ciljeve. Ova dva procesa su međusobno povezana i utječu na uspjeh organizacije. Upravljanje projektima i oblikovanje organizacione strukture su ključni elementi uspešnog poslovanja. Upravljanje projektima omogućava organizaciji da ostvari svoje strateške ciljeve kroz planirane i kontrolirane aktivnosti. Oblikovanje organizacione strukture omogućava organizaciji da efikasno iskoristi svoje resurse i ostvari svoje ciljeve. Ova dva procesa su međusobno povezana i utječu na uspjeh organizacije.

?

?

?

?

I- Phylogénie et structure des protéines CKI

I-1- Analyse phylogénétique des 2 familles de protéines CKI chez *Arabidopsis*

Une analyse phylogénétique a été réalisée sur les membres des deux familles de CKI (CDK inhibitor) chez *Arabidopsis thaliana*: les KRP (KRP1 à 7) et les SIM/SMR (SIM et SMR1 à 13). Les séquences de ces 21 protéines ont servi à établir l'arbre phylogénétique présenté en figure III.1. Cette analyse a été réalisée avec le logiciel PhyML (Guindon *et al.*, 2010) en utilisant la méthode de maximum de vraisemblance et l'arbre phylogénétique a été dessiné avec TreeDyn (Chevenet *et al.*, 2006). L'arbre s'assortit d'une échelle de distance. En effet, la longueur des branches horizontales est proportionnelle à la distance évolutive, ou divergence, entre les séquences et leurs ancêtres. La robustesse de la jonction est calculée selon la méthode "Approximate Likelihood-Ratio Test". Elle est indiquée sur les branches par la valeur dite de « *bootstrap* » entre 0 et 1, plus celle-ci est élevée, plus la jonction entre les deux branches étudiées est considérée comme robuste.

Cette analyse révèle des niveaux de divergence notables au sein des CKI. Tout d'abord, les sept membres de la famille KRP constituent un clade indépendant confirmant une divergence marquée par comparaison aux membres SIM/SMR, mais suggérant une divergence intra-membres KRP relativement modérée. Au contraire, les CKI de la famille SIM/SMR présentent une divergence plus forte entre eux, ce qui résulte en la distinction de 3 clades, notés de A à C. SMR1 est la protéine la plus proche de SIM du point de vue évolutif, puis par ordre de proximité viennent SMR3 et SMR13, ces protéines constituent le clade A, sous groupe de la famille SIM/SMR. Le clade B apparaît constitué des membres SMR6, SMR7, SMR8, SMR9 et SMR12. Enfin, les SMR2, SMR4, SMR5, SMR10 et SMR11 constituent le dernier sous-groupe, le clade C, au sein duquel une forte divergence est observée entre ses membres.

Contrairement aux KRP qui se regroupent au sein d'un clade unique et indépendant, les SMR constituent une famille protéique phylogénétiquement hétérogène. Certaines

protéines ont des séquences présentant une plus grande divergence comparativement aux autres, c'est le cas, en ordre croissant de divergence, de SMR13, SMR12, SMR5 et SMR10 à égalité, puis SMR11.

I-2 Analyse comparative de la famille SIM/SMR chez *A. thaliana*

Dans un premier temps, les séquences intégrales des protéines SIM et KRP2 ont été alignées à l'aide du logiciel Jalview (figure III.2A ; www.jalview.org). Malgré une séquence de SIM plus courte que celle de la protéine KRP2, en effet les parties N- et C-terminales de KRP2 ne sont pas conservées chez SIM, les domaines conservés, dont le domaine fonctionnel d'interaction avec les complexes cyclines/CDK, apparaissent communs aux deux protéines.

Puis, les séquences protéiques des 14 SIM/SMR d'*Arabidopsis thaliana* ont été alignées (figure III.2C). L'existence des SMR6 à 13 a été publiée par l'équipe du Pr Geert De Jaeger en collaboration notamment avec l'équipe du Pr Lieven De Veylder (Van Leene *et al.*, 2010 ; Plant Systems Biology Vlaams Instituut voor Biotechnologie, Gand, Belgique). Dans le cadre de notre collaboration avec le Pr Lieven De Veylder, les locus des gènes *SMR7*, *SMR9*, *SMR10* et *SMR12* nous ont été communiqués. Ainsi, l'ensemble des séquences de ces protéines ont été incluses dans les analyses suivantes mais le détail des séquences a été masqué pour des raisons de confidentialité. En terme de longueur de séquences, la protéine SIM comporte 127 acides aminés (aa), et SMR1, 128 aa, ceci est cohérent avec leur proximité phylogénétique. Les SMR10 à 13 ont des séquences protéiques plus longues que SIM d'une vingtaine d'acides aminés. Alors que SMR4 et SMR5 ont des séquences plus courtes que SIM d'une cinquantaine d'aa. Les autres SMR sont un peu plus courtes que SIM ($100 < \text{aa} < 116$). Au niveau des caractéristiques biochimiques, les acides aminés (aa) de mêmes caractéristiques sont marqués d'une même couleur et révèle la conservation des aa entre ces séquences ; le consensus éventuel entre les séquences est alors précisés pour chaque site. En effet, des analyses antérieures basées sur l'alignement des séquences primaires des protéines CKI de plante, ont déjà permis d'identifier des domaines de conservation. Ainsi les cadres rouges situent les domaines 8P, 5P, 13P et 1P identifiés par Peres *et al.* (2007) et des cadres bleus situent les domaines 1C, 2C, 3C, 4C et 5C identifiés par Churchman *et al.*

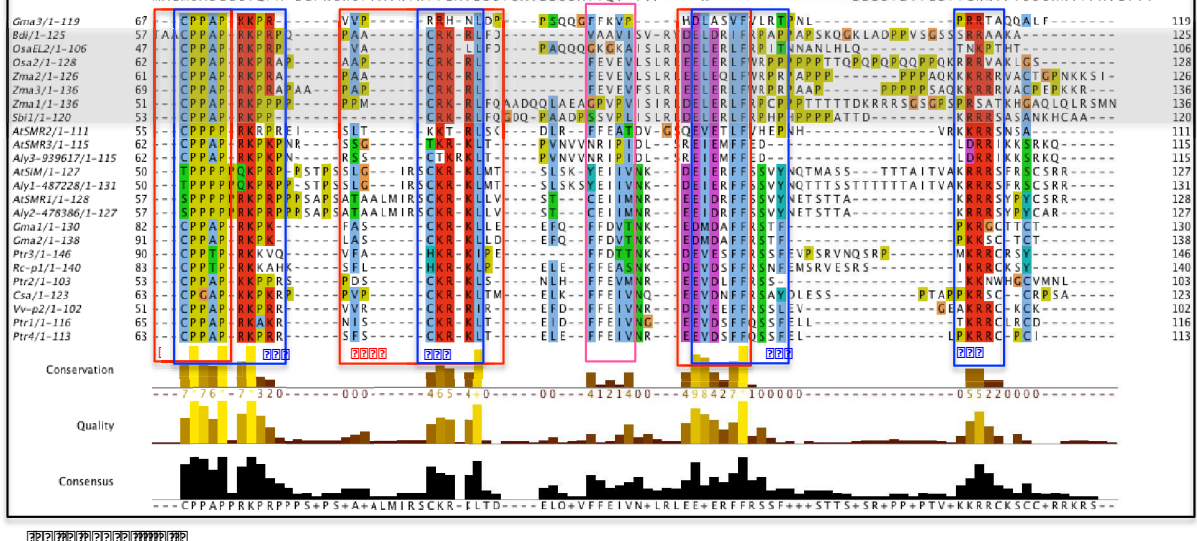
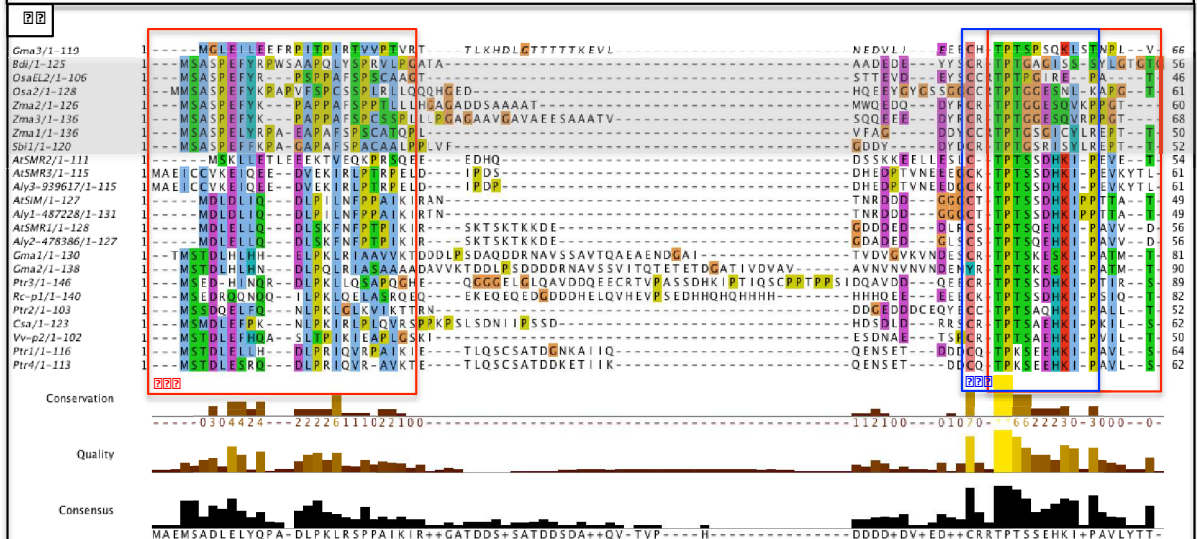
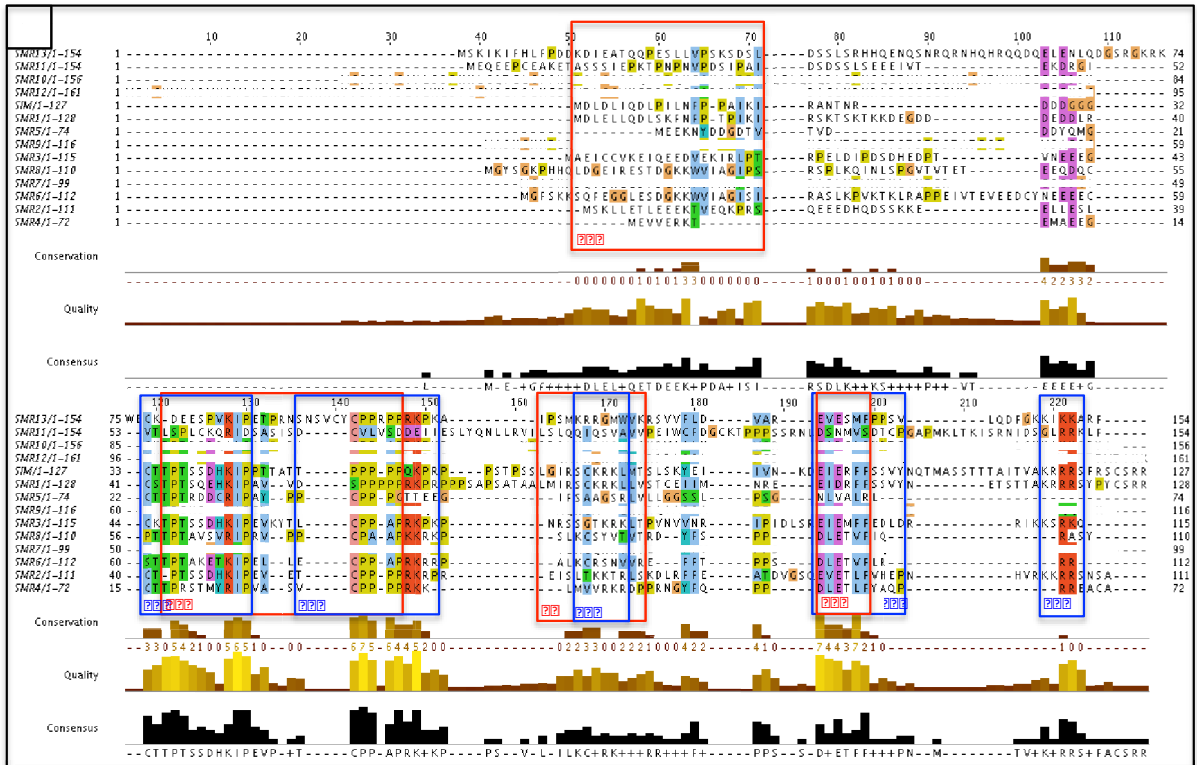
(2006) (figures III.2 C et D).

Les domaines 1P et 4C se recourent, ils correspondent au domaine [ED][ILVM][ED]X[FLV]F d'interaction aux cyclines. Les domaines 3C et 13P se recourent également, ils correspondent à d'autres domaines putatifs de liaison aux cyclines, ils s'apparentent à un motif connu de liaison aux complexes CYC/CDK présent chez d'autres protéines de régulation du cycle cellulaire comme E2F et RB (Churchman *et al.*, 2006 ; Adams *et al.*, 1996; Wohlschlegel *et al.*, 2001). Ce domaine 3C/13P putatif de liaison aux CYC/CDK pourrait être impliqué dans l'interaction de SMR5 avec CDKA;1 et dans l'interaction de SMR11 avec CYCB2;4. Les domaines 1C et 2C recourent le domaine 5P, ce motif n'a pas de fonction connue, de même que les motifs 8P et 5C.

Notons que la partie N-terminale (i.e. domaine 8P), de même que le domaine 13P sont très peu conservés entre les protéines des SIM/SMR.

I-3 Analyse comparative des domaines de liaison aux cyclines/CDK des CKI chez *Arabidopsis*

Les protéines de type CKI sont caractérisées par la présence d'un domaine de liaison aux complexes cycline/CDK. Il a été décrit précédemment que le domaine de liaison aux cyclines des protéines, KRP1 à 7, SIM et SMR1 à 5 correspond au motif consensus E[ILM][ED][EDR][FL]F (Peres *et al.*, 2007). Pour compléter ces données, les séquences du domaine de liaison aux complexes cycline/CDK des 21 protéines CKI d'*Arabidopsis thaliana* ont été alignées à l'aide du logiciel Jalview. Comme le montre l'alignement multiple en figure III.2B, le domaine d'interaction aux complexes cycline/CDK est conservé entre presque toutes les CKI. La nouvelle séquence consensus observée est [ED][ILVM][ED]X[FLV]F. Les séquences des membres SMR7, SMR13 et SMR12 divergent faiblement de cette séquence consensus, avec un ou deux acides aminés divergents sur cinq sites de conservation, et celles des membres SMR5 et SMR11 divergent plus fortement avec trois et quatre acides aminés divergents sur cinq sites. Ce résultat est cohérent avec les données de l'arbre phylogénétique où SMR5 et SMR11 divergent plus que les autres SMR du clade C, constituant à eux deux un sous-clade du clade C.



I-4 Analyse comparative des séquences homologues de At-SIM chez différentes espèces de plantes

L'orthologue de At-SIM (*Arabidopsis thaliana*) chez la plante monocotylédone *Oryza sativa* est Os-EL2. D'après Peres *et al.* (2007), EL2 et SIM ne partagent que le domaine 1P de liaison aux cyclines. D'après Churchman *et al.* (2006), SIM et ses homologues chez *Solanum lycopersicum*, *Solanum tuberosum*, *Zea mays*, *Oryza sativa*, *Populus tremula* et *Glycine max* partagent les domaines 1C à 5C.

Les séquences des protéines At-SMR1, At-SMR2 et At-SMR3, paralogues de At-SIM, de la protéine Osa2 paralogue de Os-EL2, ainsi que les séquences des protéines orthologues chez les dicotylédones *Arabidopsis lyrata* (*Aly1-487228*, *Aly2-478386* et *Aly3-939617*), *Populus trichocarpa* (*Ptr1/2/3/4*), *Cucumis sativa* (*Csa*), *Glycine max* (*Gma1/2/3*), *Vitis vinifera* (*Vv*) et *Ricinus communis* (*Rc*) ainsi que chez les monocotylédones, surlignées en gris, *Zea mays* (*Zma1/2/3*), *Brachipodium distachyon* (*Bdi*) et *Sorghum bicolor* (*Sbi1*) ont été alignées à l'aide du logiciel Jalview (figure III.2D).

Le domaine [ED][ILVM][ED]X[FLV]F d'interaction aux cyclines est très conservé à travers les différentes espèces testées. Les autres domaines précédemment décrits, 8P, 1C /2C/5P, 13P/3C et 5C, sont aussi conservés. Le domaine N-terminal 8P est le moins conservé. Un motif conservé F[FE][EX][IV][VX] entre la plupart des séquences apparaît entre les domaines 13P/3C et 1P/4C, il est encadré en rose.

Il semble que non seulement les protéines SIM/SMR sont de petites tailles, mais en plus jusqu'à cinq voire six domaines conservés sont observés entre les différentes espèces végétales testées, suggérant une forte pression de conservation sur l'ensemble de ces protéines homologues de At-SIM.

II- Etude de la régulation des CKI d'*Arabidopsis thaliana*

II-1- Etude de la régulation transcriptionnelle

II-1-1 L'expression des CKI d'après les données publiques de « microarray »

Les données d'expression des gènes d'*Arabidopsis* issues d'analyses transcriptomiques (« microarray ») sont disponibles sur le site eFP Browser (<http://bbc.botany.utoronto.ca>; Winter *et al.*, 2007 ; Figure A.1) et sont basées sur la publication «Gene expression map of *Arabidopsis* development » Schmid *et al.* (2005). Le profil d'expression spatio-temporelle dans la racine principale est basé sur les données de Brady *et al.* (2007). Le profil d'expression des gènes *SMR7*, *KRP6* ainsi que *SMR9*, uniquement dans la racine, n'est pas référencé. Ces données sont présentées, gènes par gènes, en Figure A.1 au niveau de la racine principale et au niveau de l'ensemble de la plante à différents stades de développement. L'échelle de la palette de couleur représentant l'intensité de l'expression en niveau absolu d'expression est placée en bas à gauche de la coupe racinaire pour cet organe et à droite de la coupe racinaire pour le reste de la plante aux différents stades de développement.

On constate que l'expression des CKI est plus forte dans les parties racinaires que dans les parties aériennes à l'exception de *SMR5*. Les valeurs maximales d'expression de *SMR2*, *SMR4*, *SMR5*, *SMR6*, *SMR8*, *SMR11*, *SMR12*, *SMR13*, *KRP1*, *KRP2*, *KRP3*, *KRP4*, *KRP5* et *KRP7* sont comprises entre 300 et 900 en valeur absolue d'expression. *SIM*, *SMR1*, *SMR3* et *SMR10* atteignent des valeurs maximales d'expression élevée, entre 1500 et 4000.

Dans les parties aériennes, les valeurs maximales d'expression de *SMR2*, *SMR4*, *SMR6*, *SMR8*, *SMR9*, *SMR11*, *SMR12*, *SMR13*, *KRP1*, *KRP5* et *KRP7* sont comprises entre 50 et 150 en valeur absolue d'expression, ce qui est plus faible que l'expression dans les parties racinaires. Les valeurs maximales d'expression de *SIM*, *SMR1*, *SMR3*, *SMR10*, *KRP2*, *KRP3* et *KRP4* sont comprises entre 150 et 750, ce qui est assez faible. Seul *SMR5* atteint des niveaux d'expression très supérieurs dans les parties aériennes par rapport aux parties racinaires (> 2000).

Ces données sont reprises en figure A.1 pour les gènes *SIM*, *SMR1*, *SMR2*, *SMR3*, *SMR4*, *SMR5* et *KRP2*. *SIM* est exprimé dans la racine dans la file cellulaire trichoblastique au niveau des cellules en division de la zone méristématique et dans les zones d'initiation des racines latérales. Dans les parties aériennes, *SIM* est exprimé principalement dans la graine et dans les pétales. *SMR1* est exprimé dans la racine au niveau des cellules en division de la zone méristématique ainsi que dans les pétales. *SMR2* est exprimé dans le tissu conducteur de la racine. *SMR3* est exprimé dans le tissu conducteur de la racine, dans la graine et dans les pétales. *SMR4* est exprimé dans la racine au niveau des cellules en division de la zone méristématique. *SMR5* est exprimé dans le tissu conducteur de la racine au niveau de la transition entre la zone d'élongation et la zone de maturation et au niveau de la zone d'initiation des racines latérales ainsi que dans la graine. *KRP2* est exprimé dans le bourgeon floral et la fleur, notamment dans les pétales.

II-1-2 Analyse quantitative de l'expression de gènes *SIM/SMR* in planta

Nous avons souhaité compléter les données de microarrays par des analyses de RT-PCR quantitative des gènes *SIM/SMR*, dont on verra par la suite qu'ils sont induits par le stress hydrique. Ainsi l'expression de *SIM*, *SMR1*, *SMR3* et *SMR5* a été mesurée séparément dans les parties aériennes et les racines de plantules après 11 jours de croissance en conditions de culture *in vitro*. Les valeurs d'expression sont normalisées par rapport à la valeur la plus faible qui est celle de l'expression de *SMR5* dans les parties aériennes et sont représentées par une échelle semi-logarithmique (figure III.3). L'expression des gènes *SIM*, *SMR3* et *SMR5* est de 4 à 10 fois plus élevée dans les parties racinaires que dans les parties aériennes, ce qui valide *in planta* les données publiques de microarray pour *SIM* et *SMR3* mais pas pour *SMR5*. Au contraire, *SMR1* suit une tendance inverse par rapport aux données de microarray, puisqu'une expression plus forte est observée dans la partie aérienne. On peut aussi noter que les gènes *SIM*, *SMR1* et *SMR3* atteignent des niveaux d'expression relativement élevés (>100) par rapport à *SMR5*, ceci va dans le sens des données publiques des analyses de transcriptomique. Nous devons donc interpréter avec prudence les données de microarray disponibles dans le domaine public et les résultats de RT-PCR quantitative.

Figure 1: Comparison of the effect of the different treatments on the growth of the plants. The data are presented in the following table:

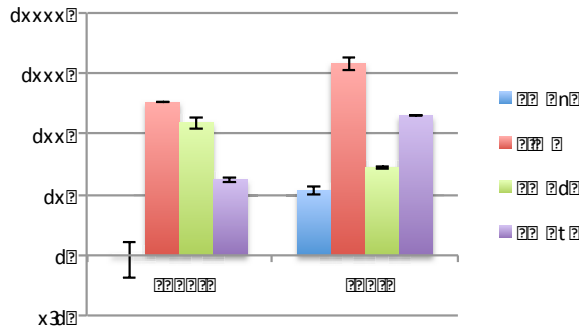


Figure 1: Comparison of the effect of the different treatments on the growth of the plants. The data are presented in the following table:

3.1. Effect of the different treatments on the growth of the plants

The results of the experiment are presented in the following table:

Treatment	dx
T1 (blue)	~1.2
T2 (red)	~2.5
T3 (green)	~2.2
T4 (purple)	~1.8

The data show that the different treatments have a significant effect on the growth of the plants. The treatment with the highest growth is T2 (red), followed by T3 (green), T4 (purple), and T1 (blue).

The results of the experiment are presented in the following table:

Treatment	dx
T1 (blue)	~1.2
T2 (red)	~2.5
T3 (green)	~2.2
T4 (purple)	~1.8

The data show that the different treatments have a significant effect on the growth of the plants. The treatment with the highest growth is T2 (red), followed by T3 (green), T4 (purple), and T1 (blue).

Figure 1

Figure 2

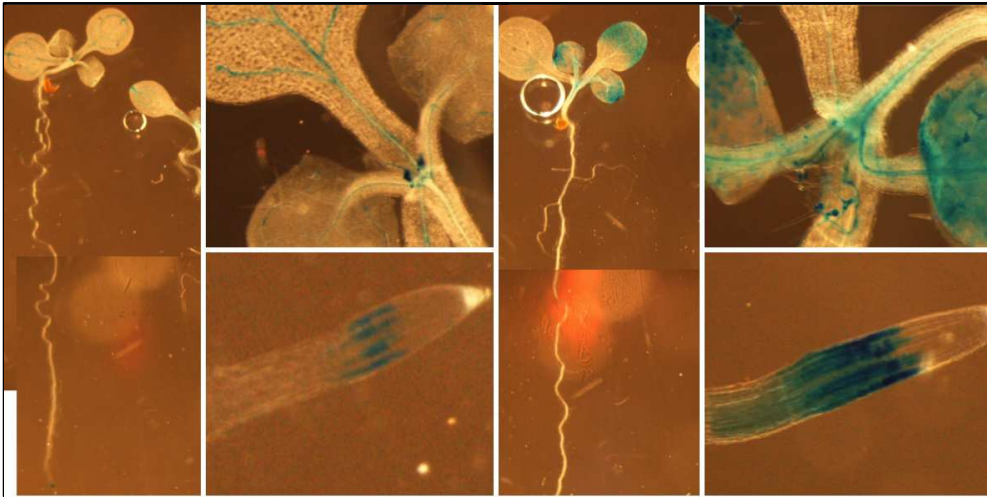


Figure 3

Figure 4

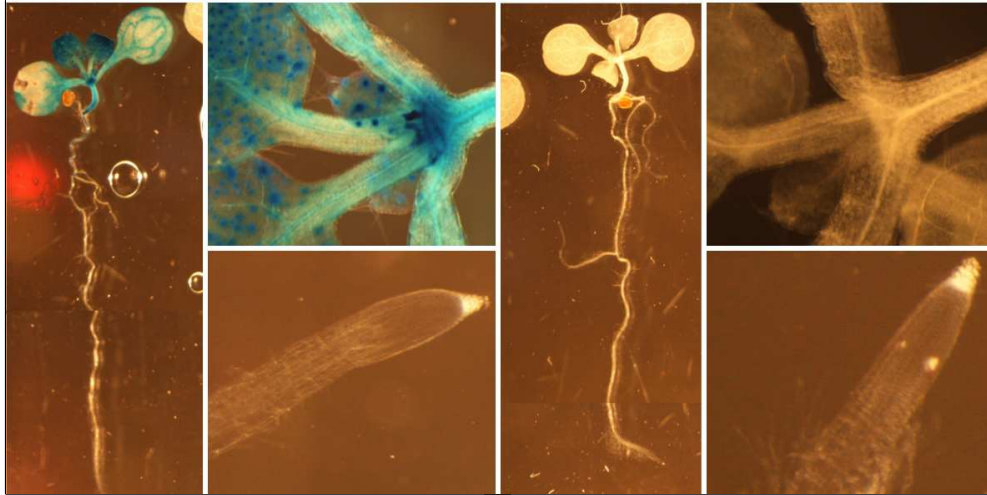


Figure 5

Figure 6

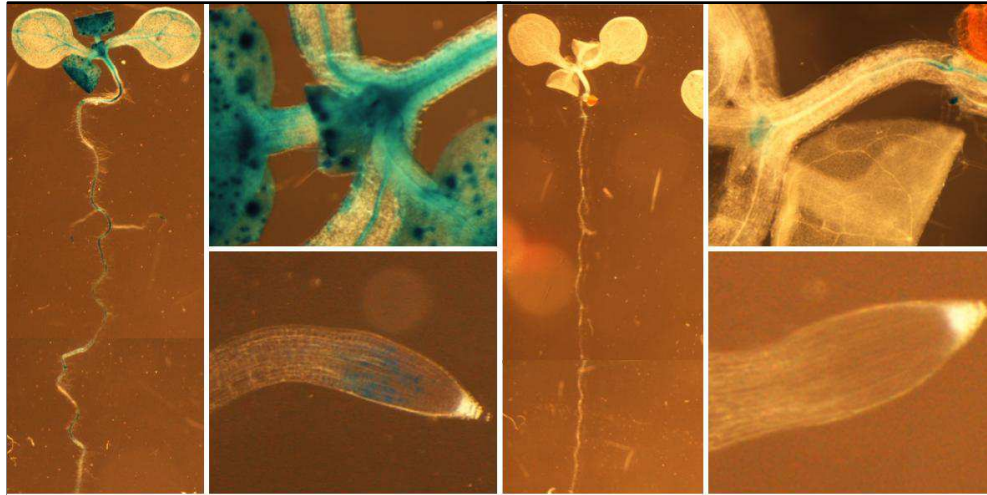


Figure 1-6: Whole and dissected views of plant root systems showing blue staining in the root tip and vascular tissue. Figure 1 shows a whole plant with a root system. Figure 2 shows a dissected view of the root tip. Figure 3 shows a whole plant with a root system. Figure 4 shows a dissected view of the root tip. Figure 5 shows a whole plant with a root system. Figure 6 shows a dissected view of the root tip.

Dans la partie aérienne, *SMR1* est exprimé au niveau des principaux tissus conducteurs, dans les trichomes, dans les cotylédons et les feuilles (zone proche de la pointe). Aucune expression de *SMR2* n'est visible au niveau de la racine. *SMR2* est exprimé dans la partie aérienne au niveau des principaux vaisseaux conducteurs, dans les trichomes, à la base des cotylédons et dans les feuilles. On ne détecte aucune expression de *SMR3* dans les plantules. *SMR4* est exprimé dans la pointe racinaire au niveau des cellules en division de la zone méristématique et dans les tissus conducteurs, ceci recoupe partiellement les données de microarray. Dans la partie aérienne, *SMR4* est exprimé dans les feuilles et au niveau des principaux vaisseaux conducteurs dans les cotylédons, dans les trichomes. *SMR5* est exprimé très légèrement au niveau de l'hypocotyle.

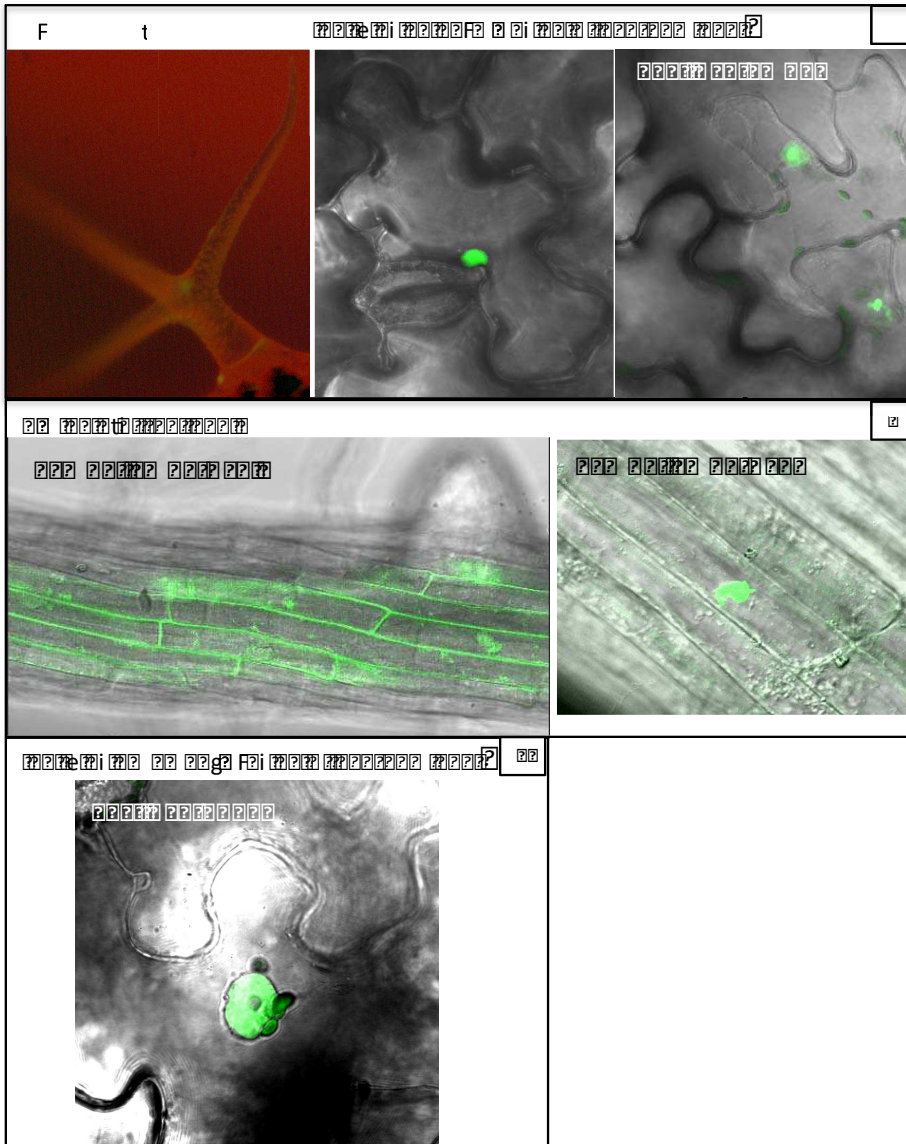
Des différences existent entre les données de microarray et mes résultats expérimentaux. Contre toute attente, on n'observe pas de coloration GUS au niveau des trichomes dans la lignée pSIM:GUS. Ceci peut s'expliquer par le manque de certains éléments de régulation dans la séquence du promoteur utilisée. La séquence promotrice utilisée est de 1890 pb en amont du gène, il aurait fallu utiliser une séquence plus longue en amont du gène *SIM*. Il est aussi possible que certains éléments de régulation soient en aval du gène. De même, il est à envisager que certains éléments du promoteur des *SMR* analysés puissent manquer dans les lignées ici présentées. Concernant *SMR1*, la séquence promotrice utilisée est de 2000 pb en amont du gène. Pour l'ensemble des autres *SMR*, la séquence promotrice utilisée est de 1000 pb en amont du gène.

?

?

?

?



Il est possible de visualiser la structure de la cellule végétale à l'aide de microscopie à fluorescence.

Il est possible de visualiser la structure de la cellule végétale à l'aide de microscopie à fluorescence. Cette technique permet d'observer des structures cellulaires spécifiques marquées par des fluorochromes. Les images montrent des cellules végétales avec des signaux fluorescents qui mettent en évidence des structures telles que les parois cellulaires, les chloroplastes ou d'autres organelles. Les images sont présentées sous forme de panneaux montrant des cellules individuelles et des sections de tissus végétaux.

?

?

?

?

' à

II-2- Etudes de la localisation subcellulaire et de la régulation post-traductionnelle

II-2-1- Etude de la compartimentation des protéines CKI d'*Arabidopsis thaliana*

II-2-1-1- Etude de la compartimentation des CKI *in planta*

D'après Churchman *et al.* (2006), les protéines SIM, SMR1, SMR2 et SMR3 sont nucléaires. Dans un premier temps, j'ai souhaité confirmer ces données. Pour cela des feuilles de *N. benthamiana* ont été transformées transitoirement avec des constructions exprimant les protéines de fusion traductionnelle GFP-SIM, GFP-SMR1 et GFP-KRP2 sous le contrôle du promoteur fort et constitutif *CaMV* (35S) originaire du virus de la mosaïque du tabac. Comme attendu, les différentes protéines de fusion présentent une localisation nucléaire (Figure III.5). J'ai également utilisé des constructions pour lesquelles les protéines de fusion ont été placées sous le contrôle de leur promoteur endogène, ces lignées ont été mise à ma disposition par le Pr Lieven De Veylder. Ainsi, les lignées transgéniques d'*A. thaliana* *p35S:GFP-SIM*, *pSMR5:SMR5-GFP* et *pSMR7:SMR7-GFP* ont aussi permis de visualiser la compartimentation nucléaire des protéines GFP-SIM, SMR5-GFP et SMR7-GFP. Notons cependant, que la protéine de fusion SMR5-GFP est également observée au niveau cytoplasmique.

II-2-1-2- Etude de la séquence d'adressage de SIM et KRP2

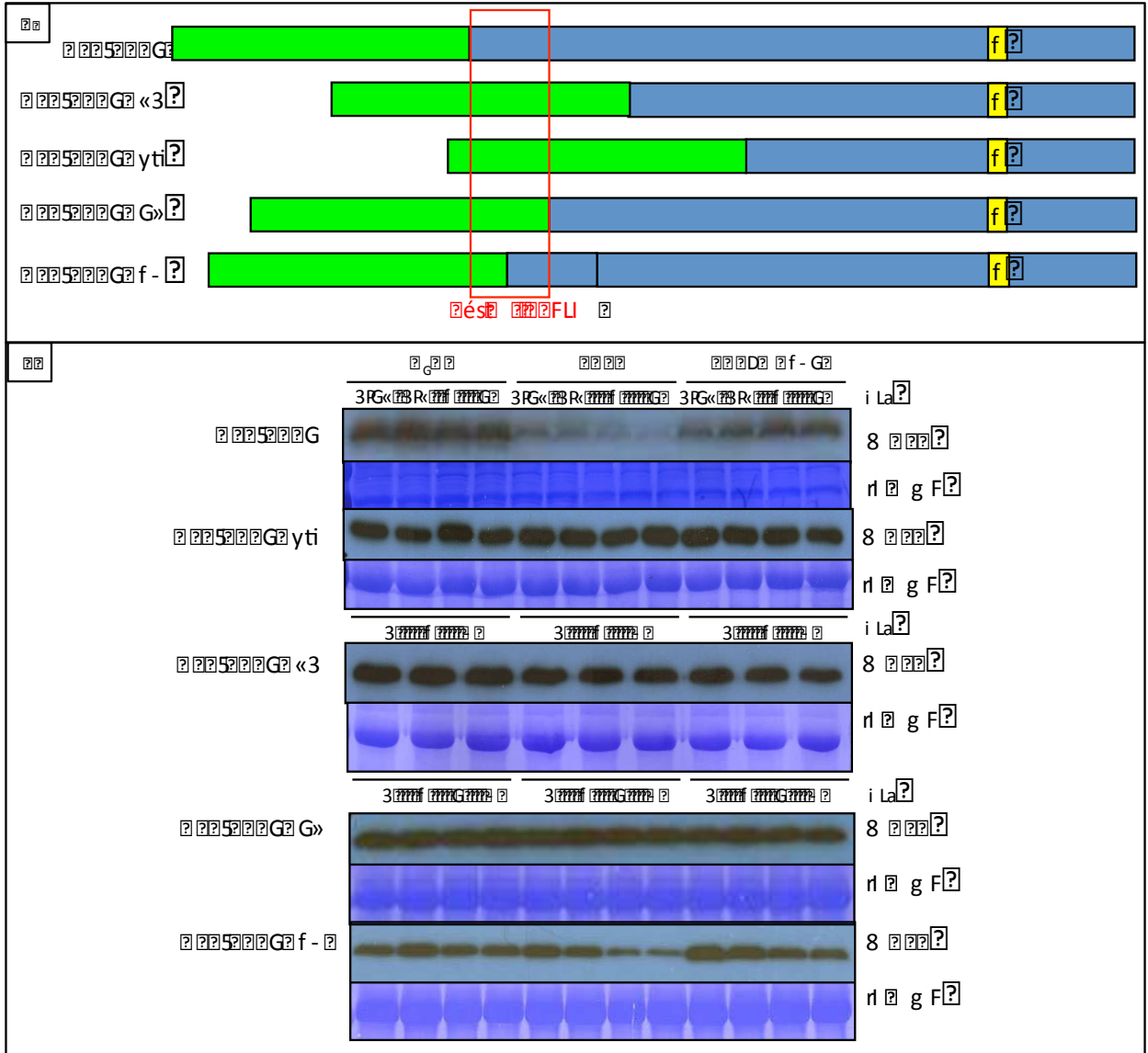
Etant donnée la localisation nucléaire de la protéine de fusion GFP-SIM, nous avons cherché à identifier un signal NLS (Nuclear Localisation Signal) d'adressage au noyau de la protéine SIM. Le logiciel de prédiction « pSORT » indique que les acides aminés 116 à 119 « KRRKR », c'est à dire le domaine 5C, correspondent à un motif NLS putatif (Figure III.6A). Pour vérifier cette séquence NLS potentielle, en utilisant le promoteur fort et constitutif 35S, des fusions traductionnelles en N-terminale de la protéine SIM entière, et de la protéine SIM tronquée, nommée ci-après SIMC12, au niveau des 12 derniers acides aminés situés en partie C-terminale (aa 116 à 127 ; figure III.6A), ont été exprimées de façon transitoire par transformation biolistique de protoplastes BY-2 de *N. benthamiana*.

L'observation du signal de fluorescence émis par la GFP permet la localisation sub-cellulaire de la protéine de fusion. La protéine de fusion GFP-SIM est nucléaire, tandis que la protéine tronquée GFP-SIMC12 apparaît nucléaire et cytoplasmique (figure III.6B1). La séquence d'adressage au noyau serait donc bien comprise dans la séquence « KRRRSFRSCSRR » en partie C-terminale de la protéine SIM. Cette donnée confirme la prédiction *in silico* initiale, la séquence d'adressage au noyau correspondrait à la séquence « KRRR » du domaine 5C.

Parallèlement, nous nous sommes intéressés à l'identification du signal d'adressage au noyau de la protéine KRP2, homologue de KRP1. Le logiciel en ligne de prédiction « pSORT » indique les acides aminés 23 à 26 « KRRK » comme NLS putatif (Figure III.6A). Nous le nommerons NLSa. Le logiciel « predict NLS » donne les acides aminés 5 à 26 «RRRERDVVEENGVT'TTTVKRRK », mais également 149 à 154 « RRRLRK » comme séquence NLS possible, nous les nommerons respectivement NLSb et NLSc. La localisation de ces trois motifs NLS est précisée dans la séquence entière de la protéine KRP2 (figure III.6A). De même que pour SIM, des fusions traductionnelles, sous le contrôle du promoteur 35S, en position N-terminale de la protéine KRP2 entière et de la protéine KRP2 tronquée des 26 premiers acides aminés situés en partie N-terminale (aa 1 à 26), nommée KRP2N26, ont été exprimées transitoirement en utilisant la transformation par infiltration de feuilles de *N. benthamiana*. KRP2N26 comme KRP2 sont exclusivement nucléaires (figure III.6B2). Ce résultat indique que la séquence d'adressage au noyau de KRP2 ne semble pas être en partie N-terminale et conduit à exclure les motifs NLSa et b. La séquence NLS de KRP2 pourrait être le motif NLSc. Cette hypothèse est encore probable mais n'a pas été testée dans ce travail.

II-2-2- Etude de la régulation post-traductionnelle des CKI d'*A. thaliana*

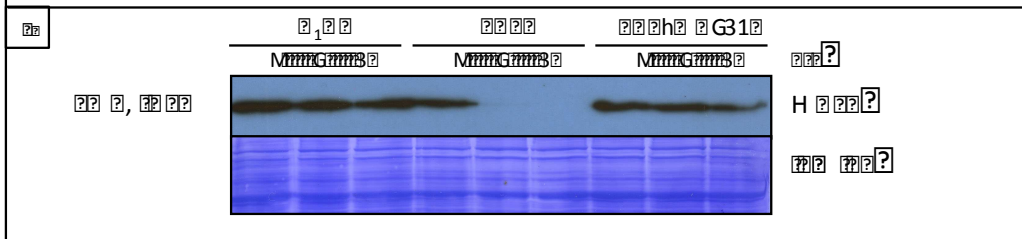
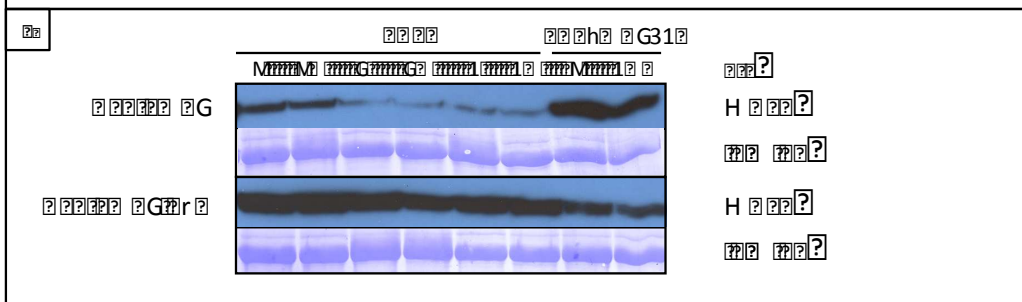
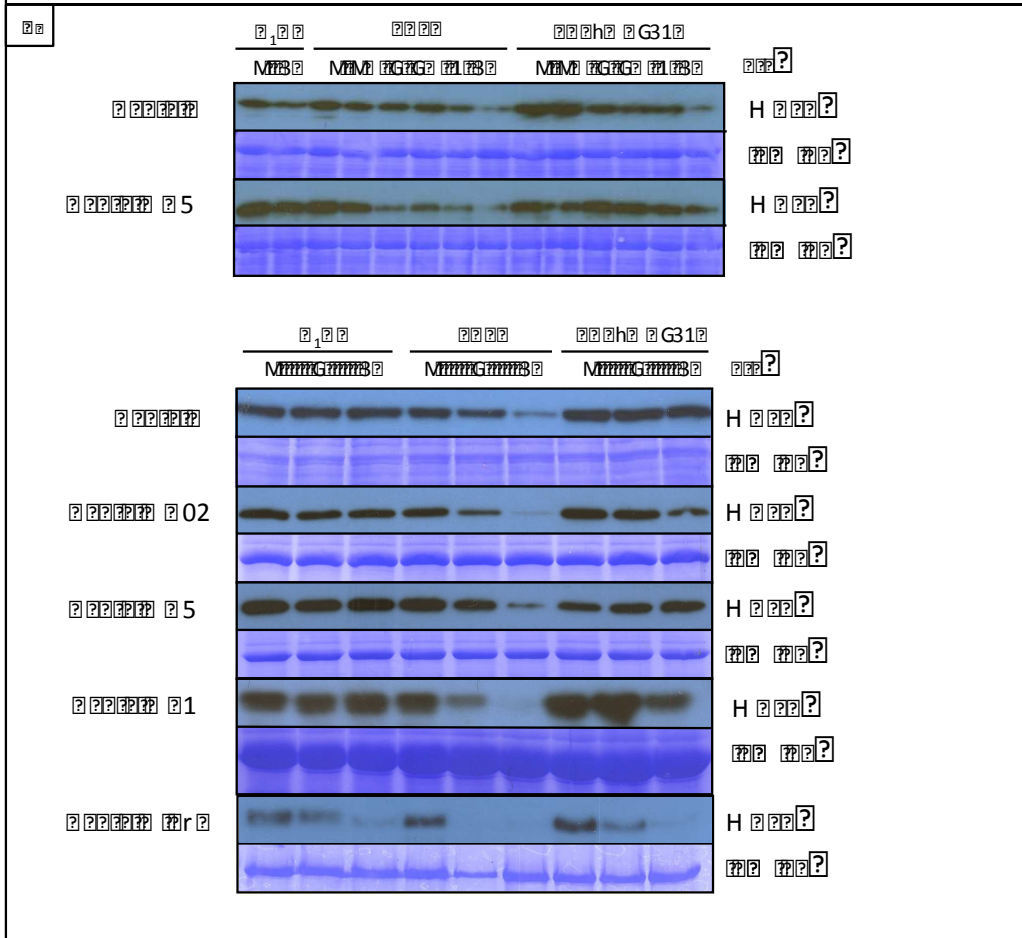
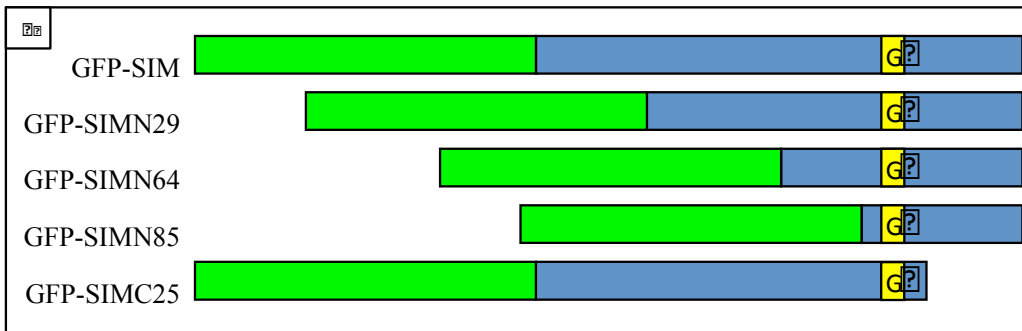
Chez les animaux comme chez les plantes, la régulation post-traductionnelle des CKI passe souvent par la voie ubiquitine-protéasome dite UPS (Marrocco *et al.*, 2010 ; Starostina et Kipreos, 2012). Chez *Arabidopsis*, KRP6 et KRP7, entre autre, sont reconnues par une E3 ligase, le complexe SCF^{FBL17}, puis dégradées par le protéasome au cours du développement du grain de pollen (Kim *et al.*, 2008; Gusti *et al.*, 2009).



7E10 RNA variants and their effect on 5' UTR

7E10 RNA variants and their effect on 5' UTR. The 5' UTR of 7E10 RNA is highly structured and contains several conserved motifs, including the 3'FG motif. The 3'FG motif is a conserved sequence in the 5' UTR of the 7E10 RNA, and its presence is essential for the stability and function of the RNA. The 7E10 RNA variants, including 7E10G, 7E10G yti, 7E10G <3>, 7E10G G>, and 7E10G f-, all contain the 3'FG motif. The Northern blot analysis shows that the 7E10 RNA variants are detected by the 3'FG probe, indicating that the 3'FG motif is conserved in all variants. The Northern blot analysis also shows that the 7E10 RNA variants are detected by the iLa and rlgF probes, indicating that the 5' UTR of the 7E10 RNA variants is highly structured and contains several conserved motifs, including the 3'FG motif. The Northern blot analysis shows that the 7E10 RNA variants are detected by the 3'FG probe, indicating that the 3'FG motif is conserved in all variants. The Northern blot analysis also shows that the 7E10 RNA variants are detected by the iLa and rlgF probes, indicating that the 5' UTR of the 7E10 RNA variants is highly structured and contains several conserved motifs, including the 3'FG motif.

- ?
- ?
- ?
- ?
- ?



© 2010 Cold Spring Harbor Laboratory Press

La demi-vie d'une protéine peut être mesurée par quantification relative par Western-blot après traitement avec un inhibiteur de la synthèse des protéines : le cycloheximide (CHX). Pour déterminer l'implication de la voie de dégradation spécifique des protéines par le protéasome 26S dans la dégradation de la protéine d'intérêt, on utilise un inhibiteur du protéasome 26S, le MG132, combiné à un traitement au CHX. Des prélèvements sont effectués à différents temps après le début des traitements des drogues.

Ainsi j'ai réalisé des Western-blot à partir de 10 µg d'extraits totaux de protéines de feuilles de *Nicotiana benthamiana* exprimant transitoirement les protéines de fusion GFP-SIM, GFP-SMR1 et GFP-KRP2 sous le contrôle du promoteur fort et constitutif *CaMV* (« 35S »), et ayant été traitées avec une solution de cycloheximide « CHX » (100 µM), avec une solution de cycloheximide « CHX » (100 µM) plus une solution de MG132 (100 µM) ou simplement avec de l'eau stérile. L'anticorps monoclonal anti-GFP-HRP (anti-Green Fluorescent Protein-Horseradish Peroxidase, Miltenyi Biotec) conjugué à une peroxydase est utilisé à la concentration 1/5000^{ème}. A l'issue du Western-blot, les protéines totales de la membrane sont colorées au bleu de Coomassie, dite « loading », qui sert de contrôle de charge de la quantité de protéines dans chaque échantillon.

On procède de même avec la lignée transgénique stable d'*Arabidopsis thaliana* pSMR7:SMR7-GFP. On s'assure de l'expression et de la localisation nucléaire de chacune des protéines par observation du signal émis par la GFP au microscope à fluorescence lors de chaque expérience indépendante.

Comme le montre la figure III.7, la quantité de protéines SIM, SMR1, SMR7 et KRP2 est stable au cours du temps en l'absence d'inhibiteur. En présence de cycloheximide, elle diminue rapidement, cependant elle est stabilisée par l'ajout de MG132 à un niveau équivalent à l'absence de traitements. Ces résultats me permettent de conclure que chez *Arabidopsis*, la demi-vie de toutes les CKI étudiées est globalement courte. L'inhibition de la dégradation des protéines CKI par le MG132 révèle aussi que leur dégradation dépend du protéasome 26S. Le résultat obtenu avec la lignée transgénique stable pSMR7:SMR7-GFP permet de confirmer l'existence de cette voie de dégradation spécifique d'une SMR chez *Arabidopsis thaliana* et exprimée sous le contrôle du promoteur endogène.

II-2-3- Etude des éléments de régulation par la voie UPS des CKI d'*A. thaliana*

II-2-3-1 Etude du motif « dégron »

Suite à ces résultats, j'ai souhaité mieux caractériser le mode de dégradation de ces protéines. Les protéines cibles d'une E3 ligase sont reconnues au niveau d'un domaine appelé le dégron. D'après Zhou *et al.* (2003), la protéine KRP1, aussi appelée ICK1, possède un motif dégron dans les 108 premiers acides aminés en partie N-terminale de la protéine. Des constructions codant pour des versions tronquées en N-terminal de la protéine KRP2 et des versions tronquées en N- et C-terminal de la protéine SIM ont été réalisées pour tenter de déterminer leur dégron (figure III.7A et C). La protéine KRP2 et les versions tronquées de cette protéine KRP2N50, KRP2N87, KRP2N26, KRP2N13 ainsi que la protéine SIM et les versions tronquées de cette protéine SIMN29, SIMN64, SIMN85 et SIMC25 ont été fusionnées avec la GFP en N-terminal. Toutes ces constructions sont sous le contrôle du promoteur 35S. On s'assure de l'expression et de la localisation nucléaire de chacune des protéines tronquées par observation du signal GFP au microscope à fluorescence lors de chaque expérience indépendante. Curieusement, aucune délétion pratiquée sur SIM n'a permis de bloquer la dégradation de la protéine en présence de cycloheximide (figure III.7D). Il semble que la protéine SIM ne possède pas un seul dégron, mais peut être plusieurs dégrons. Il est également possible que la protéine SIM soit directement dégradée suite à son association avec les partenaires cyclines/CDK qui eux seraient associés à une ubiquitine E3 ligase.

Contrairement à SIM, les délétions des 26 aux 87 premiers acides aminés en N-terminale de la protéine KRP2 ont pour effet de stabiliser la protéine en présence de cycloheximide au cours du temps. Toutefois, la délétion des 13 premiers acides aminés en N-terminale de KRP2 donne une protéine instable en présence de cycloheximide. Ces résultats indiquent que la protéine tronquée KRP2N13 contient le dégron alors que la protéine KRP2N26 ne le possède pas, ce qui suggère que le dégron de KRP2 est contenu dans la séquence de 14 acides aminés « EENGVTTTTVKRRK » située entre les acides aminés 13 et 26 (figure III.7A).

II-2-3-2 Etude du rôle des lysines

La protéine reconnue par une E3 ligase est ubiquitinée. Une première ubiquitine est fixée sur la protéine cible au niveau d'une lysine, d'autres ubiquitines peuvent alors se fixer à un résidu lysine de la première ubiquitine pour former une chaîne d'ubiquitines qui sera reconnue par le protéasome 26S comme signal pour la protéolyse. La substitution de toutes les lysines d'une protéine cible d'une E3 ligase a pour objectif d'empêcher la fixation de la chaîne d'ubiquitines sur la protéine et donc pourrait abolir la dégradation par le protéasome 26S. Nous avons tenté cette approche avec les protéines SIM et SMR1 dans le but d'obtenir des versions stables et fonctionnelles de ces protéines. Ainsi nous avons créé des versions mutées de ces protéines, où toutes les lysines ont été substituées en un acide aminé proche : l'arginine (« K>R »). La stabilité de ces protéines mutées SIM K>R et SMR1 K>R a été testée par expression transitoire chez *N. benthamiana* et traitements au cycloheximide, avec ou sans MG132 (figures III.7D et E). Au préalable, je me suis assurée par observation du signal GFP au microscope à fluorescence et pour chaque expérience indépendante, que la localisation nucléaire de chacune des protéines mutées était maintenue. Ces résultats montrent que la quantité de protéines SIM K>R diminue au cours du temps en présence de cycloheximide, la protéine n'est donc pas stabilisée. L'instabilité de la protéine SIM dont toutes les lysines ont été modifiées suggère que d'autres acides aminés peuvent servir d'accepteur de la chaîne ubiquitine, ou encore que la protéine pourrait être co-dégradée avec une autre protéine ubiquitinée avec laquelle elle interagirait.

Contrairement à SIM K>R, la quantité de protéines SMR1 K>R reste constante au cours du temps en présence de cycloheximide, la protéine est donc stable. Ce résultat confirme l'implication d'une lysine dans le processus de dégradation de SMR1. Cette construction a donc pu être utilisée pour créer des lignées transgéniques exprimant une version stable de la protéine SMR1 dans un fond sauvage Col-0. Ces lignées constituent un outil intéressant pour de futures études sur cette protéine.

III- Etude de la fonction des SIM/SMR en condition normale de développement

III-1- Caractérisation du phénotype développemental des mutants *sim/smr*

Les plantes porteuses des mutations *sim*, *smr1*, *smr2*, *smr5*, *sim.smr1* et *sim.smr1.smr2* dans le fond sauvage Col-0 de *Arabidopsis thaliana* ont été analysées. *sim* est un mutant présentant une substitution ponctuelle du codon « start » ATG en ATA, il a été identifié dans un crible génétique à l'ethylméthane sulfonate (Walker *et al.*, 2000). Les mutants *smr1*, *smr2* et *smr5* proviennent de la collection de mutants d'insertion T-DNA du SALK (Alonso *et al.*, 2003). Le double mutant *sim.smr1* et le triple mutant *sim.smr1.smr2* (*triple*) ont été obtenus dans le laboratoire du Pr John Larkin (USA) par croisements des simples mutants. Ce matériel nous a été fourni dans le cadre d'une collaboration avec ce laboratoire. Le mutant *smr5* a été obtenu et intégré aux analyses ultérieurement par rapport aux autres mutants, suite à la mise en évidence de l'induction de *SMR5* en réponse au stress hydrique, et n'est donc pas systématiquement représenté dans les différentes analyses.

L'aspect général des mutants est comparable à celui de la plante sauvage (figure III.8A) en condition de croissance normale et nécessite donc une analyse plus fine de ces mutants aux niveaux tissulaire et cellulaire.

III-1-1 Etude du phénotype des trichomes des mutants *sim/smr*

Le trichome d'une plante sauvage d'*Arabidopsis* est constitué d'une seule cellule de très grande taille et possédant un niveau de ploïdie élevé (jusqu'à 32 C au stade final) en raison du processus d'endoréplication (Melaragno *et al.*, 1993; Hülskamp *et al.*, 1994). Le mutant *sim* présente des trichomes multicellulaires (Walker *et al.*, 2000). Les noyaux indépendants des cellules de trichomes *sim* ont un niveau de ploïdie réduit de 2/3 par rapport à ceux de trichomes sauvages (Walker *et al.*, 2000).

Le phénotype des trichomes des mutants *sim/smr* comparé au trichome sauvage est présenté en figure III.8AB. Comme attendu, la plante sauvage Col-0 présente des

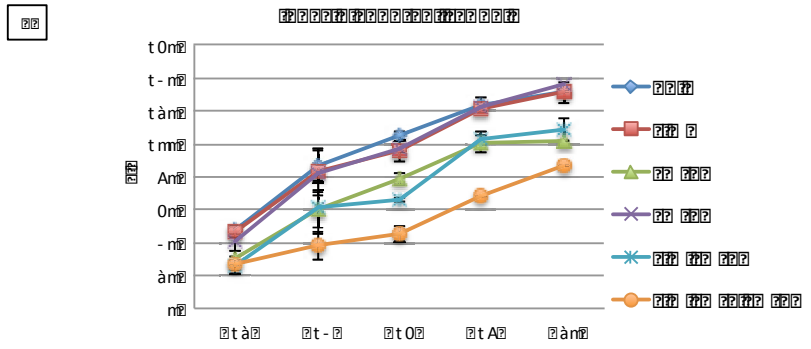
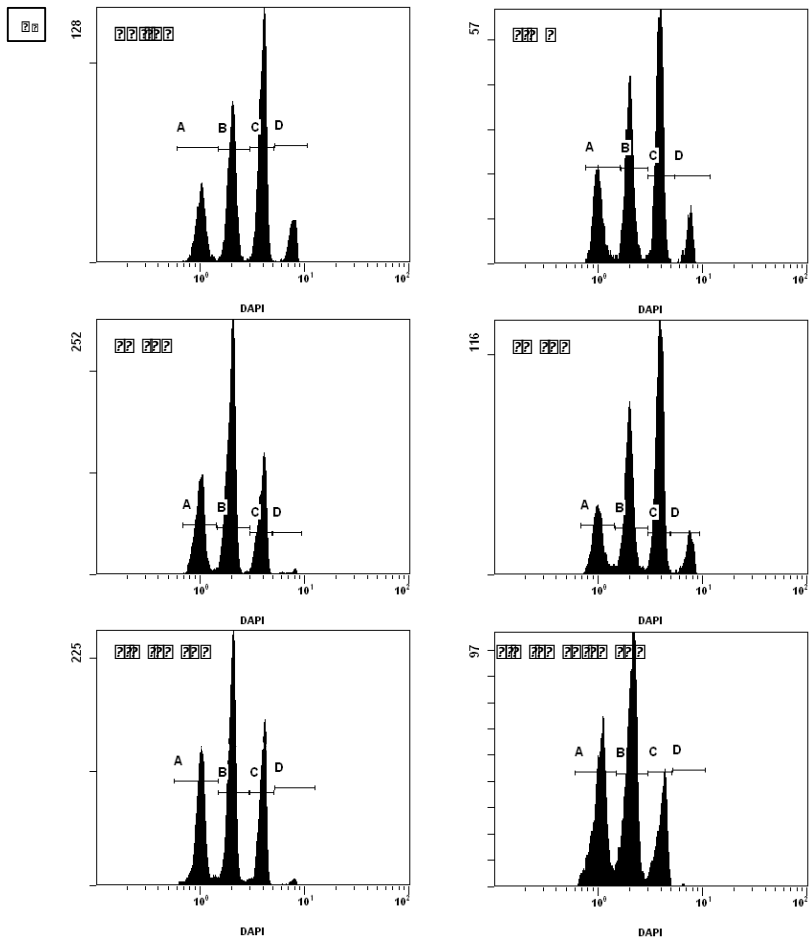
III-1-2 Etude de l'endoréplication au niveau des feuilles des mutants *sim/smr*

Chez le mutant *sim*, le niveau d'endoréplication dans les trichomes est plus faible que chez la plante sauvage (Walker *et al.*, 2000). Chez le mutant *lgo-1*, possédant une mutation ponctuelle dans le gène *SMR1* dans le fond sauvage Ler, le niveau d'endoréplication dans les sépales est également plus faible que chez la plante sauvage (Roeder *et al.*, 2010).

Nous avons donc décidé d'analyser le niveau de ploïdie des cellules de la feuille numéro 3 par cytométrie de flux grâce à l'émission de fluorescence du DAPI (4',6'-diamidino-2-phénylindole), marqueur fluorescent spécifique de l'ADN, chez des plantes Col-0, *sim*, *smr1*, *smr2*, *smr5*, *sim.smr1* et *sim.smr1.smr2* âgées de 12 à 20 jours. Le nombre de noyaux en fonction de l'intensité de fluorescence du DAPI émise par 20000 noyaux indépendants de 6 feuilles des plantes âgées de 20 jours, Col-0, *sim*, *smr1*, *smr2*, *sim smr1* et *sim smr1 smr2*, respectivement, est représenté en figure III.9A. L'intervalle d'intensité de fluorescence A correspond aux noyaux ayant un niveau de ploïdie de 2C, les intervalles B, C et D correspondent respectivement aux niveaux de ploïdie, 4C, 8C et 16C. On observe que Col-0, *sim* et *smr2* ont des profils comparables avec une répartition croissante des noyaux de 2C à 8C et un pic conséquent de noyaux à 16C. *smr1* et *sim.smr1* ont des profils proches avec moins de noyaux en 8C qu'en 4C et un pic très faible de noyaux à 16C. Enfin, le triple mutant est le seul qui présente plus de noyaux à 2C qu'à 8C et une quantité négligeable de noyaux en 16C.

Le pourcentage de noyaux présentant une valeur de ploïdie de 4C, 8C ou 16C est calculé par rapport au nombre total de noyaux. L'index d'endoréplication « EI » est calculé à partir de ces pourcentages selon la formule $EI = 4C + 2 \times 8C + 3 \times 16C$. Une moyenne de la valeur EI issue de 2 expériences représentatives est calculée. L'évolution de la valeur EI est représentée en fonction du temps chez les mutants comparés à la plante sauvage en figure III.9B. Les mutants *sim* et *smr2* présentent un index d'endoréplication similaire à Col-0 au cours du temps. Le triple mutant *sim.smr1.smr2* présente un index d'endoréplication plus faible que Col-0. Enfin, *smr1* et *sim.smr1* présentent un index d'endoréplication intermédiaire entre Col-0 et le triple mutant. Le triple mutant est le mutant le plus affecté comparé à la plante sauvage, et *smr1* est le seul simple mutant à provoquer une baisse significative de l'index d'endoréplication. L'index

2- CsM522NB I 22NS I 22G22S C2232I 22MCsA2I N22NG2222A223 sC2I NA2MC- 3A22222sM2CN2NB I 2
 22A2I - X2S U22I 22 22K22K22 2222N2 à 222s 22C3A2MCs 2s 2227 7 2I N22I 2M2S N22- I 222- I 22S C2222222A2
 7 2AS C2A2 ES 222 222 22 22 2. 2 22N2 22 222 4 S 2I N2 SI 2 Cè 622 2AA2I N262 222I A2 622 MC- 22AAS A2
 22I 2- CsM522NB I 22S 2I 3G22S 222222I A27 2262222A22NAAS A2- 622C2AK222I - I 2MA2SI 3ES 27 2I N2
 222I A262A2NC322- 7 2A2- S 2222I A242A2As M262A' 22222Cs AS 22N2Cs Ge622s 12627 2I N2SI 22222CN22I 22
 C22- I 222I 2222222 - I 22NB I 2222A2MC- N23 2A22222) 222 22222I A22222MC- 22AAS A222G2222SI 22Cè 622
 MCs M I 2s C2I N222222 2. '22



2- CsM522NB I 22NS I 22G22S C2232I 22MCsA2I N22NG2222A223 sC2I NA2MC- 3A22222sM2CN2NB I 2
 22A2I - X2S U22I 22 22K22K22 2222N2 à 222s 22C3A2MCs 2s 2227 7 2I N22I 2M2S N22- I 222- I 22S C2222222A2
 7 2AS C2A2 ES 222 222 22 22 2. 2 22N2 22 222 4 S 2I N2 SI 2 Cè 622 2AA2I N262 222I A2 622 MC- 22AAS A2
 22I 2- CsM522NB I 22S 2I 3G22S 222222I A27 2262222A22NAAS A2- 622C2AK222I - I 2MA2SI 3ES 27 2I N2
 222I A262A2NC322- 7 2A2- S 2222I A242A2As M262A' 22222Cs AS 22N2Cs Ge622s 12627 2I N2SI 22222CN22I 22
 C22- I 222I 2222222 - I 22NB I 2222A2MC- N23 2A22222) 222 22222I A22222MC- 22AAS A222G2222SI 22Cè 622
 MCs M I 2s C2I N222222 2. '22



The following text is a series of placeholder characters and symbols, likely representing a corrupted or redacted document. It includes various symbols such as question marks, asterisks, and alphanumeric strings, but no legible text is present.

?

?

?

?

.. Z

III-1-4- Etude du phénotype des rosettes des mutants *sim/smr*

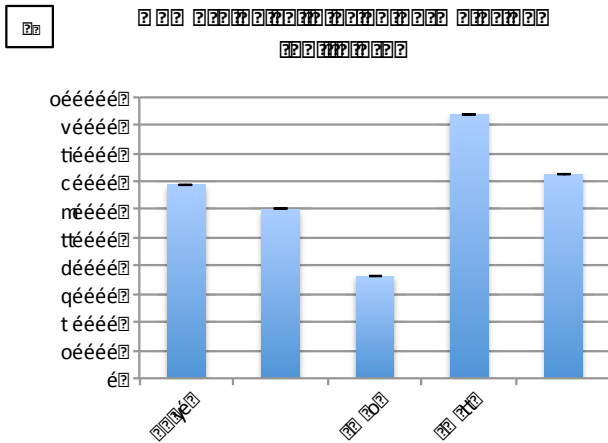
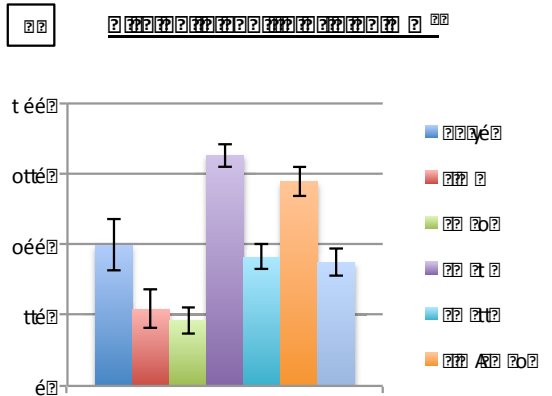
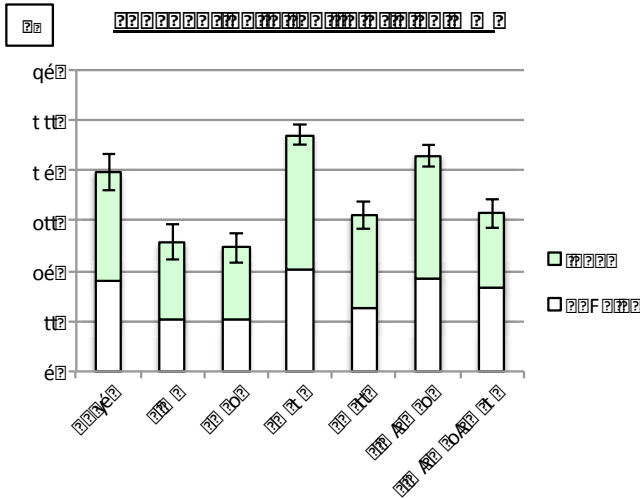
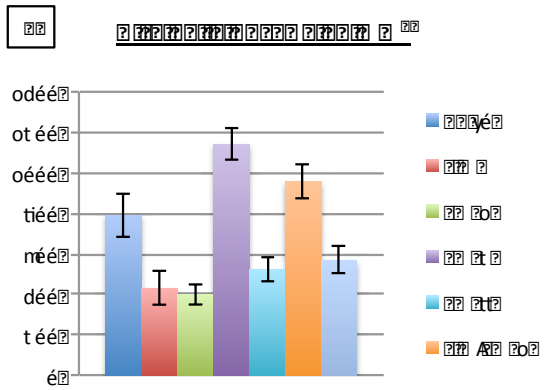
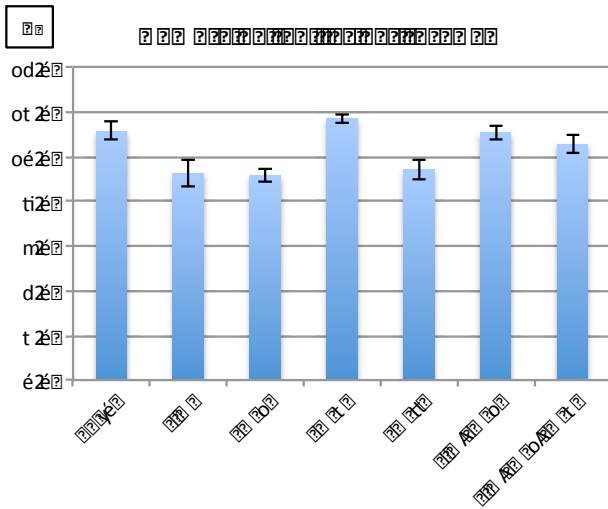
La plante modèle *Arabidopsis* est entre autre caractérisée par un phénotype d'hétéroblastie, c'est à dire que la morphologie de ses feuilles varie en fonction de leur âge et de leur ordre d'apparition au cours du développement de la plante. Des séries de feuilles de rosettes de plantes ayant poussé dans les conditions du culture « Contrôle » du WIWAM (VIB-Gent) et âgées de 21 jours (après semis) sont réalisées par disposition de l'ensemble des pièces de la rosette suivant l'ordre d'apparition de gauche à droite: les deux cotylédons puis les feuilles : de la première (n°1), c'est-à-dire la plus mature, à la dernière, la plus jeune. Ces séries de feuilles ont été effectuées à partir de plantes Col-0, *sim*, *smr1*, *smr2*, *smr5*, *sim.smr1* et *sim.smr1.smr2*. Les photographies de séries de feuilles montrant les changements graduels dans la forme des feuilles et représentatives de la morphologie de l'ensemble des pièces de la rosette de chacun des génotypes se trouvent en figure III.11. Globalement, si l'on compare la morphologie des pièces de rosettes de même numéro entre elles, on constate que l'hétéroblastie est conservée chez les mutants par rapport à la plante sauvage Col-0.

Ces séries de feuilles permettent de mettre en évidence des variations importantes de la taille de l'ensemble des feuilles entre les génotypes. Ceci a permis d'évaluer plusieurs caractéristiques à l'échelle des rosettes mêmes, aussi bien qu'au niveau de la feuille (aire, longueur, longueur du pétiole et du lobe d'une feuille donnée). Ces paramètres vous sont présentés ci-dessous.

III-1-4-1 Etude du nombre de feuilles et de l'aire des rosettes des mutants

Par ailleurs, pour chaque génotype au stade étudié, le nombre de feuilles par rosette a été déterminé. Le nombre de feuilles varie d'un génotype à l'autre. Le nombre moyen de feuilles par rosette de 21 jours est présenté en figure III.12A. *smr2*, *sim.smr1* et *sim.smr1.smr2* ont un nombre de feuilles proche de celui de Col-0, soit 11,2 feuilles. *sim*, *smr1* et *smr5* ont en moyenne 2 feuilles de moins, soit environ 9,3 feuilles. Le stade de développement des plantes semble varié légèrement selon les génotypes. Cet écart très faible ne correspond pas nécessairement à une différence phénotypique entre les mutants et la plante sauvage.

?



La compréhension des mots est influencée par le contexte et la fréquence d'exposition. Les enfants apprennent à reconnaître les sons et à associer ces sons à des significations spécifiques. Les parents jouent un rôle crucial dans ce processus en fournissant un environnement riche en stimuli linguistiques.

Les recherches montrent que les enfants qui sont exposés à une variété de langues dès leur plus jeune âge développent une meilleure compréhension des nuances linguistiques et une plus grande flexibilité cognitive. Cela leur permet de naviguer plus facilement dans un monde multiculturel et multilingue.

?

?

?

A partir des séries de feuilles décrites ci-dessus, l'aire des rosettes des plantes Col-0, *sim*, *smr1*, *smr2*, *smr5*, *sim.smr1* et *sim.smr1.smr2*, a été mesurée avec le logiciel Image J en additionnant l'aire de toutes les pièces de rosette. Une aire moyenne de ces rosettes est représentée en mm² en figure III.12B. Il apparaît qu'aucun des mutants ne présente une aire totale de rosette similaire à la plante sauvage. Les mutants *sim*, *smr1*, *smr5* et *sim.smr1.smr2* ont des rosettes plus petites que la plante sauvage. En revanche, les mutants *smr2* et *sim.smr1* ont des rosettes plus grandes que la plante sauvage.

III-1-4-2 Etude de l'aire des feuilles des mutants

Dans un même génotype, l'aire des feuilles numéro 1 et 2 varie fortement d'une plante à l'autre, cette paire de feuilles ne peut donc pas être considérée comme représentative du génotype. C'est pourquoi les analyses ont essentiellement portées sur la feuille numéro 3. L'aire de la feuille numéro 3 des rosettes présentées ci-dessus a été mesurée de la même façon. L'aire moyenne de ces feuilles est représentée en figure III.12D. Les mutants *sim*, *smr1*, *smr5* et *sim.smr1.smr2* ont des feuilles n°3 plus petites que la plante sauvage tandis que les mutants *smr2* et *sim.smr1* ont des feuilles n°3 plus grandes que la plante sauvage.

En comparant les deux graphiques en figures III.12 B et D, on observe que l'aire de la feuille n°3 est représentative de l'aire de la rosette pour la plante sauvage et l'ensemble des mutants étudiés. La feuille n°3 a donc été utilisée comme feuille « modèle » pour d'autres analyses.

III-1-4-3 Etude de la croissance en longueur des feuilles et des pétioles des mutants

La longueur de ces mêmes feuilles numéro 3 a été mesurée de la base du pétiole à la pointe du lobe. La longueur moyenne de ces feuilles est représentée par la longueur moyenne du pétiole et du lobe en figure III.12C. On observe que la longueur des feuilles suit la même tendance que l'aire des feuilles chez les mutants *sim/smr* et chez Col-0. Le pétiole représente 45% de la longueur de la feuille chez Col-0, ce pourcentage oscille entre 40 et 43 pour *sim*, *smr5*, *smr1*, *smr2* et *sim.smr1*. La différence la plus significative est observée chez *sim.smr1.smr2* dont les pétioles atteignent 53% de la longueur de la feuille.

III-1-4-4 Etude de l'aire des cellules épidermales des mutants

Des dessins des cellules de l'épiderme abaxial des feuilles numéro 3 des plantes Col-0, *sim*, *smr1*, *smr5* et *sim.smr1.smr2* ont été réalisés au niveau du premier quart et du troisième quart entre la base et la pointe et à mi-chemin entre la nervure centrale et la bordure (figure III.13A). Ces dessins ont servi à mesurer l'aire moyenne des cellules présentée en figure III.13B. La forme des cellules pavementaires et des cellules de garde n'est pas affectée chez les mutants par rapport à la plante sauvage. En comparant ces données avec l'aire moyenne des feuilles n° 3, on observe que l'aire des cellules de *sim*, *smr5* et *sim.smr1.smr2* est proportionnelle à l'aire des feuilles par rapport à Col-0. Par contre, l'aire des cellules de *smr1* représente 88 % de la taille des cellules de Col-0 tandis que l'aire des feuilles 3 de *smr1* représente 47% de l'aire des feuilles Col-0. L'aire des feuilles est la résultante de la taille des cellules et du nombre de cellules. Ceci signifie que la petite taille des feuilles *smr1* par rapport à Col-0 n'est pas due uniquement à la plus petite taille de ses cellules mais également à moins de division cellulaire. Pour *sim*, *smr5* et *sim.smr1.smr2* la plus petite taille des cellules explique en grande partie la plus petite taille des feuilles.

En divisant l'aire moyenne des feuilles par l'aire moyenne des cellules épidermales, on peut extrapoler le nombre de cellules épidermales abaxiales (figure III.12E). Chez *sim* et *sim.smr1.smr2* la division cellulaire est affectée dans une moindre mesure puisque l'écart avec la plante sauvage est inférieur à 10%. Il y a moitié moins de cellules chez *smr1* que chez Col-0, ceci est le résultat de moins de divisions cellulaires. A l'opposé, chez *smr5* l'augmentation du nombre de cellules est de 36% par rapport à Col-0, ceci est le résultat d'un plus grand nombre de divisions cellulaires.

III-1-5- Etude du phénotype stomatal des mutants

Les dessins de cellules épidermales de feuilles numéro 3 ont également servi à évaluer l'index stomatal, c'est à dire le ratio du nombre de stomates sur le nombre total de cellules épidermales (figure III.13C). L'index stomatal peut jouer un rôle dans la sensibilité de la plante face au stress hydrique. L'index stomatal est comparable pour Col-0, *sim*, et *smr5* ; il y a un peu plus de 2 stomates pour 10 cellules. L'index stomatal est

plus faible pour *smr1* ; il y a un peu moins de 2 stomates pour 10 cellules, cependant l'erreur standard est plus élevée pour cet échantillon. Pour *sim.smr1.smr2*, l'index stomatal est significativement plus faible que chez Col-0 avec 1,4 stomates pour 10 cellules.

D'un point de vue morphologique, contrairement aux stomates de la plante sauvage, on observe parfois deux stomates accolés chez *sim*, *smr1* et *sim.smr1.smr2* ; ces stomates contigus sont indiqués par des flèches en figure III.13A. Ce phénomène apparaît avec une occurrence très faible (<1%) et l'immense majorité des stomates *sim*, *smr1* et *sim.smr1.smr2* sont entourés de cellules pavementaires. Néanmoins ce phénomène de stomates contigus n'apparaît pas chez Col-0. En effet, dans le processus normal de divisions successives, asymétriques puis symétriques, formant les cellules de garde, le plan de division d'une cellule méristémoïde mère est orienté de telle façon que le nouveau méristémoïde est placé à distance du stomate préexistant ou d'une cellule précurseur. Chez la plante sauvage, un nouveau stomate ne peut donc pas être voisin d'un stomate préexistant (Liu *et al.*, 2010). Ces observations suggèrent que SIM, SMR1 et SMR2 pourraient être impliqués dans l'inhibition de la division des cellules de la lignée stomatale au niveau des cellules méristémoïdes mères (Meristemoid Mother Cell, MMC), des cellules méristémoïdes, ou des cellules de garde mère (Guard Mother Cell, GMC).

On peut donc conclure de cette analyse que la mutation des gènes *SIM/SMR* affecte la division et l'expansion cellulaire et éventuellement le processus de différenciation. Toutefois, ces résultats sont plutôt surprenant et indiquent que la mutation de ces gènes produit des effets parfois contraires alors que l'on pourrait penser qu'ils jouent un rôle identique dans le contrôle du cycle cellulaire.

III-2- Caractérisation de la lignée surexpresser de SIM, OE SIM

III-2-1 Caractérisation du phénotype du surexpresser OE SIM

Parallèlement à l'étude des mutants *sim/smr* perte de fonction, j'ai également utilisé une approche gain de fonction en exprimant la protéine SIM de manière ectopique. Ainsi, des

lignées « OE SIM » exprimant le transgène *GFP-SIM* sous le contrôle du promoteur fort et constitutif 35S ont été générées.

Le phénotype de plante OE SIM en génération T2 ségréante est présenté en figure III.14A. Les plantes OE SIM sont naines avec des feuilles très serrées. Ce phénotype est très sévère et conforme au phénotype publié (Churchman *et al.*, 2006). Ce résultat confirme la bonne expression du transgène chez les plantes OE SIM et la fonctionnalité de la protéine de fusion GFP-SIM. Certaines plantes de la génération T2 ségréante produisent quelques fleurs, comme on peut le voir en figure III.14A, chez la plante OE SIM de 7 semaines, puis elles donnent quelques siliques contenant un petit nombre de graines viables. D'autre, comme la plante OE SIM indiquée en figure III.14A, ne dépassent pas le stade de développement 2 ou 4 feuilles et sont complètement stériles. Les plantes de la génération T3 homozygotes ne sont pas viables, elles présentent un phénotype comparable aux plantes T2 homozygotes avec un nanisme très sévère (<5mm de diamètre de la rosette), elles ne dépassent pas le stade de développement 2 ou 4 feuilles. Ce phénotype très sévère ne permet pas l'étude de la réponse à un stress de ces plantes, puisqu'elles sont morphologiquement très différentes des plantes sauvages et ne sont pas viables.

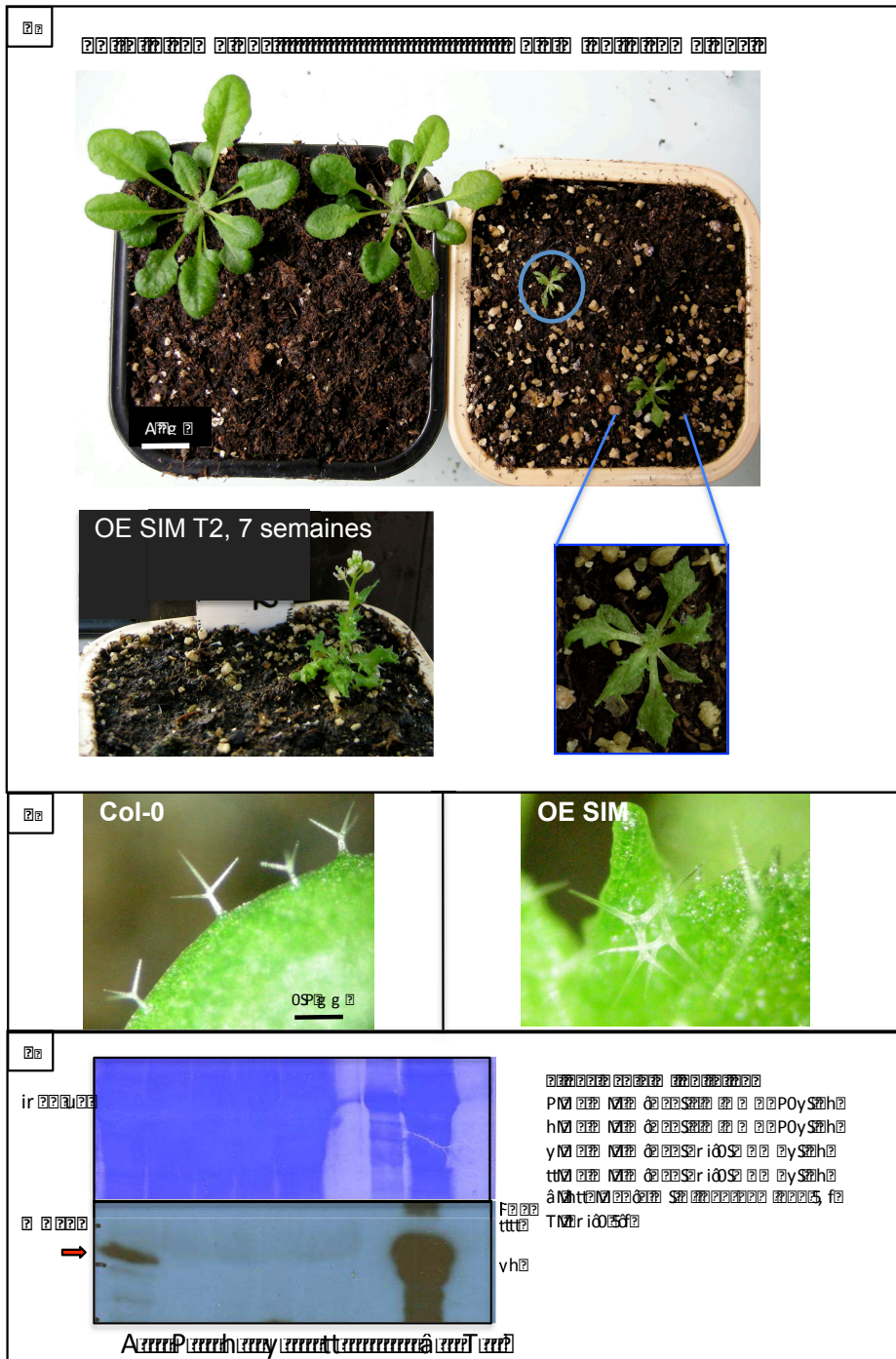
Néanmoins, notons également le phénotype des trichomes observés chez des plantes OE SIM par rapport aux trichomes de Col-0 (figure III.14B). La lignée OE SIM présente des trichomes à 4 branches au lieu de 3 chez la plante sauvage. La plus grande taille de l'unique cellule du trichome par rapport au trichome sauvage peut être reliée au niveau d'endoréplication plus élevé chez ces trichomes, comme précédemment publié (Churchman *et al.*, 2006).

III-2-2 Etude de l'expression de la protéine SIM recombinante chez OE SIM

Comme cela a déjà été présenté lors de l'étude de la compartimentation nucléaire de la protéine GFP-SIM, la fluorescence de la GFP est observée chez la plante OE SIM au niveau du noyau d'un trichome à l'aide d'un microscope à épifluorescence (figure III.5A). Ce résultat valide la présence de la protéine de fusion GFP-SIM chez le surexprimeur OE SIM.

?

?



ir

vh

A

PN

hN

yN

ttN

âN

FN

TTN

?

..ê

Une quantification de la protéine GFP-SIM chez différentes lignées transgéniques a été réalisée par Western-blot. Un signal GFP a été obtenu une seule fois dans des extraits protéiques de plantes OE SIM. Ce résultat est présenté en figure III.14C. Le Western-blot a été réalisé à partir de 100 µg d'extrait total de protéines de plantes OE SIM en génération T2. Le contrôle positif correspond à 5 µg d'extrait de protéines totales de plante *N. benthamiana* exprimant transitoirement la protéine de fusion GFP-SIM sous le contrôle du promoteur « 35S ». On observe un signal à 41 kDa correspondant à la protéine GFP-SIM pour ce contrôle. Aucun signal n'est observé pour le contrôle négatif correspondant à 5 µg de protéines totales extraites de la plante sauvage *A. thaliana* Col-0. Après 2 jours d'exposition du film photosensible sur la membrane, j'ai pu observer un signal correspondant à la protéine GFP-SIM à 41 kDa pour l'extrait protéique « OE SIM » confirmant l'expression de la protéine de fusion GFP-SIM chez le surexprimeur OE SIM. 100 µg d'extrait de protéines totales de plusieurs lignées transgéniques homozygotes en génération T3 exprimant la construction *SIM-GFP* sous le contrôle du promoteur endogène *SIM* ont également été déposés sur ce gel. Cependant, aucun signal n'a été observé chez ces plantes. L'expression plutôt modeste et les difficultés de détection de la protéine de fusion SIM-GFP a limité l'analyse de ces plantes et n'a notamment pas permis d'étudier la demi-vie de cette protéine de fusion dans des conditions d'expression natives.

Le phénotype de plante OE SIM comparé à la quantité infime de protéine GFP-SIM détectée suggère l'importance de la suppression de SIM pour le développement et la survie de la plante, soit par extinction du transgène comme avancé dans Churchman *et al.* (2006), soit par dégradation massive de la protéine exprimée.

IV- Etude de la fonction des SIM/SMR en condition de stress abiotique

Plusieurs gènes de la famille SIM/SMR sont induits en condition de stress abiotique et biotique (Peres *et al.*, 2007). L'un des stress abiotiques majeurs est le stress hydrique, en effet le manque d'eau est souvent le facteur le plus limitant pour la productivité agricole (Aguirrezabal *et al.*, 2006). Le stress hydrique recouvre différents aspects pour la plante qui peuvent être reproduits expérimentalement. La sécheresse en sol est étudiée grâce à des expériences de défaut d'arrosage partiel (stress modéré) ou total (stress sévère) dans les conditions de culture d'*Arabidopsis*. Le stress osmotique induit par le manque d'eau peut être reproduit par une expérience de culture *in vitro* sur un milieu enrichi en sels ou en mannitol. Enfin, on peut induire la réponse au stress hydrique par l'application exogène d'une phytohormone impliquée dans la perception du stress hydrique: l'acide abscissique (ABA).

Le phénotype de réponse au stress hydrique des mutants *sim/smr* a donc été comparé à celui de plantes sauvages. Ces analyses ont été menées en conditions de stress hydrique soit sévère (serres de l'IBMP, serres du PSB-VIB, armoires de culture SANYO), soit modéré (robot de phénotypage WIWAM). Des différences significatives ont pu être observées et vérifiées par analyse statistique.

IV-1- Etude de la fonction des gènes SIM/SMR en condition de sécheresse du sol

IV-1-1- Implication des gènes SIM/SMR lors d'un stress hydrique sévère

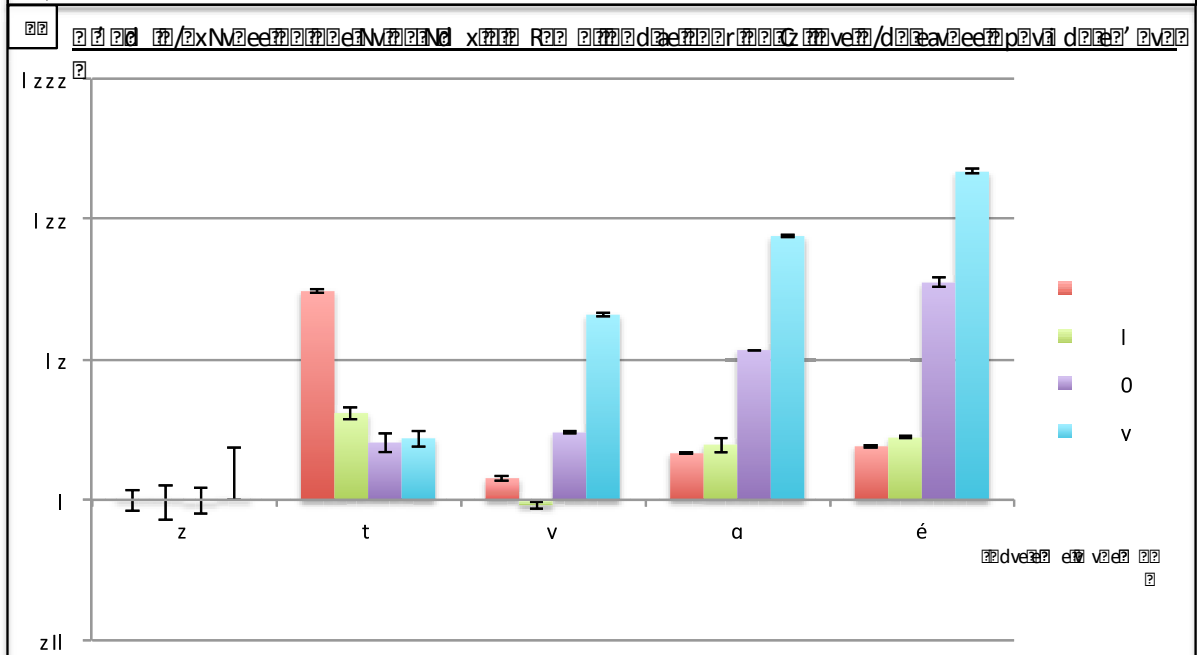
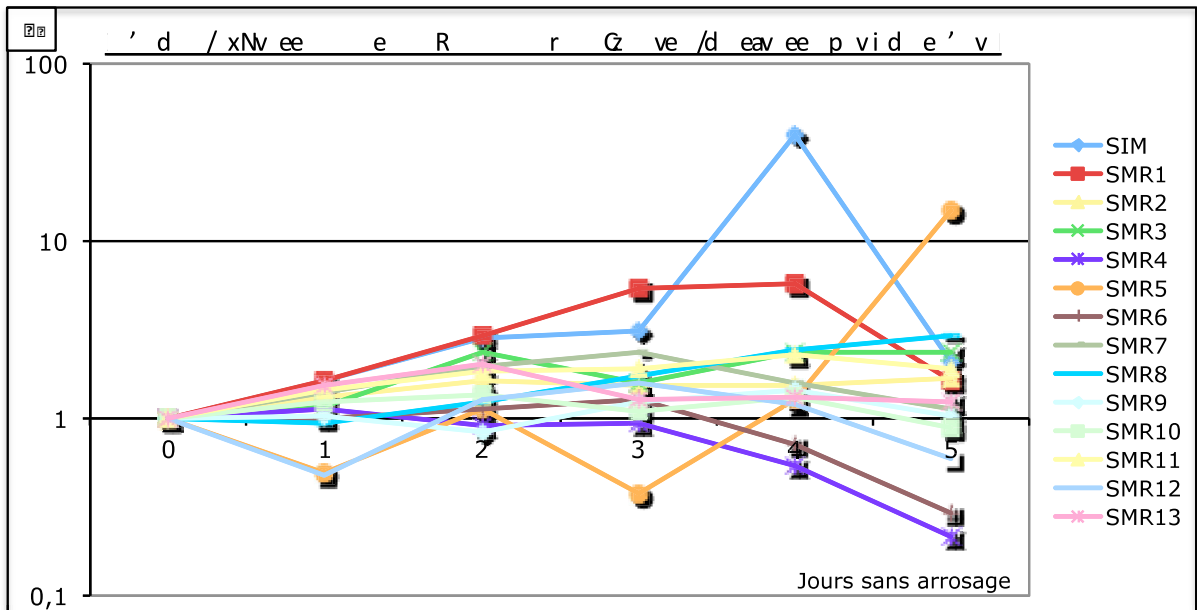
IV-1-1-1 Etude de l'expression des gènes SIM/SMR en réponse à un stress hydrique sévère

Tout d'abord, j'ai étudié l'accumulation des transcrits des gènes SIM/SMR en réponse à un stress hydrique sévère. Pour reproduire expérimentalement des conditions de sécheresse sur la plante sauvage, les graines Col-0 sont cultivées en condition de stress

sévère dans les serres de l'IBMP et cessent totalement d'être arrosées du jour 0 au jour 5 ou 7, ce qui constitue un stress hydrique sévère pour la plante.

On effectue des prélèvements de la partie aérienne de 12 plantes du jour 0 (J0) jusqu'au jour 5 ou 7. Le niveau d'expression des gènes *SIM*/*SMR* chez Col-0 est mesuré par RT-PCR quantitative. Les valeurs sont normalisées pour chaque gène par rapport à sa valeur au J0. Le graphique en figure III.15A présente l'expression relative de l'ensemble des gènes *SIM* et *SMR* de 1 à 13 entre J0 et J5 avec une échelle semi-logarithmique. Cette étude montre que 3 gènes sont fortement induits par le stress hydrique : *SIM*, dont le niveau d'expression atteint un pic équivalent à 40 fois le niveau d'expression de base de ce gène en condition de contrôle au jour 4, *SMR1* qui atteint 6 fois son niveau d'expression de base au jour 4 également, et *SMR5* qui atteint 15 fois son niveau basal d'expression au jour 5. L'expression de *SMR3*, *SMR7*, *SMR8*, *SMR11* et *SMR13* atteint le double de leurs valeurs basales, ce qui signifie qu'ils sont très faiblement induit. *SMR2*, *SMR9*, *SMR10* et *SMR12* ne varient pas voire sont réprimés. *SMR4* et *SMR6* sont réprimés entre 3 et 5 fois par rapport à leurs niveaux de base.

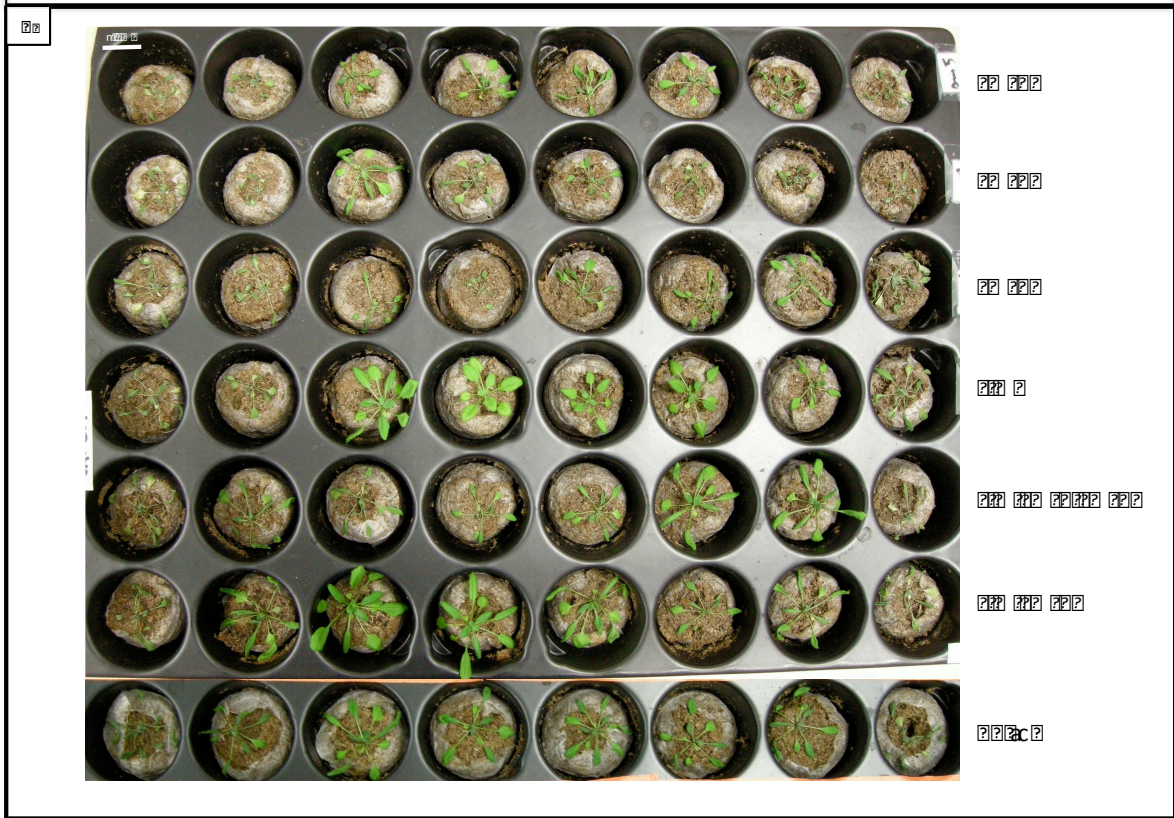
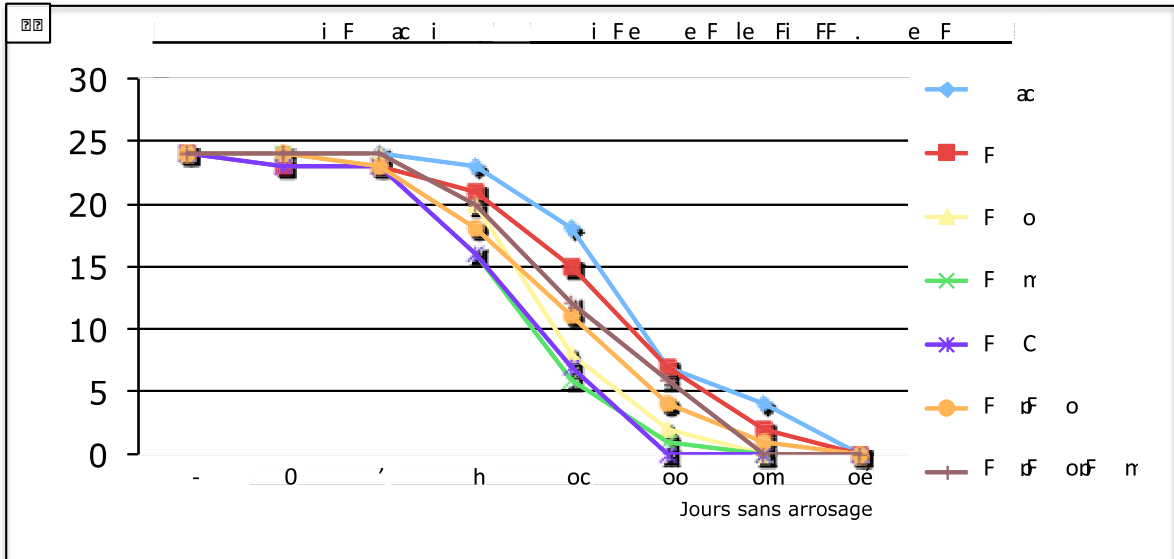
Les principaux gènes induits par le stress hydrique, c'est à dire ceux pour lesquels une induction supérieure à 3 a été observée dans au moins 5 expériences indépendantes, sont *SIM*, *SMR1*, *SMR3* et *SMR5* (figure III.15B). Les gènes *SMR8* et *SMR12* semblent également induits par le stress hydrique. *SIM* et *SMR1* présentent un pic d'expression au jour 4 puis le niveau d'expression diminue au jour 5, ceci correspond à une réponse rapide et transitoire lors de la survenue du stress hydrique. *SMR3* et *SMR5* présentent une expression en augmentation progressive et continue à partir du jour 4 jusqu'à la fin de l'expérience, ici au jour 7, ce qui correspond à une réponse plus tardive par rapport à *SIM* et *SMR1*.



Evolution of parameters l, z, and v over 5 days without irrigation. The y-axis is logarithmic (1 to 1000). The x-axis shows parameters t, v, a, and é. The legend includes l (red square), z (green square), and v (cyan square). Error bars are present for each data point.

IV-1-1-1 Etude de la sensibilité des mutants *sim/smr* à un stress hydrique sévère

Le fait que certains gènes *SIM/SMR* soient effectivement induits en conditions de stress hydrique sévère, m'a encouragée à poursuivre une approche fonctionnelle avec le matériel génétique établi. Malheureusement aucun mutant ciblant le gène *SMR3* n'est disponible dans la banque de mutant du SALK, c'est pourquoi il n'a pas pu être inclus dans les analyses phénotypiques. Des lots de 24 plantes Col-0, *sim*, *smr1*, *smr2*, *smr5* et *sim.smr1.smr2* ont subi les conditions de stress hydrique sévère en armoire de culture SANYO où la photopériode est de 16h de jour et 8h de nuit (21°C/18°C, 65% d'humidité). Pour cela, les graines de chaque génotype sont semées individuellement sur des pastilles de terreau Jiffy réhydratées individuellement dans un même volume d'eau. Dans le but d'éviter un « effet de position », les plantes de chacun des génotypes testés sont réparties en nombre égal entre la position de bordure, la position intermédiaire et la position centrale d'un plateau, de plus les plateaux sont réorientés quotidiennement dans l'armoire. Les plantes reçoivent un arrosage quotidien dont la quantité augmente de 2 puis 5 ml par pastille au fur et à mesure de la croissance des plantes afin de maintenir le terreau humide de façon égale pour chaque pastille. Les plantes sont âgées de 3 semaines au jour zéro de l'expérience, elles restent dans les mêmes conditions et cessent totalement d'être arrosées (jour 0) jusqu'à ce qu'elles soient entièrement desséchées (jour 13). Le nombre de plantes encore vivantes est compté chaque jour à partir du jour 0 de l'expérience jusqu'au jour 13. Les résultats d'une expérience représentative sont montrés en figure III.16A : au jour 6, toutes les plantes sont en vie, au jour 13, toutes les plantes sont mortes. Le nombre de plantes vivantes de l'ensemble des mutants *sim/smr* diminue plus rapidement que pour Col-0. Une photo de ces plantes est présentée au jour 10 de cette même expérience (figure III.16B). Le nombre de plantes vivantes de chaque génotype est présenté au jour 10 dans le tableau III.1 ; seule 50% des plantes *sim.smr1.smr2* sont encore vivantes contre 75% des plantes Col-0. La sensibilité des plantes face au stress hydrique va dans l'ordre croissant pour les génotypes suivants : Col-0 < *sim* < *sim.smr1.smr2* < *smr5*. Ce résultat a été observé lors de cinq expériences indépendantes réalisées dans différentes conditions de culture (serres de l'IBMP et serres du PSB-VIB, figure A3) ce qui rend cette observation très robuste. Les mutants *smr1*, *smr2* et *sim.smr1* sont fortement affectés par le stress hydrique, cependant le classement de leur sensibilité entre eux et par rapport aux autres



Les résultats de l'expérience montrent que les plants ont survécu plus longtemps dans les pots traités avec les produits naturels que dans les pots témoins. Les produits naturels ont permis de maintenir l'humidité du sol plus longtemps et de réduire l'évaporation de l'eau. Les résultats de l'expérience montrent que les plants ont survécu plus longtemps dans les pots traités avec les produits naturels que dans les pots témoins. Les produits naturels ont permis de maintenir l'humidité du sol plus longtemps et de réduire l'évaporation de l'eau.

?

?

?

?

«V

mutants est variable. On peut donc conclure que les mutants *sim/smr* étudiés présentent une sensibilité accrue face à un stress hydrique sévère.

Tableau III. 1. Survie des mutants *sim/smr* comparée à Col-0 au 10^{ème} jour d'un stress hydrique sévère. (Conditions de culture SANYO)

Génotype	Nombre de plantes vivantes	
	au jour 10	Pourcentage du lot initial
Col-0	18	75
<i>sim</i>	15	63
<i>smr1</i>	8	33
<i>smr2</i>	6	25
<i>smr5</i>	7	29
<i>sim.smr1</i>	11	46
<i>sim.smr1.smr2</i>	12	50

IV-1-2- Etude des mutants en condition de stress hydrique modéré

Le comportement des plantes Col-0, *sim*, *smr1*, *smr2*, *smr5*, *sim.smr1* et *sim.smr1.smr2* a également été analysé en condition de croissance contrôle (C) et en condition de stress hydrique modéré (S) dans le robot de phénotypage WIWAM (VIB-Gent).

De nombreux paramètres phénotypiques ont été mesurés lors de cette expérience de stress hydrique modéré, chez les plantes Col-0 et les mutants *sim/smr*, à savoir la croissance et l'aire des rosettes, l'aire des cellules épidermales, l'index stomatal, et le niveau d'endoréplication. Ces résultats sont présentés ci-dessous.

IV-1-2-1 Etude du phénotype des rosettes des mutants *sim/smr*

IV-1-2-1-1 Etude de la croissance des rosettes des mutants

La croissance des rosettes a été mesurée chez Col-0, *sim*, *smr1*, *smr2*, *smr5*, *sim.smr1* et *sim.smr1.smr2* entre le jour 7 et le jour 21 après semis en condition contrôle « C » et en condition de stress hydrique modéré « S » par le robot de phénotypage WIWAM. L'aire de rosettes est calculée par le robot à partir des photographies de plantes, l'aire de la surface verte est extraite du fond noir. L'évolution de l'aire moyenne des rosettes est présentée en unité arbitraire en figure III.17. Le comportement de *smr5* est extrême. En effet, 7 plantes sont mortes au cours de l'expérience en condition S, les feuilles dans un état de dessiccation avancées s'étiolent et jaunissent, ceci explique les phénomènes de diminution de l'aire des rosettes mesurée automatiquement par le WIWAM. Ce mutant apparaît clairement comme beaucoup plus sensible au stress hydrique que Col-0.

Une analyse statistique de la variance à 2 facteurs « two-way ANOVA » (ANalysis Of Variance) a été réalisée avec le logiciel de statistique R (www.R-project.org) sur l'interaction des facteurs de génotype et de traitement (C ou S), la valeur p ainsi calculée indique, en fonction des seuils statistiques retenus, si les différences d'aire observées par rapport à la moyenne sont significatives. La valeur p est indiquée entre le jour 7 et le jour 21 après semis pour chaque génotype sauf *smr5* (figure III.17A). *smr5* a été exclue de l'analyse en raison de son comportement extrême; une différence significative entre la condition S et la condition C apparaît dès le jour 8 (D8 : $p < 0,01$, D9 : $p < 0,001$, données non présentées). On considère les seuils statistiques $< 0,001$, $< 0,01$, $< 0,05$, $< 0,1$; les intervalles de valeur p sont représentés par un code couleur allant du rose, pour une variation significative entre C et S, au vert, pour une absence de variation entre C et S (figure III.17B). La valeur p oscille entre 0,12 et 0,90 au jour 7, c'est à dire avant l'établissement du stress hydrique. En revanche lorsque la valeur p passe en dessous de 0,1, la différence de croissance entre S et C s'accroît dans les 24 à 48 heures suivantes. On considère donc 0,1 comme un seuil pertinent des premiers effets du stress hydrique sur la croissance des rosettes. Chez la plante sauvage, le délai d'application du stress nécessaire pour observer les premières différences significatives est de 16 jours. Chez *smr1*, le délai est supérieur à 17 jours, ce mutant présente une sensibilité supérieure à

celle de la plante sauvage. Chez *sim*, le délai est de 13 jours soit 3 jours avant Col-0, *sim* semble plus sensible que Col-0. Les mutants *sim.smr1*, *smr2* et *sim.smr1.smr2* ont un comportement proche en terme d'apparition et de vitesse de progression de l'impact du stress, le délai est de 11 à 12 jours, soit 4 à 5 jours avant Col-0. Cette différence significative démontre que ces mutants sont plus sensibles que la plante sauvage. Cependant, le test « two-way ANOVA » repose sur les hypothèses de normalité de la distribution des échantillons, d'homoscédasticité (homogénéité des variances intergroupes), et d'indépendance des échantillons. La répartition gaussienne des distributions et l'indépendance des échantillons sont vérifiées; en revanche l'homogénéité des variances n'est pas respectée. En effet, la dispersion des données est 2 à 5 fois plus faible en condition de stress qu'en condition contrôle (sauf pour *smr2* et *smr5*). Le stress hydrique, en limitant la croissance, limite également l'hétérogénéité dans la taille des rosettes d'un génotype. La variance étant donc dépendante du paramètre de conditions de culture, il aurait mieux valu appliqué un test statistique non paramétrique. Ces résultats, pour un stress modéré, confirment le résultat obtenu lors d'un stress sévère: ils valident la forte sensibilité de *smr2* et *sim.smr1*. Seul le résultat pour *smr1* est infirmé, il n'est donc pas possible de conclure dans ce cas. La sensibilité des génotypes face au stress hydrique va dans l'ordre croissant pour les génotypes suivants : Col-0 < *sim* < *sim.smr1*, *sim.smr1.smr2* et *smr2* < *smr5*.

L'aire finale des rosettes au jour 21 est présentée en figure III.17C en mm² pour les conditions de contrôle et de stress. Elle a été calculée à partir des séries de feuilles, ce qui exclut forcément les plantes n'ayant pas survécu à cette expérience. Le pourcentage d'inhibition de l'aire finale des rosettes due au stress hydrique ($A(S)*100/A(C)$) est calculé en fonction des valeurs indiquées en figure III.17D. Bien que les mutants *sim* et *smr1* soient déjà deux fois plus petits que Col-0 en condition contrôle, l'ampleur de l'inhibition de croissance des rosettes due au stress hydrique est maintenue autour de 70% pour ces mutants comme pour Col-0. Il en va de même pour *smr2* et *sim.smr1* qui sont plus grands que Col-0 en condition C. *sim.smr1.smr2*, qui a une taille proche de Col-0, est aussi inhibé par le stress hydrique dans les mêmes proportions. *smr5* dont la taille est proche de celle de la plante sauvage en condition C, marque une inhibition plus forte (>80%) due au stress hydrique. En dépit du comportement extrême de *smr5*, cette inhibition reste cependant dans un ordre de grandeur comparable. Ces résultats

montrent que le stress hydrique impacte plus précocement la croissance des mutants *sim/smr*, pour arriver aux mêmes conséquences en terme de réduction de l'aire des rosettes en condition de stress par rapport à la condition contrôle.

IV-1-2-1-2 Etude de l'aire des feuilles des mutants

L'aire de la feuille numéro 3 des 12 plantes de chacun des génotypes testés, Col-0, *sim*, *smr1*, *smr2*, *sim.smr1*, *sim.smr1.smr2* et *smr5*, a été mesurée dans les conditions de contrôle et de stress hydrique du WIWAM au jour 21 de l'expérience. Le comportement de l'aire de la feuille numéro 3 est comparable à celui de la rosette en condition de stress chez les différents mutants. Les données d'aire des feuilles numéro 3 en mm² ont été analysées avec le logiciel de statistique R (www.R-project.org) et sont présentées sous forme de boîte à moustaches en figure III.18A. Ce mode de représentation met en évidence la dispersion des données avec l'écart-type centré sur la valeur moyenne (boîtes) et la distribution des données avec la valeur médiane (barre horizontale) et les valeurs extrêmes (moustaches) pour chaque génotype et condition. La dispersion des données est 2 à 5 fois plus faible en condition de stress qu'en condition contrôle, sauf pour *smr2* et *smr5*. Pour *smr2*, l'aire des feuilles n°3 est naturellement assez homogène dans la population en condition contrôle. Pour *smr5*, la relative grande dispersion des valeurs en condition de stress est artificiellement créée par le fait que seul 5 plantes parmi 12 ont survécu jusqu'au jour 21 de l'expérience. Le stress hydrique en limitant la croissance limite l'hétérogénéité de la taille des feuilles pour un génotype et même entre les génotypes.

La longueur des pétioles et des lobes des feuilles n°3 des mutants *sim/smr* évolue de même que l'aire en réponse au stress hydrique (figure A.6).

IV-1-2-1-3 Etude de l'aire des cellules épidermales des mutants

Des dessins des cellules épidermales de feuilles numéro 3 des plantes Col-0, *sim*, *smr1* et *sim.smr1.smr2* ont servi à mesurer l'aire moyenne des cellules présentée en figure III.18B. L'aire des cellules en condition de stress hydrique représente 50% (+/- 2%) de leur aire en condition contrôle chez Col-0, *sim* et *smr1* ; ces deux mutants ne semblent donc pas affectés dans l'inhibition de l'expansion cellulaire en réponse au stress hydrique. Chez *sim.smr1.smr2* l'aire en condition S représente 63% de l'aire en condition C ; ce mutant semble donc affecté dans l'inhibition de l'expansion cellulaire en réponse au stress hydrique.

Une estimation du nombre de cellules de l'épiderme inférieur des feuilles n°3 en conditions C et S est présentée en figure III.18C, elle est extrapolée en divisant l'aire moyenne des feuilles par l'aire moyenne des cellules. Le nombre de cellules diminue légèrement en réponse au stress hydrique chez la plante sauvage (6%). L'écart est un peu plus marqué chez *sim* (16%). Chez *sim.smr1.smr2*, le nombre de cellules est divisé de moitié entre C et S (48%). *smr1* présente le même nombre de cellules en condition S et C (<1%).

La croissance globale des feuilles est la résultante de la division et de l'expansion cellulaire. L'application d'un stress hydrique modéré sur des plantes infléchit la courbe de croissance des feuilles. Chez la plante sauvage *A. thaliana*, cette inhibition de croissance des feuilles, en réponse au stress hydrique, de 52%, est expliquée en majeure partie par l'inhibition de l'extension cellulaire qui atteint 49% ; l'inhibition de la division cellulaire étant de 6% joue un rôle mineur (figure III.18D). Chez *sim*, l'inhibition globale de croissance est plus forte que chez Col-0, 56%, ceci s'explique par une plus forte inhibition de la division cellulaire, l'inhibition de l'expansion cellulaire étant similaire à celle de la plante sauvage (48%). Chez *smr1*, l'inhibition de croissance est de 52 %, comme chez la plante sauvage, et elle s'explique presque entièrement par l'inhibition de l'expansion cellulaire, qui est de 52%, l'inhibition de la prolifération cellulaire étant quasi inexistante (1%). Chez *sim.smr1.smr2* l'inhibition globale de croissance atteint 73%, cette inhibition beaucoup plus forte que chez Col-0 est expliquée par le fait que la faible inhibition de l'expansion cellulaire, 37%, est surcompensée par une forte inhibition de la division cellulaire, 48%. La répartition de l'effet du stress hydrique sur la division et l'expansion cellulaire est même inversée chez le triple mutant.

IV-1-2-2 Etude du phénotype stomatal des mutants

Les dessins de cellules épidermales de feuilles numéro 3 ont également servi à évaluer l'index stomatal en condition S de même qu'en condition C (figure III.19). L'index stomatal est de 0,217 stomates par cellule en condition C et de 0,214 stomates par cellule en condition S, cet index ne semble donc pas affecté par le stress hydrique chez la plante sauvage. Il en va de même pour *smr1*. Chez *sim*, on observe une légère diminution de 0,226 à 0,217 stomates par cellule entre les conditions C et S. Chez *sim.smr1.smr2*,

présente un EI du même ordre que celui de *sim* en condition contrôle. Chez la plante sauvage, le stress hydrique a pour effet de diminuer de 36% l'index d'endoréplication. *smr2* présente le même EI que Col-0 dans les deux conditions, cette mutation ne semble avoir aucun effet sur le niveau d'endoréplication dans les feuilles. *sim* et *sim.smr1.smr2*, bien que présentant un EI plus faible que celui de Col-0 dans les deux conditions, sont affectés dans les mêmes proportions par le stress hydrique à 2% près. Chez le triple mutant, presque tous les noyaux sont en 2C ou 4C, le pic de 8C est très petit et le pic de 16 C inexistant (figure A.7). L'EI de *sim.smr1* est égal à celui de Col-0 en condition C, mais plus faible en condition S. Chez *smr1* et *smr5*, l'écart de l'EI entre C et S est plus petit que chez la plante sauvage, l'inhibition liée au stress hydrique est respectivement de 20 et 26%. SMR1 et SMR5 sembleraient jouer un rôle dans l'inhibition de l'endoréplication en réponse au stress hydrique.

IV-2- Etude de la fonction des SIM/SMR en condition de stress osmotique

L'utilisation de milieu de culture MS enrichi en solutés, tels que le sel et le mannitol, crée un stress osmotique pour les plantes qui y poussent. Ce stress est proche d'un stress hydrique puisqu'il diminue l'eau disponible pour la plante.

IV-2-1- Etude de l'expression des SIM/SMR en réponse à un stress salin

Des plantes Col-0 germent et poussent *in vitro* sur milieu MS pendant 5 jours puis elles sont transférées sur du milieu MS enrichi en NaCl 100mM (+NaCl) ou sur du milieu MS en tant que contrôle (-NaCl). Au bout de 5 jours, les parties aériennes et racinaires de 12 plantes sont collectées séparément. Le niveau d'expression des gènes *SIM*, *SMR1*, *SMR3* et *SMR5*, c'est à dire ceux de la famille *SIM/SMR* dont j'ai précédemment montré l'induction en condition de sécheresse en sol, est mesuré par RT-PCR quantitative. Les valeurs sont normalisées pour chaque gène par rapport à sa valeur sur le milieu contrôle (figure III.20A). *SMR5* est induit 6 fois dans les parties aériennes en réponse à un stress salin. *SIM*, *SMR1* et *SMR3* ne sont pas induits par le stress salin dans les parties aériennes. Aucune variation significative (>2) n'est observée dans les racines.

IV-2-2- Etude de l'effet du stress osmotique sur l'endoréplication

L'effet du stress mannitol sur le niveau d'endoréplication a été comparé chez la plante sauvage et chez les mutants *sim*, *smr1*, *smr2*, *smr5*, *sim.smr1* et *sim.smr1.smr2*. Les plantes poussent sur milieu MS pendant 8 jours, puis sont transférées sur du milieu MS enrichi en mannitol 25mM. Le niveau de ploïdie de 20000 noyaux indépendants de cellules de 6 feuilles numéro 3 a été mesuré par cytométrie de flux les jours 12, 14, 16, 18 et 20. Une moyenne de la valeur EI issue de 2 expériences représentatives est calculée. L'évolution de la valeur EI est représentée en fonction du temps chez les mutants comparés à la plante sauvage en figure III.20B. Les mutants *sim* et *smr2* présentent un index d'endoréplication proche de celui de Col-0. *sim.smr1.smr2* présente un index d'endoréplication plus faible que Col-0 et les autres mutants *sim/smr*. Enfin, *smr1* et *sim.smr1* présentent un index d'endoréplication intermédiaire entre Col-0 et le triple mutant. L'EI évolue de façon comparable lors d'un stress mannitol et en condition contrôle. L'EI est présenté pour chaque génotype en condition contrôle et en condition de stress mannitol en figure A.8. Le stress mannitol ne semble pas affecté différemment l'endoréplication chez les mutants par rapport à la plante sauvage, sauf pour le triple mutant qui présente un EI supérieur en condition de stress qu'en condition contrôle. Le comportement des mutants *sim/smr* ne diffère pas significativement de celui de la plante sauvage lors d'un stress osmotique contrairement à un stress de sécheresse en sol.

IV-3 Etude de l'expression des SIM/SMR en condition de stress hormonal

L'acide abscissique est une hormone impliquée dans les processus de réponse au stress hydrique et dans la régulation de l'ouverture des stomates notamment. Les expériences de stress hormonal sont réalisées par traitement à l'acide abscissique (ABA). L'hormone ABA exogène, en solution à 100 µM, est répandue en spray sur des plantes Col-0 de 2 semaines cultivées *in vitro*. Les racines sont collectées séparément avant et après 3, 6 et 9 heures de traitement. Les niveaux relatifs d'expression des gènes *SIM/SMR*, dont on a déjà montré qu'ils sont induits par le stress hydrique en sol, *SIM*, *SMR1*, *SMR3*, *SMR5* ainsi que *RD29B* sont mesurés par RT-PCR quantitative. Le gène *RD29B* (AT5G52300)

est un gène de réponse à l'ABA servant de contrôle interne pour l'efficacité du traitement (Uno *et al.*, 2000). Les valeurs d'expression sont normalisées pour chaque gène par rapport à la condition contrôle au temps zéro, les valeurs obtenues lors d'une expérience représentative, parmi trois expériences indépendantes, sont présentées en figure III.20C. La forte induction de *RD29B* confirme l'efficacité du stress hormonal appliqué. L'expression de *SMR3* est fortement induite en réponse au stress hydrique avec un profil d'induction proche de celui de *RD29B*. Une induction plus faible de l'expression des gènes *SIM* et *SMR1* est observée et aucune induction de *SMR5* n'est observée dans cette expérience. L'induction de l'expression des gènes *SMR3* et *SIM* sont des tendances confirmées dans les deux autres expériences indépendantes, contrairement au cas de *SMR1*. Une induction modérée, d'un facteur 3, de l'expression de *SMR5* a été observée dans les deux autres expériences indépendantes.

Plusieurs membres de la famille *SIM/SMR* semblent répondre au signal ABA.

V. Bilan comparatif des phénotypes de croissance des mutants *sim/smr* en condition normales de croissance et en condition de stress hydrique

Les mutants *sim/smr* testés n'ont pas un comportement homogène en condition contrôle de croissance et en réponse au stress hydrique. Les phénotypes de ces mutants vis-à-vis des principaux paramètres impliqués dans la croissance de la plante en condition normale et en condition de stress hydrique sont synthétisés en figure III.21. On distingue deux groupes : les plantes *smr2* et *sim.smr1* sont plus grandes que la plante sauvage tandis que les plantes *sim*, *smr1*, *smr5* et *sim.smr1.smr2* sont plus petites que Col-0. Au vu de la capacité de survie identique à celle de la plante sauvage chez le mutant *smr2* et de la stabilité du gène *SMR2* lors d'un stress hydrique, *SMR2* ne semble pas jouer un rôle important dans la réponse au stress hydrique. Le comportement du double mutant *sim.smr1* est totalement inattendu et difficilement explicable.

En condition contrôle (figure III.21.A), les mutants *sim/smr* présentent un index d'endoréplication plus faible, et *smr1* est le simple mutant qui présente le niveau d'endoréplication le plus bas. Ces résultats révèlent clairement que *SIM*, *SMR2* et

principalement SMR1 jouent un rôle important dans l'activation et le maintien de l'endoréplication au niveau de l'ensemble du tissu foliaire en condition contrôle. D'autre part, les mutants *sim/smr* possèdent des cellules plus petites que celles de Col-0. Toutefois le ratio entre les paramètres « endoréplication » et « aire des cellules » n'est pas le même entre les mutants *sim*, *smr1* et la plante sauvage. Le mutant *sim* semble plus affecté dans l'expansion cellulaire que dans l'endoréplication ; à l'opposé *smr1* semble plus affecté dans l'endoréplication que dans l'expansion cellulaire. SIM et SMR1 pourraient donc jouer un rôle dans la coordination de l'endoréplication avec le contrôle de l'expansion cellulaire. Enfin, le mutant *smr5* présente un plus grand nombre de cellules que Col-0, ce qui suggère que SMR5 jouerait un rôle important dans l'inhibition du cycle mitotique en condition de croissance normale des plantes.

Les principaux effets du stress sur les mutants *sim*, *smr1*, *smr5* et *sim.smr1.smr2* relativement à l'effet sur la plante sauvage Col-0 sont présentés en figure III.21.B. Les inhibitions de la croissance des feuilles, de l'endoréplication, de l'expansion et de la prolifération cellulaire dues au stress sont présentées chez ces mutants et chez Col-0. *sim* présente un profil d'inhibition de ces quatre paramètres en réponse au stress hydrique assez proche de celui de la plante sauvage, sauf concernant l'inhibition de la prolifération cellulaire. En revanche *smr1* et le triple mutant présentent un profil d'inhibition assez différent de celui de la plante sauvage. Concernant l'inhibition de la croissance des feuilles et de l'endoréplication, *smr5* semble répondre assez différemment de la plante sauvage au stress. Les analyses de mesure cellulaire chez ce mutant devront être complétées. Le mutant *smr1* présente un taux d'inhibition de la prolifération cellulaire quasi nul. Ce résultat suggère que SMR1 jouerait un rôle dans l'inhibition du cycle cellulaire mitotique lors du stress hydrique. *sim.smr1.smr2* à l'inverse présente une très forte inhibition de la prolifération cellulaire. Les réponses adaptatives de la croissance en réponse aux stress sont perturbées chez les mutants *sim*, *smr1*, *smr5* et *sim.smr1.smr2* au niveau de la prolifération et/ou de l'expansion cellulaire.

Enfin la capacité d'inhibition de l'aire des feuilles en réponse au stress est comparée à la capacité de survie des mutants *sim*, *smr5* et *sim.smr1.smr2* relativement au comportement de Col-0 (figure III.21.C). Les génotypes présentés sont ceux pour lesquels les capacités de survie (pourcentage de plantes survivantes, cf tableau III.1) par

rapport à la plante sauvage sont clairement quantifiées. En effet, il avait été montré que la sensibilité des plantes face au stress hydrique va dans l'ordre croissant pour les génotypes suivants : Col-0 < *sim* < *sim.smr1.smr2* < *smr5*. Il apparaît que la capacité de survie est inversement proportionnelle à l'inhibition de l'aire des feuilles lors d'un stress hydrique. L'hypersensibilité des mutants *sim/smr* au stress hydrique pourrait donc être liée à l'inhibition trop forte de la croissance des organes et de la plante dans son ensemble, en tant que somme de la division et de l'expansion cellulaire.

Ces résultats pris ensemble confirment le rôle de SIM et SMR1 dans l'inhibition du cycle mitotique et l'activation de l'endoréplication ainsi que le rôle de SMR5 dans l'inhibition du cycle mitotique en condition normale et en réponse à un stress abiotique.

IV - DISCUSSION

Les données bibliographiques au début de mes travaux de recherche permettaient d'émettre l'hypothèse initiale suivante, à savoir, positionner les SIM/SMR comme de bons candidats moléculaires de l'intégration des signaux de stress pour le contrôle de la destinée cellulaire et de la croissance. Ce travail de thèse proposait de répondre à deux objectifs principaux : approfondir les connaissances sur la régulation des CKI aux niveaux transcriptionnel et post-traductionnel, et mieux comprendre le rôle de la famille plante-spécifique SIM/SMR dans l'adaptation du développement de la plante à des conditions environnementales optimales ou de stress hydrique chez *Arabidopsis*.

I- La régulation protéique des SIM/SMR par la voie UPS

I-1 La régulation des SIM/SMR est dépendante du protéasome 26S

La protéolyse médiée par la voie de l'ubiquitine et du protéasome 26S, dite UPS (Ubiquitin Proteasome System) intervient pour éliminer de façon spécifique et rapide un grand nombre de protéines clés du cycle cellulaire. Chez les plantes, les CKI de la famille KRP sont connues pour être ciblées par plusieurs catégories de E3 ligases (Liu *et al.*, 2008 ; Ren *et al.*, 2008). Le mécanisme de dégradation de la famille de CKI plante-spécifique SIM/SMR n'étant pas connu au début de mes travaux, la possibilité que cette famille soit également ciblée par la voie de l'UPS a été testée. J'ai montré que les protéines SIM/SMR testées, à savoir SIM, SMR1 et SMR7, sont effectivement des cibles de la dégradation par la voie UPS. Il est fortement probable que les autres SMR soient également ciblées par cette voie de protéolyse spécifique. Cela pourrait être vérifié par des analyses de la demi-vie de ces protéines, similaires à celles que j'ai réalisées.

I-2 Recherche du dégron

L'enzyme E3 permet la fixation de l'ubiquitine activée sur un résidu lysine du substrat qu'elle reconnaît spécifiquement au niveau d'un motif appelé dégron. Chez *Arabidopsis*, le dégron de KRP1 est situé dans les 108 premiers acides aminés en position N-

terminale de la protéine (Zhou *et al.*, 2003). Une étude visant à identifier le motif dégron a été réalisée avec la protéine KRP2 de façon similaire à celle réalisée avec la protéine SIM. Cette étude montre que le dégron de KRP2 est situé dans les 26 premiers acides aminés en position N-terminal de la protéine. Pour valider cette séquence comme motif de dégradation, on pourrait réaliser des tests de demi-vie sur une protéine de fusion traductionnelle constituée de la GFP et de cette séquence peptidique KRP2 N1 à N26. Pour affiner la connaissance des acides aminés essentiels pour la reconnaissance par une E3 ligase, on pourrait réaliser des mutations ponctuelles de certains acides aminés ou même de tous les acides aminés par la méthode « Alanine scanning ».

En revanche, aucun dégron n'a pu être identifié chez SIM au moyen de délétion en N ou en C-terminale de la séquence de cette petite protéine. De plus, le motif dégron de KRP2 n'est pas conservé dans la séquence de la protéine SIM comme le montre l'alignement réalisé entre les deux protéines (Figure III.2A). Plusieurs hypothèses sont envisageables pour expliquer cette absence de stabilisation de la protéine SIM : SIM pourrait contenir plusieurs dégrons situés à des endroits différents de la protéine ou bien la reconnaissance de SIM par la E3 ligase pourrait nécessiter l'interaction avec une tierce protéine. De même que KRP1 et KRP6 (Ren *et al.*, 2008 et Liu *et al.*, 2008), il est possible que SIM soit la cible d'au moins deux types d'E3 et que deux motifs situés à des endroits différents de la protéine soient impliqués dans la dégradation de SIM. Chez les animaux, il a été montré que les CKI de la famille CIP/KIP, la plus proche des KRP, présentent une flexibilité moléculaire et n'ont pas de structure tertiaire prédéfinie avant leur interaction avec d'autres protéines (Galea *et al.*, 2008). Une stratégie utilisée par les E3 serait de cibler les CKI seulement lorsqu'elles sont liées à une protéine spécifique (Abbas *et al.*, 2009, Starostina *et al.*, 2012). Il est donc possible que SIM soit reconnue par une E3 uniquement lorsqu'elle est en complexe avec une autre protéine. Cette protéine tierce pourrait donc servir de protéine adaptatrice et même éventuellement faire office de dégron « en trans ».

I-3 Conception d'une version non-dégradable de SIM et SMR1

La fixation de l'ubiquitine par la E3 ligase se fait habituellement au niveau d'un résidu lysine de la protéine cible. Curieusement, la protéine SIM K>R, dont toutes les lysines ont

été mutées, est aussi dégradée par la voie du protéasome. Ce résultat est similaire à celui de la protéine p21 chez l'animal (Sheaff *et al.*, 2000). En effet, p21 est dégradée par la voie du protéasome, cette dégradation est toujours active sur une version mutante de p21 où toutes les lysines de p21 sont remplacées par des arginines. Par ailleurs, dans de rares cas, une ubiquitination a été observée sur d'autres résidus que la lysine, à savoir la cystéine, la thréonine ou la sérine (Shimizu *et al.*, 2010 ; McDowell *et al.*, 2010)

En revanche concernant SMR1, le membre de la famille SIM/SMR le plus proche de SIM, la version mutée SMR1 K>R est non dégradée comme cela a été montré chez *N.benthamiana* lors d'expression transitoire. SMR1 et SMR1 K>R ont été introduites dans le fond sauvage Col-0 et quatre sortes de lignées transgéniques ont ainsi été générées : *35S:SMR1-3HA-GFP*, *35S:SMR1K>R-3HA-GFP*, *pSMR1:SMR1-3HA-GFP* et *pSMR1:SMR1K>R-3HA-GFP*. Elles expriment la protéine SMR1 ou sa version non-dégradable SMR1 K>R fusionnées avec les étiquettes 3HA et GFP sous la dépendance du promoteur 35S ou du promoteur endogène du gène *SMR1*. Ces doubles étiquettes offriront plusieurs voies de détection possible. Le promoteur endogène utilisé est identique à celui utilisé dans les lignées rapportrices GUS, il est fonctionnel y compris dans les trichomes. Ces lignées seront des outils très intéressants pour l'étude de SMR1 chez *Arabidopsis*. En premier lieu, ces lignées seront utilisées pour confirmer la dégradation de la protéine SMR1 par la voie du protéasome chez *Arabidopsis* ainsi que l'absence de dégradation de la protéine SMR K>R.

I-4 Importance de la voie de dégradation par le protéasome

Les analyses sur la dégradation de KRP2, SIM, SMR1 et SMR7 révèlent également que la demi-vie de ces protéines est comprise entre une demi-heure et deux heures, ce qui est relativement court. Ainsi, une quantité importante de ces protéines exprimées sous le contrôle du promoteur fort 35S semble être dégradée activement par le protéasome 26S en système hétérologue chez *N. benthamiana* (KRP2, SIM et SMR1) ainsi que chez *A. thaliana* (SMR7).

Dans les lignées transgéniques OE SIM de fond sauvage Col-0, le phénotype de nanisme et de serration très sévère des plantes atteste de l'expression et de la fonctionnalité de la protéine de fusion GFP-SIM. Néanmoins il est très difficile de détecter la présence de la

protéine par Western-blot, dont il a fallu optimiser les conditions (en chargeant 100 µg d'extrait de protéine totale sur gel et en augmentant le temps d'exposition du film photosensible à 48h). Cette infime quantité de protéine de fusion GFP-SIM présentes chez ces plantes est confirmée par microscopie à épifluorescence, où seuls quelques rares noyaux émettent un signal de fluorescence. L'équipe du Pr. Larkin a observé la même rareté de cette protéine GFP-SIM dans les lignées OE SIM générées dans son laboratoire (Churchman *et al.*, 2006).

Ces données prises ensemble suggèrent fortement que les difficultés de détection de la protéine SIM sont dues à une protéolyse efficace et rapide par la voie du protéasome. Ces données soulignent l'importance de la protéolyse spécifique pour limiter l'accumulation de SIM et préserver le développement, la fertilité et même la survie de la plante.

II- La régulation du niveau d'expression des *SIM/SMR* : conditions normales de culture et stress hydrique

II-1 La protéine SIM reste faiblement exprimée en conditions normales de culture des plantes

Pour mes travaux, quatre sortes de lignées transgéniques pSIM :SIM-GFP exprimant la protéine GFP-SIM sous le contrôle de son promoteur endogène ont été générées: deux dans le fond sauvage Col-0 et deux dans le fond mutant *sim*, et pour chaque génotype au moyen de deux vecteurs différents (pMDC204 et pGWB4). La séquence de promoteur utilisée dans ces constructions est identique à celle utilisée dans les lignées rapportrices GUS pSIM:GUS. Bien que tous les éléments régulateurs ne soient pas présents dans cette séquence, comme en atteste l'absence anormale de signal GUS dans les trichomes, ce promoteur permet toutefois une expression du gène *uidA* (GUS) suffisante pour être détectée par coloration GUS au niveau de la pointe racinaire et des faisceaux vasculaires. Des analyses par Western-blot réalisées sur des extraits protéiques totaux (100µg) de ces plantes dans différents organes (plantule entière, racine, feuille de rosette, inflorescence, silique) à différents stade de développement (10 jours, 6 semaines, 3 mois) ayant subi un traitement préalable avec un inhibiteur du protéasome afin de stabiliser la protéine (MG132, 0, 3 ou 6 h de traitement) n'ont pas permis de détecter la

protéine de fusion GFP-SIM quelle que soit la lignée testée. Ce résultat atteste du faible niveau d'expression de cette protéine sous son promoteur endogène. Ceci est en accord avec les données de transcriptomique disponibles sur eFP Browser où le niveau de transcrite est très faible dans la plante sauf au niveau de la zone de division du méristème apical de racine et de la graine. Le promoteur *pSIM* est donc un promoteur faible.

De plus, un anticorps anti-SIM a été produit. Il est spécifique de la protéine SIM comme cela a pu être observé par Western-blot sur des extraits protéiques totaux de feuilles de *N. benthamiana* exprimant transitoirement la protéine SIM à des niveaux élevés. Des plantes sauvages Col-0 à différents stades de développement ont été préalablement traitées au MG132 (0, 3 ou 6 h de traitement) puis des extraits protéiques ont été réalisés à partir de différents organes. Cependant, avec ce même anticorps aucun signal de la protéine SIM endogène sur ces extraits n'a pu être détecté. Ceci vient encore confirmer le fait que l'expression du gène *SIM* et la présence de la protéine SIM restent faibles chez la plante sauvage en conditions normales de croissance.

II-2 L'expression des transcrits *SIM/SMR* est induite différenciellement en réponse à un stress hydrique

Les *SIM/SMR* ont été présentées comme de bons candidats de l'intégration des signaux de stress sur le contrôle du cycle cellulaire chez les plantes (Marrocco *et al.*, 2010, Skirycz et Inzé, 2010b).

Dans ce contexte, je me suis intéressée à l'expression des membres de la famille *SIM/SMR* lors d'un stress hydrique sévère en sol (figure III.15 et figure A.4). Ainsi, j'ai montré que l'expression de *SIM*, *SMR1*, *SMR3*, *SMR5* et *SMR8* est fortement induite dans ces conditions. *SMR12* serait également induite mais à des niveaux plus faibles. En revanche, le niveau d'expression de *SMR2* est remarquablement stable au cours d'un stress hydrique. Afin de pouvoir comparer, le profil d'expression des gènes *SIM/SMR* au cours d'un stress hydrique fort, j'ai présenté dans un tableau récapitulatif (Tableau IV.1), les valeurs maximales d'induction dans des feuilles en élévation ou matures mesurées lors de quatre expériences représentatives, ainsi que les valeurs d'induction dans les jeunes feuilles en division issues d'une unique expérience. L'ensemble de ces valeurs d'induction sont normalisées par rapport au niveau de transcription en condition

contrôle. Alors que le niveau de transcription de l'ensemble des gènes *SIM/SMR* est faible en absence de stress, on observe en présence d'un stress hydrique, des facteurs d'induction particulièrement élevés, notamment pour *SIM*, *SMR3* et *SMR5* qui culminent respectivement à des niveaux de transcrits 150, 800 et 470 fois plus élevés qu'en conditions normales de croissance. Le manque de reproductibilité dans les valeurs des facteurs d'induction pourrait être expliqué d'une part par ce faible niveau de transcription en condition contrôle, rendant la mesure d'expression relative délicate, et d'autre part, par la grande difficulté de contrôler l'ensemble des paramètres expérimentaux lors d'expériences d'assèchement en sol dans les conditions de serres. Toutefois, l'expression du gène *RD29B*, utilisé en contrôle interne de la perception du stress hydrique par la plante (Nakashima *et al.*, 2006), a confirmé l'intensification graduelle du stress hydrique appliqué aux plantes dans mes conditions expérimentales. De plus, les mêmes tendances d'induction pour l'expression des gènes *SIM*, *SMR1*, *SMR3*, *SMR5* et *SMR8* ont été obtenues dans trois conditions expérimentales différentes, ce qui souligne la fiabilité de ces données. Néanmoins, ces résultats soulignent aussi la nécessité de réaliser ce type d'expérience sur une plateforme automatisée et adaptée à l'étude du stress hydrique.

Tableau IV.1 : Récapitulatif des valeurs maximales d'induction mesurées par RT-PCR quantitative lors d'un stress hydrique sévère

Les expériences 1, 2, 3 et 4 correspondent respectivement aux résultats présentés en figure III.15A, III.15B, A.4A et A.4B.

Facteur d'induction	Feuille mature	Feuille mature	Feuille mature	Feuille mature	Feuille en division
Conditions de culture	Serre IBMP expérience 1	Serre IBMP expérience 2	Serre VIB expérience 3	SANYO expérience 4	SANYO expérience 4
SMR3	2,4	35	802	36	6
SMR5	15	217	472	45	121
SIM	40	31	47	31	150
SMR1	5,8	4,1	4,6	1,5	20,5
SMR8	3	4,1*	4	4,9	11,8

* La mesure de l'expression de ce gène n'ayant pas été réalisée au cours de l'expérience 2, cette valeur normalisée provient d'une autre expérience non présentée dans ce tableau mais ayant été menée dans les mêmes conditions que l'expérience 2.

Dans les feuilles matures, *SMR3*, *SMR5* et *SIM* sont fortement induits lors d'un stress hydrique, alors que *SMR1* et *SMR8* sont induits plus modérément : l'expression de *SIM* et de *SMR1* est induite rapidement et transitoirement (profil d'expression en pic, l'expression de *SMR3*, *SMR5* et *SMR8* augmente plus tardivement et graduellement avec l'intensification du stress. *SIM* et *SMR1* pourraient être impliqués dans la réponse rapide au stress tandis que *SMR3*, *SMR5* et *SMR8* pourraient être impliquées dans la réponse tardive au stress. Au début de l'expérience, le stress hydrique est modéré et il s'intensifie au cours du temps puisque l'expérience consiste à cesser totalement l'arrosage à partir du jour 0 jusqu'à la mort des plantes. *SIM* et *SMR1* sont induits par un stress hydrique modéré mais réprimés par un stress intense. En revanche, plus le stress est sévère, plus les gènes *SMR3*, *SMR5* et *SMR8* sont exprimés.

On constate par ailleurs que *SIM* et *SMR1* semblent plus fortement induits dans les tissus en division que dans les tissus matures, ce qui n'est pas le cas de *SMR3*, *SMR5* et *SMR8*. Ce résultat préliminaire devra toutefois être confirmé.

II-3 L'induction de l'expression de certains *SIM/SMR* en réponse au stress serait ABA-dépendante

La transduction de ces signaux de stress pourrait impliquer des phytohormones pour conduire au contrôle du cycle cellulaire.

Chez un mutant déficient dans la voie de signalisation des gibbérellines, la suppression du signal gibbérelline induit l'augmentation d'un facteur deux de l'expression de certains gènes *SIM/SMR* par rapport à la plante sauvage (Achard *et al.*, 2009). Cet ordre de grandeur est faible en comparaison aux facteurs d'induction observés en réponse à un stress hydrique. Ces données suggèrent que l'inhibition du signal gibbérelline médié par les protéines DELLA, régulateurs négatifs de la croissance des plantes (Achard *et al.*, 2008), ne saurait expliquer à elle seule l'induction des *SIM/SMR* en réponse au stress hydrique.

Une autre phytohormone, l'acide abscissique (ABA), est impliquée dans la réponse au stress hydrique. En effet, la réponse à ce stress peut se faire soit par la voie dépendante de l'ABA, soit par la voie indépendante de l'ABA. Mes travaux ont montré que l'ABA

induit clairement *SMR3* et *SIM* (figure III.20.C) et qu'une induction de *SMR1* et *SMR5* est aussi détectée mais ces résultats doivent être confirmés. *RD29B* est un gène de réponse à l'ABA, pouvant servir de contrôle interne dans la réponse associée à cette phytohormone (Nakashima *et al.*, 2006). On observe très clairement que l'expression de *SMR3* suit un profil d'induction proche de celui de *RD29B* en réponse à l'application d'ABA exogène (figure III.20.C) tout comme lors d'un stress hydrique en sol (figure A.4A). Ces résultats pris ensemble suggèrent que *SMR3* pourrait être une cible du signal ABA. De plus, la séquence du promoteur de *SMR3* ainsi que celles de *SIM*, *SMR1* et *SMR5*, mais pas de *SMR8*, contiennent des éléments *cis* ABRE (ABA Responsive Element) spécifiques de la fixation de facteurs de transcription impliqués dans la réponse à l'ABA (Harb *et al.*, 2006). Il serait très intéressant de poursuivre les investigations sur le rôle de *SMR3* dans la réponse au stress et sur son lien avec la signalisation ABA. On pourrait mesurer l'induction de *SMR3* et de tous les *SIM/SMR* dans un mutant de biosynthèse ou de signalisation de l'ABA lors d'un stress hydrique, pour déterminer si ces inductions sont réellement ABA-dépendantes.

II-4 La fonction des *SIM/SMR* dans l'adaptation au stress hydrique

Pour affiner la connaissance du rôle des *SIM/SMR* dans la réponse au stress hydrique, une analyse du phénotype des mutants *sim/smr* a été menée dans deux types de conditions : un stress progressif sévère conduisant à la mort des plantes et un stress modéré et continu conduisant à une inhibition de la croissance. Les mutants perte-de-fonction *sim*, *smr1*, *smr2*, *sim.smr1* et *sim.smr1.smr2* étaient disponibles dès le début des expérimentations. Le mutant *smr5* a été inclus dans les analyses suite aux résultats sur sa régulation transcriptionnelle. Les mutants *sim/smr* présentent des réponses hétérogènes au stress hydrique (figure III.21). Néanmoins, ces analyses ont permis de révéler que les mutants *sim*, *smr5*, et *sim.smr1.smr2* sont plus sensibles au stress hydrique que la plante sauvage. L'hypersensibilité des mutants *sim/smr* au stress hydrique pourrait être liée à l'inhibition trop forte de la croissance des organes et de la plante dans son ensemble, en tant que somme de la division et de l'extension cellulaire. Contrairement à ce que l'on pourrait prévoir en considérant l'inhibition de la croissance de la plante comme une « économie » des ressources et une limitation des pertes en eau par transpiration en raison d'une surface foliaire réduite, une forte inhibition de la

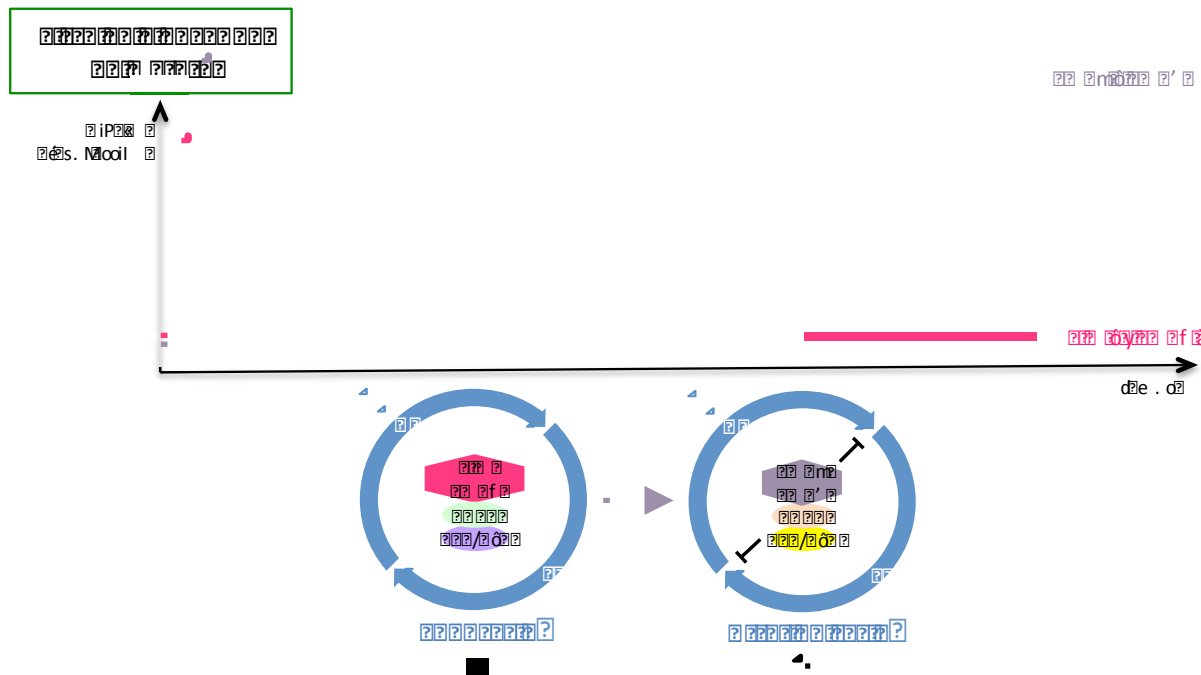
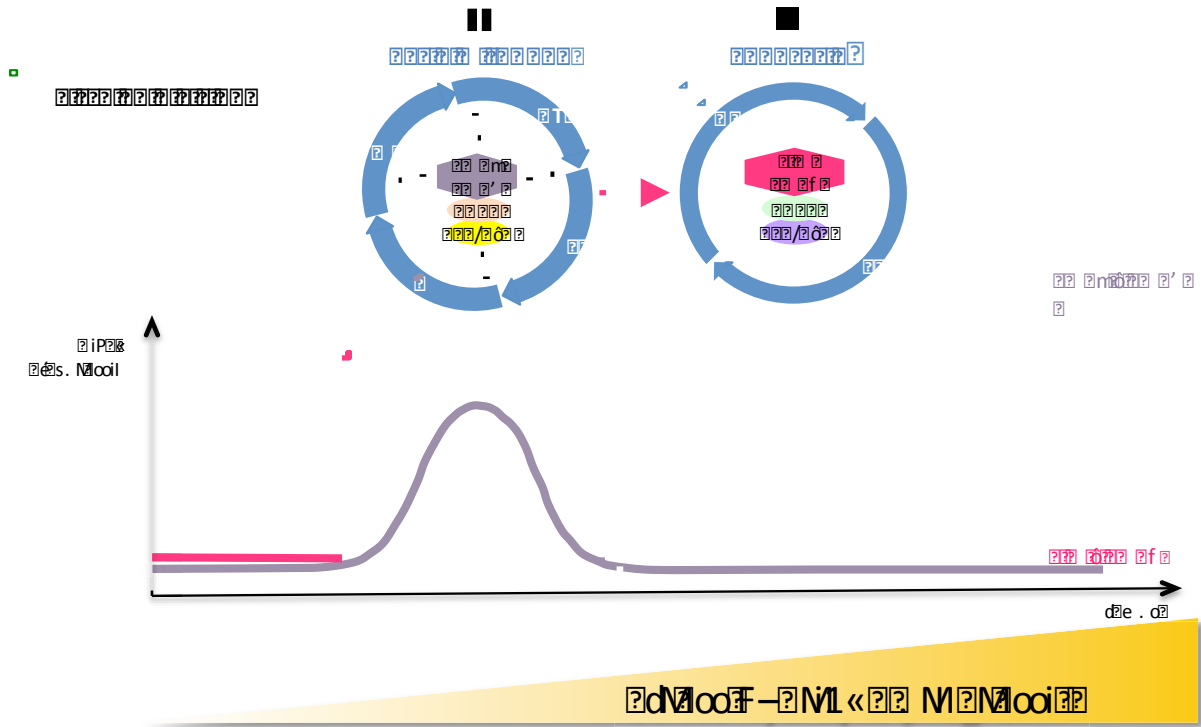
croissance semblerait, dans le cas de ces mutants, être défavorable à la survie de la plante.

En conditions de stress hydrique, chez la plante sauvage cette inhibition de la croissance ("réduction" de taille de feuilles/rosettes) est assurée en majeure partie par une inhibition de l'expansion cellulaire et en moindre partie par une inhibition de la prolifération cellulaire. Chez les mutants *sim* et *smr1*, même si les pourcentages d'inhibition par rapport à la situation chez Col-0 varient, la part majoritaire de l'inhibition de l'expansion cellulaire dans l'inhibition de la croissance est conservée. En revanche, chez le triple mutant la répartition de l'effet du stress hydrique sur la division et l'expansion cellulaire est inversée. La combinaison des mutations ciblant les gènes *SIM*, *SMR1* et *SMR2* aboutit à un résultat complexe qui n'est pas simplement la somme des mutations individuelle ou de la suppression de fonction redondante. *SIM*, *SMR1* et *SMR2* auraient donc des fonctions distinctes dans la régulation de la division et de l'expansion cellulaire.

II-5 Modèle de la régulation des *SIM/SMR* en conditions de stress hydrique

Les cinq gènes de la famille *SIM/SMR* principalement induits lors d'un stress hydrique progressif sont *SIM*, *SMR1*, *SMR3*, *SMR5* et *SRM8*. Malgré un profil d'expression du gène *SMR8* similaire à celui des gènes *SMR3* et *SMR5*, les niveaux d'induction plus faibles de *SMR8* m'ont conduite à ne pas situer ce gène dans le modèle proposé. La régulation transcriptionnelle des quatre autres gènes a été schématisé, au cours du temps lors de la mise en place d'un stress hydrique de plus en plus sévère, et en fonction de la phase de croissance d'un tissu donné : soit un tissu jeune, majoritairement composé de cellules en division, soit, un tissu en différenciation ou mature, majoritairement composé de cellules endorépliquatives ou sorties du cycle cellulaire (figure IV.1).

Ainsi, deux cinétiques d'expression de ces gènes sont à distinguer selon le tissu considéré. Dans le cas de la réponse au stress d'un tissu jeune en division, l'expression des gènes *SIM*, *SMR1*, *SMR3* et *SMR5* est induite rapidement et fortement avant de revenir tout aussi rapidement à un niveau de base. Dans ce contexte, le pic d'expression des gènes *SMR3* et *SMR5* est plus précoce que celui associé aux gènes *SIM* et *SMR1*. Notons que l'induction relative de *SIM* est plus forte que celle de *SMR1*.



Le cycle cellulaire est un processus continu qui permet à une cellule de se diviser et de produire de nouvelles cellules. Il est divisé en plusieurs phases : G1, S, G2 et M. La phase G1 est la phase de croissance, la phase S est la phase de synthèse de l'ADN, la phase G2 est la phase de croissance et de préparation à la division, et la phase M est la phase de mitose.

Le cycle cellulaire est un processus continu qui permet à une cellule de se diviser et de produire de nouvelles cellules. Il est divisé en plusieurs phases : G1, S, G2 et M. La phase G1 est la phase de croissance, la phase S est la phase de synthèse de l'ADN, la phase G2 est la phase de croissance et de préparation à la division, et la phase M est la phase de mitose.

En revanche, dans le cas de la réponse au stress d'un tissu en différenciation ou mature, le profil d'expression des gènes *SIM* et *SMR1* correspond toujours à celui d'un pic. Ce pic est dans ces tissus induit avant l'expression de *SMR3* et *SMR5*. En effet, dans ce contexte, le profil d'expression des gènes *SMR3* et *SMR5* suit une induction plus progressive et maintenue au cours du stress.

Bien qu'il s'agisse ici de données transcriptionnelles, il semble intéressant de mettre en parallèle ces cinétiques d'expression avec les données d'interactome publiées par Van Leene *et al.* (2010). En effet, *SIM* et *SMR1* d'une part, et *SMR3*, *SMR5* et *SMR8* d'autre part, assurent des fonctions distinctes dans la régulation du cycle cellulaire (Van Leene *et al.*, 2010). Les protéines *SIM* et *SMR1* qui interagissent avec les complexes CYCA-B/CDKB en phase G2 vont promouvoir la transition vers l'endoréplication, tandis que *SMR3*, *SMR5* (et *SMR8*) qui interagissent avec les complexes CYCA-D/CDKA en phase G1 vont notamment bloquer la transition G1/S (figure I.2).

Par ailleurs, les mesures de l'index d'endoréplication (IE) chez les mutants *sim*, *smr1*, *smr2*, *sim.smr1* et *sim.smr1.smr2* ont révélé que *SIM*, *SMR1* et *SMR2* ont une fonction redondante dans la promotion de l'endoréplication au niveau des feuilles, avec un rôle prépondérant de *SMR1* (figure III.9). L'ensemble de ces résultats, combinés aux données d'interactions entre les *SIM/SMR* et les complexes CYC/CDK (Van Leene *et al.*, 2010), et comparés au modèle « Pause and Stop » décrit par Skirycz *et al.* (2011b) m'ont permise d'élaborer un modèle intitulé « Pause - Stop - Shutdown ». Le modèle « Pause and Stop » décrit la régulation du cycle cellulaire en réponse à un stress osmotique dans des tissus en division comme étant la succession d'une étape « Pause » pendant laquelle le cycle cellulaire mitotique est momentanément interrompu, suivie d'une étape « Stop » où la cellule sort du cycle mitotique pour entrer dans l'endocycle et se différencier (Skirycz *et al.*, 2011b). Au niveau des tissus en division, mon modèle reprend le modèle « Pause and Stop » et en précise de nouveaux acteurs moléculaires. En effet, dans ce type de tissus, l'induction rapide de l'expression des gènes *SMR3* et *SMR5* provoque l'arrêt rapide du cycle mitotique (Pause), puis la répression de l'expression des gènes *SMR3* et *SMR5* est suivie de l'induction de l'expression des gènes *SIM* et *SMR1* provoquant la transition vers l'endoréplication (Stop). En appliquant ce modèle à la description de la régulation du cycle cellulaire lors d'un stress au niveau de tissus en différenciation ou

matures, on révèle que les gènes *SIM* et *SMR1* sont les premiers à voir leur expression augmenter de façon rapide et brève, favorisant ainsi le maintien de l'endoréplication des cellules déjà en endocycle et la transition vers l'endoréplication des cellules encore en division telles que les méristémoïdes. Puis, lorsque le stress s'intensifie au cours du temps, l'expression de *SIM* et *SMR1* est réprimée tandis que l'expression de *SMR3* et *SMR5* est induite. Ceci, en bloquant la synthèse d'ADN, pourrait favoriser la sortie du cycle cellulaire mitotique, comme de l'endocycle, cette étape d'arrêt du cycle étant appelée dans ce modèle « Shutdown ».

III- Modèle de conclusion : Rôle et régulation de la famille des SIM/SMR dans la modulation du cycle cellulaire en réponse à un stress hydrique

Mon travail de thèse a permis de confirmer l'implication de la protéolyse spécifique ubiquitine-protéasome-dépendante dans le contrôle post-traductionnel des inhibiteurs du cycle cellulaire de la famille SIM/SMR, à savoir SIM, SMR1 ET SMR7.

Ces travaux démontrent également que SIM, SMR2 et principalement SMR1 sont nécessaires à l'endoréplication des cellules au cours du développement normal des feuilles. Lors d'un stress hydrique, l'induction de l'expression de *SIM*, *SMR1*, *SMR3*, *SMR5* et *SMR8* a été mise en évidence, et le profil spatio-temporel de ces inductions a permis de distinguer deux groupes fonctionnels au sein des SIM/SMR impliqués dans la réponse à ce stress : *SIM* et *SMR1* d'une part, *SMR3*, *SMR5* et *SMR8*, d'autre part. De plus, la régulation fine des niveaux d'expression des SIM/SMR aux niveaux transcriptionnel et post-traductionnel semble résulter en des effets dose-dépendants des SIM/SMR permettant la modulation de la progression du cycle cellulaire en fonction de l'intensité et de la durée du stress subi par la plante. A ces niveaux de régulation s'ajoute celui de la signalisation hormonale, puisque l'induction de *SMR3*, entre autre, semble emprunter la voie dépendante de l'ABA lors d'un stress hydrique.

Ces éléments consolident l'hypothèse du rôle d'intégrateur des signaux externes (stress environnementaux) et internes (signalisation hormonale) conféré aux SIM/SMR dans la réponse à un stress abiotique majeur, le stress hydrique. Un nouveau modèle incluant ces résultats est présenté en figure IV.2.

IV Perspectives

IV-1 Perspectives concernant la régulation des SIM/SMR

L'ensemble de ces résultats révèle que la plante utilise deux mécanismes pour limiter la quantité de protéines SIM, à savoir le maintien d'un niveau faible d'expression des transcrits, et surtout, une dégradation massive de la protéine par la voie du protéasome 26S. Cette situation offre à la plante deux niveaux efficaces pour modifier la quantité de cette protéine SIM : induire significativement l'expression du gène *SIM* et/ou bloquer la dégradation de SIM par la voie UPS. Il a été montré que la surexpression de *SIM* sous le contrôle du promoteur 35S ne résulte qu'en une faible accumulation de protéines SIM, ceci suggère que les deux mécanismes de régulation - induction transcriptionnelle et inhibition de la protéolyse dépendante de l'UPS- doivent probablement être associés pour permettre une accumulation forte des protéines SIM/SMR.

Ainsi, la famille de CKI plante-spécifique regroupant les SIM/SMR est, tout comme la majorité des protéines clés de la régulation du cycle cellulaire (Marrocco *et al.*, 2010), régulée entre autre par la voie UPS. Dans ce contexte, l'identification des E3 ligases impliquées dans la reconnaissance de SIM et SMR1 représente un enjeu majeur pour la compréhension de la régulation du cycle cellulaire chez les plantes. De même, il serait intéressant d'identifier les éventuelles protéines adaptatrices faisant office de dégron « en trans » pour la protéine SIM. Deux E3 ligases : un complexe SCF et une E3 monomérique de type RING, ciblent spécifiquement KRP1 (Ren *et al.*, 2008). Des E3 ligases de plusieurs catégories pourraient également être capables d'ubiquitiler SMR1 pour la conduire à sa dégradation. Ainsi dans un premier temps pour identifier les interactants potentiels de SIM et SMR1 et notamment les E3 ligases ou d'autres protéines adaptatrices, on pourra exploiter les données « d'interactome » qui ont été publiées (Van Leene *et al.*, 2010). Ces interactions pourront être confirmées par d'autres approches telles que par le FLIM ou la co-immunoprecipitation. Cette dernière technique nécessite au préalable d'être en mesure de détecter les protéines SIM et SMR1 par Western-blot. Les lignées transgéniques exprimant la protéine SMR1 fusionnée avec les étiquettes 3HA et GFP sous le contrôle de son promoteur endogène ou du promoteur 35S pourraient servir à ces analyses. Concernant SIM, les problèmes de détection

pourraient être résolus au moyen de nouvelles lignées transgéniques exprimant la protéine étiquetée sous le contrôle d'un promoteur inductible. Pour confirmer l'interaction entre SIM, une protéine adaptatrice, servant de dégron en trans, et une E3 ligase, des tests de triple hybride pourront être menés.

IV-2 Perspectives concernant la fonction des SIM/SMR

La mesure de la croissance à l'échelle d'un organe ou de l'organisme donne des informations relatives à la sensibilité de la plante au stress. Les expérimentations réalisées à l'aide de la plateforme de phénotypage WIWAM seront donc reproduites afin de valider les résultats concernant la croissance des mutants en condition contrôle et en condition de stress. Ces nouvelles expérimentations seront menées à la plateforme PHENOPSIS (IBIP, Montpellier). Les mesures de croissance globale ne permettent pas toujours de conclure précisément quant à la fonction des SIM/SMR dans l'inhibition du cycle mitotique et de l'endoréplication. En effet, ces deux mécanismes participant conjointement à la croissance globale de la plante, il sera donc nécessaire d'évaluer directement les paramètres associés à la prolifération et l'expansion cellulaire dans l'étude des mutants *sim/smr*. Pour compléter les approches de phénotypages sur plateforme, des mesures de la taille et du nombre de cellules et de niveaux de ploïdie (index d'endoréplication) devront être réalisées sur l'ensemble des mutants *sim/smr*. Ceci permettra de connaître d'une part l'effet des mutations *smr2*, *smr5* et *sim.smr1*, et de valider d'autre part, les résultats chez les mutants *sim*, *smr1* et *sim.smr1.smr2*.

Tout comme SIM, le premier membre identifié de la famille des SIM/SMR, SMR1, SMR3 et SMR5 semblent être des régulateurs du cycle cellulaire en réponse au stress hydrique. Il est donc très intéressant de poursuivre l'étude de l'ensemble de ces gènes.

Toutefois, malgré la distinction de groupes fonctionnels parmi ces SIM/SMR, au sein même de ces groupes, les SIM/SMR présentent une certaine redondance de fonction, ceci semble être le cas de SMR3 et SMR5. Dans un premier temps, il faudrait générer des lignées multiples mutants, pour s'affranchir de ces redondances. Aucun mutant *smr3* n'a été répertorié à ce jour dans les collections publiques de mutants d'insertion. De

nouvelles lignées où l'expression de gène *SMR3* sera éteinte devront être générées (soit par RNAi ou par un microRNA artificiel ciblant *SMR3*) et seront croisées avec les mutants *sim/smr*. Les croisements entre les mutants disponibles a déjà été initié dans le but d'obtenir les combinaisons de mutants suivantes : *sim.smr1.smr5*, *sim.smr5*, *smr1.smr5*. Lorsque ces combinaisons de mutants et le mutant d'interférence ARN ciblant *smr3* seront disponibles, il sera intéressant de générer un multiple mutant *sim.smr1.smr3.smr5* et un double mutant *smr3.smr5*. *SMR8* pourrait également être impliqué dans la réponse au stress hydrique, il serait donc intéressant dans un deuxième temps, d'obtenir un mutant *smr8* et de le croiser avec les autres mutants, tout particulièrement avec le double mutant *smr3.smr5*.

Une fois ces mutants obtenus, leur phénotype en termes de nombre et taille des cellules devrait être particulièrement informatif quant aux rôles de *SMR3*, *SMR5* et *SMR8* dans l'inhibition du cycle cellulaire, notamment en réponse à un stress hydrique. La mesure du niveau d'endoréplication de ces différentes combinaisons de mutants et chez les simples mutants devrait nous renseigner sur les rôles distincts de chacune des *SIM/SMR* dans l'endoréplication.

Par ailleurs, nous avons observé que *SMR2* ne semble pas impliqué dans la réponse au stress abiotique testé. Ce gène pourrait en revanche être impliqué dans la réponse à d'autres stress abiotiques, ou plus encore, à un stress biotique. En effet, des données préliminaires obtenues au laboratoire montre que le niveau de transcription de *SMR2* serait induit lors d'un stress biotique : lors de l'infection de plantes sauvages Col-0 par l'agent pathogène *Botrytis cinerea*, champignon ascomycète nécrotrophe, (Williamson *et al.*, 2007), le niveau d'expression du gène *SMR2*, mesuré par RT-PCR quantitative, augmente d'un facteur quatre relativement à la condition contrôle sans infection. Sur la base de ces données préliminaires, il serait intéressant d'étudier, d'une part, la régulation transcriptionnelle associées à ce gène en réponse à un stress biotique, et d'autre part, de vérifier, par l'analyse du mutant *smr2*, le rôle de la protéine *SMR2* dans la progression du cycle cellulaire pour permettre à la plante d'adapter sa croissance lors d'une infection pathogène.

Quant aux autres *SMR* (i.e. *SMR4*, *SMR6*, *SMR7*, *SMR9*, *SMR10*, *SMR11*, *SMR12* et *SMR13*), ces protéines pourraient être spécialisées dans la réponse à d'autres types de stress biotiques ou abiotiques. Ceci permettra d'élargir le champs des investigations

concernant la famille SIM/SMR à plus long terme lorsque les rôles de SIM, SMR1, SMR3, SMR5, SMR8 et SMR2 seront bien identifiés.

Par ailleurs, les fonctions moléculaires de SIM et SMR1 devront être éclaircies. Récemment, il a été montré que KRP5 (Wen *et al.*, 2013) en plus de son rôle d'inhibiteur des complexes Cycline/CDK est capable de réguler l'expression transcriptionnelle de certains gènes impliqués dans l'organisation de la paroi cellulaire. Les auteurs ont montré que KRP5 s'associe à la chromatine et ainsi contrôle de manière coordonnée l'endoreplication et la structure de la chromatine et de ce fait l'expression de gènes impliqués dans l'élongation cellulaire. Cette découverte ouvre de nouvelles perspectives quant au mode d'action des KRP. Il serait intéressant de voir si les SIM/SMR agissent de la même manière, s'ils sont également capable d'induire l'expression de gènes impliqués dans les processus d'endoréplication ou d'élongation cellulaire. Pour vérifier, cette hypothèse des expériences de localisation fine au niveau de la chromatine ainsi que des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine seront nécessaires. Pour cela, il faut disposer de lignées exprimant les SIM/SMR étiquetées à des niveaux détectables. Les nouvelles lignées mentionnées plus haut (SIM/SMR étiquetées HA ou GFP sous un promoteur inductible) ainsi que les lignées SMR1 non dégradables, une fois caractérisées, permettront à l'avenir de réaliser ce genre d'expériences.

BIBLIOGRAPHIE

- Abbas T, Dutta A.** p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer*. 2009 Jun;9(6):400-14. doi: 10.1038/nrc2657. Review. PMID:19440234
- Achard P, Renou JP, Berthomé R, Harberd NP, Genschik P.** Plant DELLAs restrain growth and promote survival of adversity by reducing the levels of reactive oxygen species. *Curr Biol*. 2008 May 6;18(9):656-60. doi: 10.1016/j.cub.2008.04.034. PMID:18450450
- Achard P, Gusti A, Cheminant S, Alioua M, Dhondt S, Coppens F, Beemster GT, Genschik P.** Gibberellin signaling controls cell proliferation rate in Arabidopsis. *Curr Biol*. 2009 Jul 28;19(14):1188-93. Epub 2009 Jul 2. PMID:19576768
- Adachi S, Minamisawa K, Okushima Y, Inagaki S, Yoshiyama K, Kondou Y, Kaminuma E, Kawashima M, Toyoda T, Matsui M, Kurihara D, Matsunaga S, Umeda M.** Programmed induction of endoreduplication by DNA double-strand breaks in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Jun 14;108(24):10004-9. Epub 2011 May 25. PMID:21613568
- Adams PD, Sellers WR, Sharma SK, Wu AD, Nalin CM, Kaelin WG Jr.** Identification of a cyclin-cdk2 recognition motif present in substrates and p21-like cyclin-dependent kinase inhibitors. *Mol Cell Biol*. 1996 Dec;16(12):6623-33. PMID:8943316
- Aguirrezabal L, Bouchier-Combaud S, Radziejewski A, Dauzat M, Cookson SJ, Granier C.** Plasticity to soil water deficit in Arabidopsis thaliana: dissection of leaf development into underlying growth dynamic and cellular variables reveals invisible phenotypes. *Plant Cell Environ*. 2006 Dec;29(12):2216-27. PMID:17081254
- Alonso JM, Stepanova AN.** T-DNA mutagenesis in Arabidopsis. *Methods Mol Biol*. 2003;236:177-88. PMID:14501065
- Amador V, Ge S, Santamaría PG, Guardavaccaro D, Pagano M.** APC/C(Cdc20) controls the ubiquitin-mediated degradation of p21 in prometaphase. *Mol Cell*. 2007 Aug 3;27(3):462-73. PMID:17679094
- Apel K, Hirt H.** Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol*. 2004;55:373-99. Review. PMID:15377225
- Araki S, Ito M, Soyano T, Nishihama R, Machida Y.** Mitotic cyclins stimulate the activity of c-Myb-like factors for transactivation of G2/M phase-specific genes in tobacco. *J Biol Chem*. 2004 Jul 30;279(31):32979-88. Epub 2004 Jun 1. PMID:15175336
- Auld CA, Fernandes KM, Morrison RF.** Skp2-mediated p27(Kip1) degradation during S/G2 phase progression of adipocyte hyperplasia. *J Cell Physiol*. 2007 Apr;211(1):101-11. PMID:17096381
- Azimzadeh J, Traas J, Pastuglia M.** Molecular aspects of microtubule dynamics in plants. *Curr Opin Plant Biol*. 2001 Dec;4(6):513-9. Review. PMID:11641067
- Bacon M** The biochemical control of leaf expansion during drought. 1999. *Plant Growth Regul* 29: 101–112
- Baldin V, Coux O.** Death-tag. *Med Sci (Paris)*. 2004 Dec;20(12):1156-7. French. PMID:15581473
- Barow M.** Endopolyploidy in seed plants. *Bioessays*. 2006 Mar;28(3):271-81. Review. PMID:16479577

Becker TM, Haferkamp S, Dijkstra MK, Scurr LL, Frausto M, Diefenbach E, Scolyer RA, Reisman DN, Mann GJ, Kefford RF, Rizos H. The chromatin remodelling factor BRG1 is a novel binding partner of the tumor suppressor p16INK4a. *Mol Cancer*. 2009 Jan 16;8:4. doi: 10.1186/1476-4598-8-4. PMID:19149898

Beemster GT, De Veylder L, Vercruyssen S, West G, Rombaut D, Van Hummelen P, Galichet A, Grissem W, Inzé D, Vuylsteke M. Genome-wide analysis of gene expression profiles associated with cell cycle transitions in growing organs of *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 2005 Jun;138(2):734-43. Epub 2005 Apr 29. PMID:15863702

Bird DA, Buruiana MM, Zhou Y, Fowke LC, Wang H. *Arabidopsis* cyclin-dependent kinase inhibitors are nuclear-localized and show different localization patterns within the nucleoplasm. *Plant Cell Rep*. 2007 Jul;26(7):861-72. Epub 2007 Jan 26. PMID:17253089

Bisbis B, Delmas F, Joubès J, Sicard A, Hernould M, Inzé D, Mouras A, Chevalier C. Cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitors regulate the CDK-cyclin complex activities in endoreduplicating cells of developing tomato fruit. *J Biol Chem*. 2006 Mar 17;281(11):7374-83. Epub 2006 Jan 9. PMID:16407228

Boniotti MB, Gutierrez C. A cell-cycle-regulated kinase activity phosphorylates plant retinoblastoma protein and contains, in *Arabidopsis*, a CDKA/cyclin D complex. *Plant J*. 2001 Nov;28(3):341-50. PMID:11722776

Booher R, Beach D. Involvement of a type 1 protein phosphatase encoded by *bws1+* in fission yeast mitotic control. *Cell*. 1989 Jun 16;57(6):1009-16. PMID:2544292

Boyes DC, Zayed AM, Ascenzi R, McCaskill AJ, Hoffman NE, Davis KR, Görlach J. Growth stage-based phenotypic analysis of *Arabidopsis*: a model for high throughput functional genomics in plants. *Plant Cell*. 2001 Jul;13(7):1499-510. PMID:11449047

Boruc J, Van den Daele H, Hollunder J, Rombauts S, Mylle E, Hilson P, Inzé D, De Veylder L, Russinova E. Functional modules in the *Arabidopsis* core cell cycle binary protein-protein interaction network. *Plant Cell*. 2010 Apr;22(4):1264-80. doi: 10.1105/tpc.109.073635. Epub 2010 Apr 20. PMID:20407024

Boudolf V, Barrôco R, Engler Jde A, Verkest A, Beeckman T, Naudts M, Inzé D, De Veylder L. B1-type cyclin-dependent kinases are essential for the formation of stomatal complexes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*. 2004 Apr;16(4):945-55. Epub 2004 Mar 18. PMID:15031414

Boudolf V, Lammens T, Boruc J, Van Leene J, Van Den Daele H, Maes S, Van Isterdael G, Russinova E, Kondorosi E, Witters E, De Jaeger G, Inzé D, De Veylder L. CDKB1;1 forms a functional complex with CYCA2;3 to suppress endocycle onset. *Plant Physiol*. 2009 Jul;150(3):1482-93. Epub 2009 May 20. PMID:19458112

Bourdon M, Pirrello J, Cheniclet C, Coriton O, Bourge M, Brown S, Moïse A, Peypelut M, Rouyère V, Renaudin JP, Chevalier C, Frangne N. Evidence for karyoplasmic homeostasis during endoreduplication and a ploidy-dependent increase in gene transcription during tomato fruit growth. *Development*. 2012 Oct;139(20):3817-26. PMID:22991446

Bramsiepe J, Wester K, Weigl C, Roodbarkelari F, Kasili R, Larkin JC, Hülskamp M, Schnittger A. Endoreplication controls cell fate maintenance. *PLoS Genet*. 2010 Jun 24;6(6):e1000996. PMID:20585618

- Bray** EA. Genes commonly regulated by water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot*. 2004 Nov;55(407):2331-41. Epub 2004 Sep 24. Review. PMID:15448178
- Breuer** C, Sugimoto Shirasu K. Endoreduplication and Cell size Control in Plants. John Innes Centre, Norwich, UK Published online: July 2007. PMID: 21094078
- Breuer** C, Ishida T, Sugimoto K. Developmental control of endocycles and cell growth in plants. *Curr Opin Plant Biol*. 2010 Dec;13(6):654-60. Epub 2010 Nov 18. Review. PMID: 21094078
- Capron** A, Okr sz L, Genschik P. First glance at the plant APC/C, a highly conserved ubiquitin-protein ligase. *Trends Plant Sci*. 2003 Feb;8(2):83-9. Review. PMID:12597875
- Castellano** Mdel M, Boniotti MB, Caro E, Schnittger A, Gutierrez C. DNA replication licensing affects cell proliferation or endoreplication in a cell type-specific manner. *Plant Cell*. 2004 Sep;16(9):2380-93. Epub 2004 Aug 17. PMID:15316110
- Castresana** J. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Mol Biol Evol*. 2000 Apr;17(4):540-52. PMID:10742046
- Cebolla** A, Vinardell JM, Kiss E, Ol h B, Roudier F, Kondorosi A, Kondorosi E. The mitotic inhibitor ccs52 is required for endoreduplication and ploidy-dependent cell enlargement in plants. *EMBO J*. 1999 Aug 16;18(16):4476-84. PMID:10449413
- Cenciarelli** C, Chiaur DS, Guardavaccaro D, Parks W, Vidal M, Pagano M. Identification of a family of human F-box proteins. *Curr Biol*. 1999 Oct 21;9(20):1177-9. PMID:10531035
- Chevalier** C, Nafati M, Mathieu-Rivet E, Bourdon M, Frangne N, Cheniclet C, Renaudin JP, Gévaudant F, Hernould M. Elucidating the functional role of endoreduplication in tomato fruit development. *Ann Bot*. 2011 May;107(7):1159-69. doi: 10.1093/aob/mcq257. Epub 2011 Jan 3. Review. PMID:21199834
- Chevenet** F, Brun C, Ba nuls AL, Jacq B, Christen R. TreeDyn: towards dynamic graphics and annotations for analyses of trees. *BMC Bioinformatics*. 2006 Oct 10;7:439. PMID:17032440
- Churchman** ML, Brown ML, Kato N, Kirik V, Hülskamp M, Inz  D, De Veylder L, Walker JD, Zheng Z, Oppenheimer DG, Gwin T, Churchman J, Larkin JC. SIAMESE, a plant-specific cell cycle regulator, controls endoreplication onset in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*. 2006 Nov;18(11):3145-57. Epub 2006 Nov 10. PMID:17098811
- Ciechanover** A, Hod Y, Hershko A. A heat-stable polypeptide component of an ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes. 1978. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 Aug 31;425(3):565-70. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.08.025. No abstract available. PMID:22925675
- Ciechanover** A, Heller H, Elias S, Haas AL, Hershko A. ATP-dependent conjugation of reticulocyte proteins with the polypeptide required for protein degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980 Mar;77(3):1365-8. PMID:6769112
- Claeys** H, Skirycz A, Maleux K, Inz  D. DELLA signaling mediates stress-induced cell differentiation in *Arabidopsis* leaves through modulation of anaphase-promoting complex/cyclosome activity. *Plant Physiol*. 2012 Jun;159(2):739-47. Epub 2012 Apr 25. PMID: 22535421

- Cools T**, De Veylder L. DNA stress checkpoint control and plant development. *Curr Opin Plant Biol.* 2009 Feb;12(1):23-8. Epub 2008 Nov 14. Review. PMID:19010080
- Cosgrove**, Daniel J. Growth of the plant cell wall. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6, 850-861 (November 2005) doi:10.1038/nrm1746
- Creelman RA**, Zeevaart JA. Abscisic Acid accumulation in spinach leaf slices in the presence of penetrating and nonpenetrating solutes. *Plant Physiol.* 1985 Jan;77(1):25-8. PMID:16664022
- Culligan KM**, Robertson CE, Foreman J, Doerner P, Britt AB. ATR and ATM play both distinct and additive roles in response to ionizing radiation. *Plant J.* 2006 Dec;48(6):947-61. PMID:17227549
- De Clercq A**, Inzé D. Cyclin-dependent kinase inhibitors in yeast, animals, and plants: a functional comparison. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2006 Sep-Oct;41(5):293-313. Review. PMID:16911957
- Del Pozo JC**, Boniotti MB, Gutierrez C. Arabidopsis E2Fc functions in cell division and is degraded by the ubiquitin-SCF(AtSKP2) pathway in response to light. *Plant Cell.* 2002 Dec;14(12):3057-71. PMID:12468727
- Deshaies RJ**. SCF and Cullin/Ring H2-based ubiquitin ligases. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1999;15:435-67. Review. PMID:10611969
- De Veylder L**, Beeckman T, Beemster GT, Krols L, Terras F, Landrieu I, van der Schueren E, Maes S, Naudts M, Inzé D. Functional analysis of cyclin-dependent kinase inhibitors of Arabidopsis. *Plant Cell.* 2001 Jul;13(7):1653-68. PMID:11449057
- De Veylder L**, Joubès J, Inzé D. Plant cell cycle transitions. *Curr Opin Plant Biol.* 2003 Dec;6(6):536-43. Review. PMID:14611951
- De Veylder L**, Beeckman T, Inzé D. The ins and outs of the plant cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 Aug;8(8):655-65. Review. PMID:17643126
- De Veylder L**, Larkin JC, Schnittger A. Molecular control and function of endoreplication in development and physiology. *Trends Plant Sci.* 2011 Nov;16(11):624-34. Epub 2011 Sep 1. Review. PMID:21889902
- Dharmasiri N**, Dharmasiri S, Jones AM, Estelle M. Auxin action in a cell-free system. *Curr Biol.* 2003 Aug 19;13(16):1418-22. PMID:12932326
- Donnelly PM**, Bonetta D, Tsukaya H, Dengler RE, Dengler NG. Cell cycling and cell enlargement in developing leaves of Arabidopsis. *Dev Biol.* 1999 Nov 15;215(2):407-19. PMID:10545247
- Dorée M**. Triggering cell mitosis in higher eukaryotes. *Med Sci (Paris).* 2003 Mar;19(3):299-307. Review. French. PMID:12836412
- Edgar BA**, Orr-Weaver TL. Endoreplication cell cycles: more for less. *Cell.* 2001 May 4;105(3):297-306. Review. No abstract available. PMID:11348589
- Edgar RC**. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 2004 Mar 19;32(5):1792-7. Print 2004. PMID:15034147

Evans T, Rosenthal ET, Youngblom J, Distel D, Hunt T. Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell*. 1983 Jun;33(2):389-96. PMID:6134587

Farmer LM, Book AJ, Lee KH, Lin YL, Fu H, Vierstra RD. The RAD23 family provides an essential connection between the 26S proteasome and ubiquitylated proteins in Arabidopsis. *Plant Cell*. 2010 Jan;22(1):124-42. Epub 2010 Jan 19. PMID:20086187

Ferrándiz N, Caraballo JM, García-Gutierrez L, Devgan V, Rodriguez-Paredes M, Lafita MC, Bretones G, Quintanilla A, Muñoz-Alonso MJ, Blanco R, Reyes JC, Agell N, Delgado MD, Dotto GP, León J. p21 as a transcriptional co-repressor of S-phase and mitotic control genes. *PLoS One*. 2012;7(5):e37759. doi: 10.1371/journal.pone.0037759. Epub 2012 May 25. PMID:22662213

Francis D. The plant cell cycle--15 years on. *New Phytol*. 2007;174(2):261-78. Review. PMID:17388890

Früh K, Gossen M, Wang K, Bujard H, Peterson PA, Yang Y. Displacement of housekeeping proteasome subunits by MHC-encoded LMPs: a newly discovered mechanism for modulating the multicatalytic proteinase complex. *EMBO J*. 1994 Jul 15;13(14):3236-44. PMID:8045254

Fulop K, Pettkó-Szandtner A, Magyar Z, Miskolczi P, Kondorosi E, Dudits D, Bakó L. The Medicago CDKC1-CYCLINT1 kinase complex phosphorylates the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II and promotes transcription. *Plant J*. 42, 810-82026 Apr 2005. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2005.02421.

Gagne JM, Downes BP, Shiu SH, Durski AM, Vierstra RD. The F-box subunit of the SCF E3 complex is encoded by a diverse superfamily of genes in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Aug 20;99(17):11519-24. Epub 2002 Aug 8. PMID:12169662

Galea CA, Wang Y, Sivakolundu SG, Kriwacki RW. Regulation of cell division by intrinsically unstructured proteins: intrinsic flexibility, modularity, and signaling conduits. *Biochemistry*. 2008 Jul 22;47(29):7598-609. doi:10.1021/bi8006803. Review. PMID:18627125

Gautier J, Solomon MJ, Booher RN, Bazan JF, Kirschner MW. cdc25 is a specific tyrosine phosphatase that directly activates p34cdc2. *Cell*. 1991 Oct 4;67(1):197-211. PMID:1913817

Goldstein G, Scheid M, Hammerling U, Schlesinger DH, Niall HD, Boyse EA. Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1975 Jan;72(1):11-5. PMID:1078892

Gonzalez N, Vanhaeren H, Inzé D. Leaf size control: complex coordination of cell division and expansion. *Trends Plant Sci*. 2012 Jun;17(6):332-40. Epub 2012 Mar 6. PMID: 22401845

Gould KL, Moreno S, Owen DJ, Sazer S, Nurse P. Phosphorylation at Thr167 is required for Schizosaccharomyces pombe p34cdc2 function. *EMBO J*. 1991 Nov;10(11):3297-309. PMID:1655416

Granier C, Aguirrezabal L, Chenu K, Cookson SJ, Dauzat M, Hamard P, Thioux JJ, Rolland G, Bouchier-Combaud S, Lebaudy A, Muller B, Simonneau T, Tardieu F. PHENOPSIS, an automated platform for reproducible phenotyping of plant responses to soil water deficit in Arabidopsis thaliana permitted the identification of an accession with low sensitivity to soil water deficit. *New Phytol*. 2006;169(3):623-35. PMID:16411964

- Granier C**, Tardieu F. Multi-scale phenotyping of leaf expansion in response to environmental changes: the whole is more than the sum of parts. *Plant Cell Environ.* 2009 Sep;32(9):1175-84. doi: 10.1111/j.1365-3040.2009.01955.x. Epub 2009 Feb 2.
- Guindon S**, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol.* 2010 May;59(3):307-21. doi: 10.1093/sysbio/syq010. Epub 2010 Mar 29. PMID:20525638
- Gusti A**, Baumberger N, Nowack M, Pusch S, Eisler H, Potuschak T, De Veylder L, Schnittger A, Genschik P. The *Arabidopsis thaliana* F-box protein FBL17 is essential for progression through the second mitosis during pollen development. *PLoS One.* 2009;4(3):e4780. Epub 2009 Mar 11. PMID:19277118
- Gutierrez C.** The *Arabidopsis* cell division cycle. *Arabidopsis Book.* 2009;7:e0120. doi: 10.1199/tab.0120. Epub 2009 Mar 20. PMID:22303246
- Harb A**, Krishnan A, Ambavaram MM, Pereira A. Molecular and physiological analysis of drought stress in *Arabidopsis* reveals early responses leading to acclimation in plant growth. *Plant Physiol.* 2010 Nov;154(3):1254-71. doi: 10.1104/pp.110.161752. Epub 2010 Aug 31. PMID:20807999
- Hata S**, Kouchi H, Suzuka I, Ishii T. Isolation and characterization of cDNA clones for plant cyclins. *EMBO J.* 1991 Sep;10(9):2681-8. PMID:1831125
- Hauser HP**, Bardroff M, Pyrowolakis G, Jentsch S. A giant ubiquitin-conjugating enzyme related to IAP apoptosis inhibitors. *J Cell Biol.* 1998 Jun 15;141(6):1415-22. PMID:9628897
- Havens CG**, Walter JC. Docking of a specialized PIP Box onto chromatin-bound PCNA creates a degron for the ubiquitin ligase CRL4Cdt2. *Mol Cell.* 2009 Jul 10;35(1):93-104. doi: 10.1016/j.molcel.2009.05.012. PMID:19595719
- Hershko A**, Ciechanover A, Heller H, Haas AL, Rose IA. Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of protein with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1980 Apr;77(4):1783-6. PMID:6990414
- Hershko A**, Ciechanover A. The ubiquitin system for protein degradation. *Annu Rev Biochem.* 1992;61:761-807. Review. No abstract available. PMID:132323
- Hershko A**, Ganoth D, Sudakin V, Dahan A, Cohen LH, Luca FC, Ruderman JV, Eytan E. Components of a system that ligates cyclin to ubiquitin and their regulation by the protein kinase cdc2. *J Biol Chem.* 1994 Feb 18;269(7):4940-6. PMID:8106468
- Horiguchi G**, Tsukaya H. Organ size regulation in plants: insights from compensation. *Front Plant Sci.* 2011;2:24. doi: 10.3389/fpls.2011.00024. Epub 2011 Jul 1. PMID:22639585
- Hülskamp M**, Misra S, Jürgens G. Genetic dissection of trichome cell development in *Arabidopsis*. *Cell.* 1994 Feb 11;76(3):555-66. PMID:8313475
- Inzé D.** Green light for the cell cycle. *EMBO J.* 2005 Feb 23;24(4):657-62. Epub 2005 Jan 27. Review. PMID: 15678103

- Inzé D**, De Veylder L. Cell cycle regulation in plant development. *Annu Rev Genet.* 2006;40:77-105. Review. PMID:17094738
- Ito M**, Iwase M, Kodama H, Lavis P, Komamine A, Nishihama R, Machida Y, Watanabe A. A novel cis-acting element in promoters of plant B-type cyclin genes activates M phase-specific transcription. *Plant Cell.* 1998 Mar;10(3):331-41. PMID:9501108
- Ito M**, Araki S, Matsunaga S, Itoh T, Nishihama R, Machida Y, Doonan JH, Watanabe A. G2/M-phase-specific transcription during the plant cell cycle is mediated by c-Myb-like transcription factors. *Plant Cell.* 2001 Aug;13(8):1891-905. Erratum in: *Plant Cell* 2001 Sep;13(9):2159. PMID:11487700
- Ito J**, Batth TS, Petzold CJ, Redding-Johanson AM, Mukhopadhyay A, Verboom R, Meyer EH, Millar AH, Heazlewood JL. Analysis of the Arabidopsis cytosolic proteome highlights subcellular partitioning of central plant metabolism. *J Proteome Res.* 2011 Apr 1;10(4):1571-82. doi: 10.1021/pr1009433. Epub 2011 Feb 28. PMID:21166475
- Jackson PK**, Eldridge AG, Freed E, Furstenthal L, Hsu JY, Kaiser BK, Reimann JD. The lore of the RINGs: substrate recognition and catalysis by ubiquitin ligases. *Trends Cell Biol.* 2000 Oct;10(10):429-39. Review. PMID:10998601
- Jakoby MJ**, Weigl C, Pusch S, Kuijt SJ, Merkle T, Dissmeyer N, Schnittger A. Analysis of the subcellular localization, function, and proteolytic control of the Arabidopsis cyclin-dependent kinase inhibitor ICK1/KRP1. *Plant Physiol.* 2006 Aug;141(4):1293-305. Epub 2006 Jun 9. PMID:16766674
- Jakoby Marc J.**, Doris Falkenhan, Michael T. Mader, Ginger Brininstool, Elisabeth Wischnitzki, Nicole Platz, Andrew Hudson, Martin Hülskamp, John Larkin, Arp Schnittger Transcriptional Profiling of Mature Arabidopsis Trichomes Reveals That *NOECK* Encodes the MIXTA-Like Transcriptional Regulator MYB106. *Plant Physiol.* 2008 November; 148(3): 1583–1602. doi: 10.1104/pp.108.126979 PMCID: PMC2577251
- Jégu T**, Latrasse D, Delarue M, Mazubert C, Bourge M, Hudik E, Blanchet S, Soler MN, Charon C, De Veylder L, Raynaud C, Bergounioux C, Benhamed M. Multiple functions of KRP5 connect endoreduplication and cell elongation. *Plant Physiol.* 2013 Feb 20.
- Joubès J**, Chevalier C. Endoreduplication in higher plants. *Plant Mol Biol.* 2000 Aug;43(5-6):735-45. Review. PMID:11089873
- Kamura T**, Conrad MN, Yan Q, Conaway RC, Conaway JW. The Rbx1 subunit of SCF and VHL E3 ubiquitin ligase activates Rub1 modification of cullins Cdc53 and Cul2. *Genes Dev.* 1999 Nov 15;13(22):2928-33. PMID:10579999
- Karimi M.**, Inzé, D. and Depicker, A. GATEWAY vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation, *Trends in Plant Science.* 2002 ; 7(5): 193-5.
- Kasili R**, Walker JD, Simmons LA, Zhou J, De Veylder L, Larkin JC. SIAMESE cooperates with the CDH1-like protein CCS52A1 to establish endoreplication in Arabidopsis thaliana trichomes. *Genetics.* 2010 May;185(1):257-68. Epub 2010 Mar 1. PMID: 20194967
- Kim JH**, Park KC, Chung SS, Bang O, Chung CH. Deubiquitinating enzymes as cellular regulators. *J Biochem.* 2003 Jul;134(1):9-18. Review. PMID:12944365

Kim HJ, Oh SA, Brownfield L, Hong SH, Ryu H, Hwang I, Twell D, Nam HG. Control of plant germline proliferation by SCF(FBL17) degradation of cell cycle inhibitors. *Nature*. 2008 Oct 23;455(7216):1134-7. doi: 10.1038/nature07289. PMID:18948957

Kitagawa K, Skowyra D, Elledge SJ, Harper JW, Hieter P. SGT1 encodes an essential component of the yeast kinetochore assembly pathway and a novel subunit of the SCF ubiquitin ligase complex. *Mol Cell*. 1999 Jul;4(1):21-33. PMID:10445024

Koegl M, Hoppe T, Schlenker S, Ulrich HD, Mayer TU, Jentsch S. A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell*. 1999 Mar 5;96(5):635-44. PMID:10089879

Kowles RV, Phillips RL. DNA amplification patterns in maize endosperm nuclei during kernel development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985 Oct;82(20):7010-4. PMID:16593620

Kumagai A, Dunphy WG. The cdc25 protein controls tyrosine dephosphorylation of the cdc2 protein in a cell-free system. *Cell*. 1991 Mar 8;64(5):903-14. PMID:1825803

Lammens T, Boudolf V, Kheibarshekan L, Zalmas LP, Gaamouche T, Maes S, Vanstraelen M, Kondorosi E, La Thangue NB, Govaerts W, Inzé D, De Veylder L. Atypical E2F activity restrains APC/CCCS52A2 function obligatory for endocycle onset. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Sep 23;105(38):14721-6. doi: 10.1073/pnas.0806510105. Epub 2008 Sep 11. PMID:18787127

Larson-Rabin Z, Li Z, Masson PH, Day CD. FZR2/CCS52A1 expression is a determinant of endoreduplication and cell expansion in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 2009 Feb;149(2):874-84. doi: 10.1104/pp.108.132449. Epub 2008 Dec 12. PMID:19074624

Lu Z, Hunter T. Ubiquitylation and proteasomal degradation of the p21(Cip1), p27(Kip1) and p57(Kip2) CDK inhibitors. *Cell Cycle*. 2010 Jun 15;9(12):2342-52. Epub 2010 Jun 15. Review. PMID:20519948

Liu Jingjing, Yiyue Zhang, Genji Qin, Tomohiko Tsuge, Norihiro Sakaguchi, Guo Luo, Kangtai Sun, Dongqiao Shi, Shiori Aki, Nuoyan Zheng, Takashi Aoyama, Atsuhiko Oka, Weicai Yang, Masaaki Umeda, Qi Xie, Hongya Gu, Li-Jia Qu. Targeted Degradation of the Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor ICK4/KRP6 by RING-Type E3 Ligases Is Essential for Mitotic Cell Cycle Progression during *Arabidopsis* Gametogenesis. *Plant Cell*. 2008 June; 20(6): 1538–1554. doi: 10.1105/tpc.108.059741 PMID:PMC2483368

Liu Yu-Kun, Yu-Bo Liu, Mao-Ying Zhang, De-Quan Li Stomatal development and movement: The roles of MAPK signaling *Plant Signal Behav*. 2010 October; 5(10): 1176–1180. Published online 2010 October 1. doi: 10.4161/psb.5.10.12757 PMID: PMC3115344

Magyar Z, Mészáros T, Miskolczi P, Deák M, Fehér A, Brown S, Kondorosi E, Athanasiadis A, Pongor S, Bilgin M, Bakó L, Koncz C, Dudits D. Cell cycle phase specificity of putative cyclin-dependent kinase variants in synchronized alfalfa cells. *Plant Cell*. 1997 Feb;9(2):223-35. PMID:9061953

Magyar Z, Atanassova A, De Veylder L, Rombauts S, Inzé D. Characterization of two distinct DP-related genes from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett*. 2000 Dec 1;486(1):79-87. PMID:11108847

Magyar Z, De Veylder L, Atanassova A, Bakó L, Inzé D, Bögre L. The role of the *Arabidopsis* E2FB transcription factor in regulating auxin-dependent cell division. *Plant Cell*. 2005 Sep;17(9):2527-41. Epub 2005 Jul 29. PMID:16055635

Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer*. 2009 Mar;9(3):153-66. Review. PMID:19238148

Marrocco K, Bergdoll M, Achard P, Criqui MC, Genschik P. Selective proteolysis sets the tempo of the cell cycle. *Curr Opin Plant Biol*. 2010 Dec;13(6):631-9. Review. PMID:20810305

Massonnet C, Tisné S, Radziejwoski A, Vile D, De Veylder L, Dauzat M, Granier C. New insights into the control of endoreduplication: endoreduplication could be driven by organ growth in Arabidopsis leaves. *Plant Physiol*. 2011 Dec;157(4):2044-55. doi: 10.1104/pp.111.179382. Epub 2011 Oct 18. PMID: 22010109

Mathieu-Rivet E, Gévaudant F, Sicard A, Salar S, Do PT, Mouras A, Fernie AR, Gibon Y, Rothan C, Chevalier C, Hernould M. Functional analysis of the anaphase promoting complex activator CCS52A highlights the crucial role of endo-reduplication for fruit growth in tomato. *Plant J*. 2010 Jun 1;62(5):727-41. doi: 10.1111/j.1365-313X.2010.04198.x. Epub 2010 Mar 4. PMID:20230486 (a)

Mathieu-Rivet E, Gévaudant F, Cheniclet C, Hernould M, Chevalier C. The Anaphase Promoting Complex activator CCS52A, a key factor for fruit growth and endoreduplication in Tomato. *Plant Signal Behav*. 2010 Aug;5(8):985-7. Epub 2010 Aug 1. PMID:20671429 (b)

McDowell GS, Kucerova R, Philpott A. Non-canonical ubiquitylation of the proneural protein Ngn2 occurs in both *Xenopus* embryos and mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Oct 1;400(4):655-60. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.08.122. Epub 2010 Aug 31. PMID:20807509

McLean JR, Chaix D, Ohi MD, Gould KL. State of the APC/C: organization, function, and structure. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2011 Apr;46(2):118-36. doi: 10.3109/10409238.2010.541420. Epub 2011 Jan 24. Review. PMID:21261459

McQueen-Mason S, D M Durachko, D J Cosgrove. Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants. *Plant Cell*. 1992 November; 4(11): 1425–1433. PMID: PMC160229

Melaragno JE, Mehrotra B, Coleman AW. Relationship between Endopolyploidy and Cell Size in Epidermal Tissue of Arabidopsis. *Plant Cell*. 1993 Nov;5(11):1661-1668. PMID:12271050

Menges M, de Jager SM, Gruissem W, Murray JA. Global analysis of the core cell cycle regulators of Arabidopsis identifies novel genes, reveals multiple and highly specific profiles of expression and provides a coherent model for plant cell cycle control. *Plant J*. 2005 Feb;41(4):546-66. PMID:15686519

Mitchison JM, Creanor J. Further measurements of DNA synthesis and enzyme potential during cell cycle of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Exp Cell Res*. 1971 Nov;69(1):244-7. No abstract available. PMID:5124486

Mocciaro A, Rape M. Emerging regulatory mechanisms in ubiquitin-dependent cell cycle control. *J Cell Sci*. 2012 Jan 15;125(Pt 2):255-63. PMID:22357967

Morgan DO, 2007 livre « The Cell Cycle: Principles of control »

Morohashi K, Grotewold E. A systems approach reveals regulatory circuitry for Arabidopsis trichome initiation by the GL3 and GL1 selectors. *PLoS Genet.* 2009 Feb;5(2):e1000396. Epub 2009 Feb 27. PMID: 19247443

Nafati M, Frangne N, Hernould M, Chevalier C, Gévaudant F. Functional characterization of the tomato cyclin-dependent kinase inhibitor SIKRP1 domains involved in protein-protein interactions. *New Phytol.* 2010 Oct;188(1):136-49. doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03364.x. Epub 2010 Jul 7. PMID:20618916

Nakagami H, Sekine M, Murakami H, Shinmyo A. Tobacco retinoblastoma-related protein phosphorylated by a distinct cyclin-dependent kinase complex with Cdc2/cyclin D in vitro. *Plant J.* 1999 May;18(3):243-52. PMID:10377991

Nakagami H, Kawamura K, Sugisaka K, Sekine M, Shinmyo A. Phosphorylation of retinoblastoma-related protein by the cyclin D/cyclin-dependent kinase complex is activated at the G1/S-phase transition in tobacco. *Plant Cell.* 2002 Aug;14(8):1847-57. PMID:12172026

Nakashima K, Fujita Y, Katsura K, Maruyama K, Narusaka Y, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Transcriptional regulation of ABI3- and ABA-responsive genes including RD29B and RD29A in seeds, germinating embryos, and seedlings of Arabidopsis. *Plant Mol Biol.* 2006 Jan;60(1):51-68. PMID:16463099

Noir S, Bömer M, Takahashi N, Ishida T, Tjir-Li T, Balbi V, Shanahan H, Sugimoto K, Devoto A. Jasmonate controls leaf growth by repressing cell proliferation and the onset of endoreduplication while maintaining a potential stand-by mode. *Plant Physiol.* 2013 Feb 25. [Epub ahead of print] PMID:23439917

Nurse P. Cyclin Dependant Kinases and celle cycle control, Nobel Lecture, December 9, 2001DOI: 10.1023/A:1022017701871

Okushima Y, Mitina I, Quach HL, Theologis A. AUXIN RESPONSE FACTOR 2 (ARF2): a pleiotropic developmental regulator. *Plant J.* 2005 Jul;43(1):29-46. PMID:15960614

Payne C T, F Zhang, A M Lloyd. GL3 encodes a bHLH protein that regulates trichome development in arabidopsis through interaction with GL1 and TTG1. *Genetics.* 2000 November; 156(3): 1349–1362. PMCID: PMC1461316

Park JA, Ahn JW, Kim YK, Kim SJ, Kim JK, Kim WT, Pai HS. Retinoblastoma protein regulates cell proliferation, differentiation, and endoreduplication in plants. *Plant J.* 2005 Apr;42(2):153-63. PMID:15807779

Peres A, Churchman ML, Hariharan S, Himanen K, Verkest A, Vandepoele K, Magyar Z, Hatzfeld Y, Van Der Schueren E, Beemster GT, Frankard V, Larkin JC, Inzé D, De Veylder L. Novel plant-specific cyclin-dependent kinase inhibitors induced by biotic and abiotic stresses. *J Biol Chem.* 2007 Aug 31;282(35):25588-96. Epub 2007 Jun 28. PMID:17599908

Peterson Kylee M., Amanda L. Rychel, Keiko U. Torii Out of the Mouths of Plants: The Molecular Basis of the Evolution and Diversity of Stomatal Development *Plant Cell.* 2010 February; 22(2): 296–306. Published online 2010 February 23. doi: 10.1105/tpc.109.072777. PMCID:PMC2845417

Quimbaya M, Vandepoele K, Raspé E, Matthijs M, Dhondt S, Beemster GT, Berx G, De Veylder L. Identification of putative cancer genes through data integration and comparative genomics between plants and humans. *Cell Mol Life Sci*. 2012 Jun;69(12):2041-55. Epub 2012 Jan 5.

Ramírez-Parra E, Xie Q, Boniotti MB, Gutierrez C. The cloning of plant E2F, a retinoblastoma-binding protein, reveals unique and conserved features with animal G(1)/S regulators. *Nucleic Acids Res*. 1999 Sep 1;27(17):3527-33. PMID:10446243

Ramirez-Parra E, Gutierrez C. Characterization of wheat DP, a heterodimerization partner of the plant E2F transcription factor which stimulates E2F-DNA binding. *FEBS Lett*. 2000 Dec 1;486(1):73-8. PMID:11108846

Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2012

Ren H, Santner A, del Pozo JC, Murray JA, Estelle M. Degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor KRP1 is regulated by two different ubiquitin E3 ligases. *Plant J*. 2008 Mar;53(5):705-16. Epub 2007 Nov 14. PMID:18005227

Roeder AH, Chickarmane V, Cunha A, Obara B, Manjunath BS, Meyerowitz EM. Variability in the control of cell division underlies sepal epidermal patterning in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Biol*. 2010 May 11;8(5):e1000367. doi: 10.1371/journal.pbio.1000367. PMID:20485493

Rymen B, Fiorani F, Kartal F, Vandepoele K, Inzé D, Beemster GT. Cold nights impair leaf growth and cell cycle progression in maize through transcriptional changes of cell cycle genes. *Plant Physiol*. 2007 Mar;143(3):1429-38. Epub 2007 Jan 5. PMID:17208957

Roodbarkelari Farshad, Jonathan Bramsiepe, Christina Weinl, Sebastian Marquardt, Béla Novák, Marc J. Jakoby, Esther Lechner, Pascal Genschik, Arp Schnittger. CULLIN 4-RING FINGER-LIGASE plays a key role in the control of endoreplication cycles in *Arabidopsis trichomes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 August 24; 107(34): 15275–15280. Published online 2010 August 9. doi: 10.1073/pnas.1006941107 PMID:PMC2930562

Roeder Adrienne H. K., Vijay Chickarmane, Alexandre Cunha, Boguslaw Obara, B. S. Manjunath, Elliot M. Meyerowitz. Variability in the Control of Cell Division Underlies Sepal Epidermal Patterning in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Biol*. 2010 May; 8(5): e1000367. Published online 2010 May 11. doi: 10.1371/journal.pbio.1000367. PMID:PMC2867943

Russell P, Nurse P. cdc25+ functions as an inducer in the mitotic control of fission yeast. *Cell*. 1986 Apr 11;45(1):145-53. PMID:3955656

Russo AA, Jeffrey PD, Pavletich NP. Structural basis of cyclin-dependent kinase activation by phosphorylation. *Nat Struct Biol*. 1996 Aug;3(8):696-700. PMID:8756328

Ruggiero B, Koiwa H, Manabe Y, Quist TM, Inan G, Saccardo F, Joly RJ, Hasegawa PM, Bressan RA, Maggio A. Uncoupling the effects of abscisic acid on plant growth and water relations. Analysis of *sto1/nced3*, an abscisic acid-deficient but salt stress-tolerant mutant in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 2004 Oct;136(2):3134-47. Epub 2004 Oct 1. PMID:15466233

Rymen B, Fiorani F, Kartal F, Vandepoele K, Inzé D, Beemster GT. Cold nights impair leaf growth and cell cycle progression in maize through transcriptional changes of cell cycle genes. *Plant Physiol*. 2007 Mar;143(3):1429-38. Epub 2007 Jan 5. PMID:17208957

Sabelli P.A. Replicate and die for your own good: Endoreduplication and cell death in the cereal endosperm Original Research Article, *Journal of Cereal Science*, Volume 56, Issue 1, July 2012, Pages 9-20

Sanz L, Dewitte W, Forzani C, Patell F, Nieuwland J, Wen B, Quelhas P, De Jager S, Titmus C, Campilho A, Ren H, Estelle M, Wang H, Murray JA. The Arabidopsis D-type cyclin CYCD2;1 and the inhibitor ICK2/KRP2 modulate auxin-induced lateral root formation. *Plant Cell*. 2011 Feb;23(2):641-60. doi: 10.1105/tpc.110.080002. Epub 2011 Feb 25. PMID:21357490

Sasabe M, Machida Y. Regulation of organization and function of microtubules by the mitogen-activated protein kinase cascade during plant cytokinesis. *Cytoskeleton (Hoboken)*. 2012 Nov;69(11):913-8. doi: 10.1002/cm.21072. Epub 2012 Oct 1. PMID:23027702

Schmid M, Davison TS, Henz SR, Pape UJ, Demar M, Vingron M, Schölkopf B, Weigel D, Lohmann JU. A gene expression map of Arabidopsis thaliana development. *Nat Genet*. 2005 May;37(5):501-6. Epub 2005 Apr 3. PMID:15806101

Schnittger A, Schöbinger U, Stierhof YD, Hülskamp M. Ectopic B-type cyclin expression induces mitotic cycles in endoreduplicating Arabidopsis trichomes. *Curr Biol*. 2002 Mar 5;12(5):415-20. PMID:11882294. **a**

Schnittger A, Hülskamp M. Trichome morphogenesis: a cell-cycle perspective. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2002 Jun 29;357(1422):823-6. Review. PMID:12079678. **b**

Segers G, Gadisseur I, Bergounioux C, de Almeida Engler J, Jacquard A, Van Montagu M, Inzé D. The Arabidopsis cyclin-dependent kinase gene *cdc2bAt* is preferentially expressed during S and G2 phases of the cell cycle. *Plant J*. 1996 Oct;10(4):601-12. PMID:8893539

Sekine M, Ito M, Uemukai K, Maeda Y, Nakagami H, Shinmyo A. Isolation and characterization of the E2F-like gene in plants. *FEBS Lett*. 1999 Oct 22;460(1):117-22. PMID:10571072

Sheaff RJ, Singer JD, Swanger J, Smitherman M, Roberts JM, Clurman BE. Proteasomal turnover of p21Cip1 does not require p21Cip1 ubiquitination. *Mol Cell*. 2000 Feb;5(2):403-10. PMID:10882081

Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev*. 1999 Jun 15;13(12):1501-12. Review. No abstract available. PMID:10385618

Shimizu Y, Okuda-Shimizu Y, Hendershot LM. Ubiquitylation of an ERAD substrate occurs on multiple types of amino acids. *Mol Cell*. 2010 Dec 22;40(6):917-26. doi: 10.1016/j.molcel.2010.11.033. PMID:21172657

Shimotohno A, Umeda-Hara C, Bisova K, Uchimiya H, Umeda M. The Plant-Specific Kinase CDKF;1 Is Involved in Activating Phosphorylation of Cyclin-Dependent Kinase-Activating Kinases in Arabidopsis. *Plant Cell*. 2004 November; 16(11): 2954-2966. doi: 10.1105/tpc.104.025601. PMCID: PMC527191

Skiryocz A, De Bodt S, Obata T, De Clercq I, Claeys H, De Rycke R, Andriankaja M, Van Aken O, Van Breusegem F, Fernie AR, Inzé D. Developmental stage specificity and the role of mitochondrial metabolism in the response of Arabidopsis leaves to prolonged mild osmotic stress. *Plant Physiol*. 2010 Jan;152(1):226-44. doi: 10.1104/pp.109.148965. PMID:19906889 **a**

Skiryecz A, Inzé D. More from less: plant growth under limited water. *Curr Opin Biotechnol.* 2010 Apr;21(2):197-203. Epub 2010 Apr 2. PMID: 20363612 **b**

Skiryecz A, Vandenbroucke K, Clauw P, Maleux K, De Meyer B, Dhondt S, Pucci A, Gonzalez N, Hoeberichts F, Tognetti VB, Galbiati M, Tonelli C, Van Breusegem F, Vuylsteke M, Inzé D. Survival and growth of Arabidopsis plants given limited water are not equal. *Nat Biotechnol.* 2011 Mar;29(3):212-4. PMID: 21390020 **a**

Skiryecz A, Claeys H, De Bodt S, Oikawa A, Shinoda S, Andriankaja M, Maleux K, Eloy NB, Coppens F, Yoo SD, Saito K, Inzé D. Pause-and-stop: the effects of osmotic stress on cell proliferation during early leaf development in Arabidopsis and a role for ethylene signaling in cell cycle arrest. *Plant Cell.* 2011 May;23(5):1876-88. Epub 2011 May 10. PMID: 21558544 **b**

Starostina NG, Kipreos ET. Multiple degradation pathways regulate versatile CIP/KIP CDK inhibitors. *Trends Cell Biol.* 2012 Jan;22(1):33-41. Epub 2011 Dec 9. Review. PMID:22154077

Sugimoto-Shirasu K, Roberts K. "Big it up": endoreduplication and cell-size control in plants. *Curr Opin Plant Biol.* 2003 Dec;6(6):544-53. Review. PMID:14611952

Tardieu F, Davies WJ. Stomatal response to abscisic Acid is a function of current plant water status. *Plant Physiol.* 1992 Feb;98(2):540-5. PMID:16668674

Teixeira LK, Reed SI. Ubiquitin Ligases and Cell Cycle Control. *Annu Rev Biochem.* 2013 Mar 13. PMID:23495935

Thomann A, Lechner E, Hansen M, Dumbliauskas E, Parmentier Y, Kieber J, Scheres B, Genschik P. Arabidopsis CULLIN3 genes regulate primary root growth and patterning by ethylene-dependent and -independent mechanisms. *PLoS Genet.* 2009 Jan;5(1):e1000328. doi: 10.1371/journal.pgen.1000328. Epub 2009 Jan 9. PMID:19132085

Torres Acosta JA, Fowke LC, Wang H. Analyses of phylogeny, evolution, conserved sequences and genome-wide expression of the ICK/KRP family of plant CDK inhibitors. *Ann Bot.* 2011 May;107(7):1141-57. doi: 10.1093/aob/mcr034. Epub 2011 Mar 7. PMID:21385782

Toyoshima H, Hunter T. p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell.* 1994 Jul 15;78(1):67-74. PMID:8033213

Umeda M, Shimotohno A, Yamaguchi M. Control of cell division and transcription by cyclin-dependent kinase-activating kinases in plants. *Plant Cell Physiol.* 46, 1437-1442. 2005. DOI:10.1093/pcp/pci170,

Ungermannova D, Gao Y, Liu X. Ubiquitination of p27Kip1 requires physical interaction with cyclin E and probable phosphate recognition by SKP2. *J Biol Chem.* 2005 Aug 26;280(34):30301-9. Epub 2005 Jun 24. PMID:15980415

Uno Y, Furihata T, Abe H, Yoshida R, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Oct 10;97(21):11632-7. PMID:11005831

Vandepoele K, Raes J, De Veylder L, Rouzé P, Rombauts S, Inzé D. Genome-wide analysis of core cell cycle genes in Arabidopsis. *Plant Cell.* 2002 Apr;14(4):903-16. PMID:11971144

Van Leene J, Hollunder J, Eeckhout D, Persiau G, Van De Slijke E, Stals H, Van Isterdael G, Verkest A, Neiryneck S, Buffel Y, De Bodt S, Maere S, Laukens K, Pharazyn A, Ferreira PC, Eloy N, Renne C, Meyer C, Faure JD, Steinbrenner J, Beynon J, Larkin JC, Van de Peer Y, Hilson P, Kuiper M, De Veylder L, Van Onckelen H, Inzé D, Witters E, De Jaeger G. Targeted interactomics reveals a complex core cell cycle machinery in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Syst Biol*. 2010 Aug 10;6:397. PMID: 20706207

Van Leene J, Boruc J, De Jaeger G, Russinova E, De Veylder L. A kaleidoscopic view of the *Arabidopsis* core cell cycle interactome. *Trends Plant Sci*. 2011 Mar;16(3):141-50. Epub 2011 Jan 11. Review. PMID: 21233003

Verelst W, Skiryycz A, Inzé D. Abscisic acid, ethylene and gibberellic acid act at different developmental stages to instruct the adaptation of young leaves to stress. *Plant Signal Behav*. 2010 Apr;5(4):473-5. Epub 2010 Apr 3. PMID: 20383070

Verkest A, Manes CL, Vercruyssen S, Maes S, Van Der Schueren E, Beeckman T, Genschik P, Kuiper M, Inzé D, De Veylder L. The cyclin-dependent kinase inhibitor KRP2 controls the onset of the endoreduplication cycle during *Arabidopsis* leaf development through inhibition of mitotic CDKA;1 kinase complexes. *Plant Cell*. 2005 Jun;17(6):1723-36. Epub 2005 Apr 29. PMID:15863515. **a**

Verkest A, Weinel C, Inzé D, De Veylder L, Schnittger A. Switching the Cell Cycle. Kip-Related Proteins in Plant Cell Cycle Control. *Plant Physiol*. 2005 Nov;139(3):1099-106. Review. PMID:16286449. **b**

Verma R, Annan RS, Huddleston MJ, Carr SA, Reynard G, Deshaies RJ. Phosphorylation of Sic1p by G1 Cdk required for its degradation and entry into S phase. *Science*. 1997 Oct 17;278(5337):455-60. PMID:9334303

Verslues PE, Agarwal M, Katiyar-Agarwal S, Zhu J, Zhu JK. Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *Plant J*. 2006 Feb;45(4):523-39. Erratum in: *Plant J*. 2006 Jun;46(6):1092. PMID:16441347

Viallard JF, Lacombe F, Belloc F, Pellegrin JL, Reiffers J. Molecular mechanisms controlling the cell cycle: fundamental aspects and implications for oncology. *Cancer Radiother*. 2001 Apr;5(2):109-29. Review. French. PMID:11355576

Vinardell JM, Fedorova E, Cebolla A, Kevei Z, Horvath G, Kelemen Z, Tarayre S, Roudier F, Mergaert P, Kondorosi A, Kondorosi E. Endoreduplication mediated by the anaphase-promoting complex activator CCS52A is required for symbiotic cell differentiation in *Medicago truncatula* nodules. *Plant Cell*. 2003 Sep;15(9):2093-105. PMID:12953113

Vlieghe K, Boudolf V, Beemster GT, Maes S, Magyar Z, Atanassova A, de Almeida Engler J, De Groot R, Inzé D, De Veylder L. The DP-E2F-like gene DEL1 controls the endocycle in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Biol*. 2005 Jan 11;15(1):59-63. PMID:15649366

Walker JD, Oppenheimer DG, Conciencie J, Larkin JC. SIAMESE, a gene controlling the endoreduplication cell cycle in *Arabidopsis thaliana* trichomes. *Development*. 2000 Sep;127(18):3931-40. PMID: 10952891

Wang C, Liu Z. *Arabidopsis* ribonucleotide reductases are critical for cell cycle progression, DNA damage repair, and plant development. *Plant Cell*. 2006 Feb;18(2):350-65. Epub 2006 Jan 6. PMID:16399800

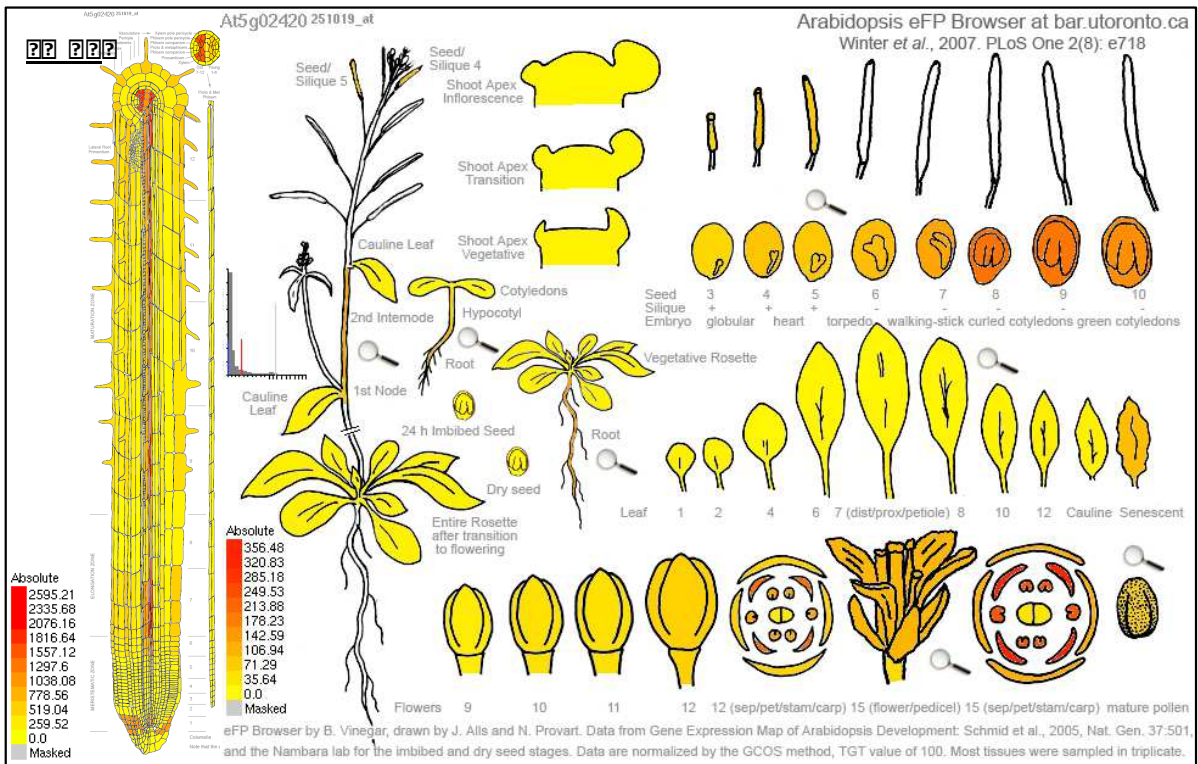
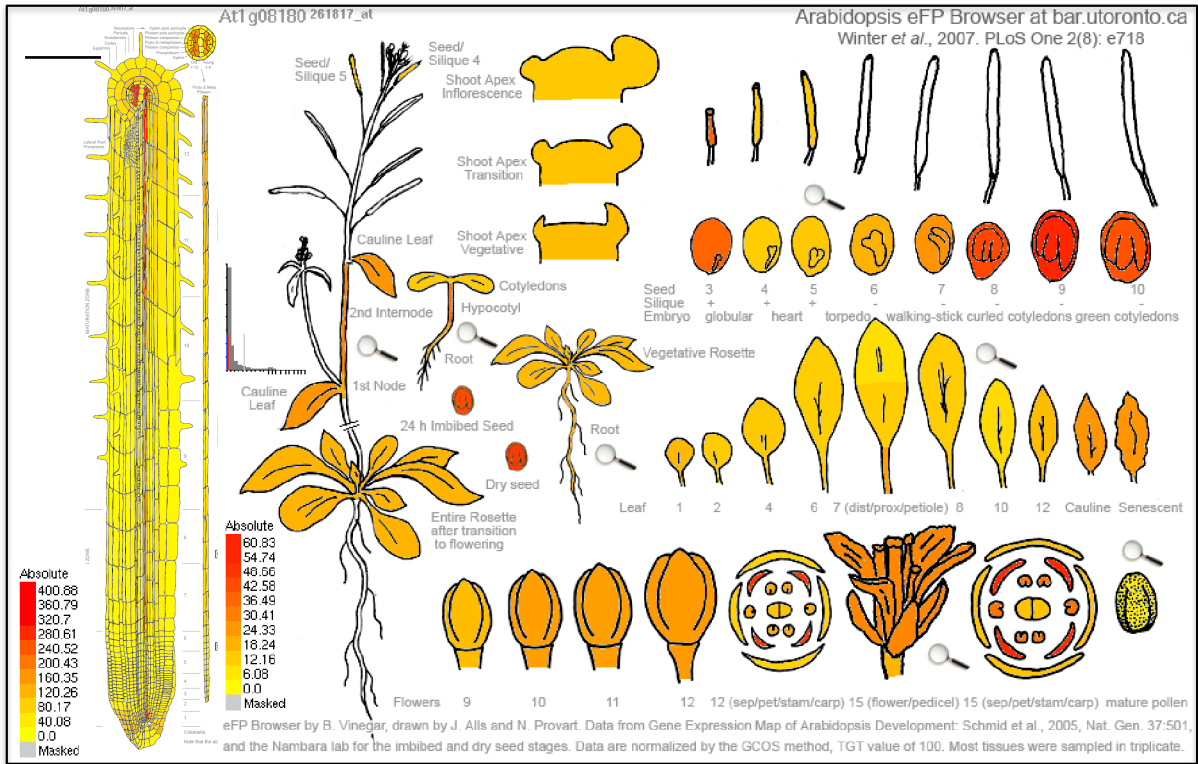
- Wang H**, Fowke LC, Crosby WL. A plant cyclin-dependent kinase inhibitor gene. *Nature*. 1997 Apr 3;386(6624):451-2. No abstract available. PMID:9087400
- Wang H**, Qi Q, Schorr P, Cutler AJ, Crosby WL, Fowke LC. ICK1, a cyclin-dependent protein kinase inhibitor from *Arabidopsis thaliana* interacts with both Cdc2a and CycD3, and its expression is induced by abscisic acid. *Plant J*. 1998 Aug;15(4):501-10.
- Wang H**, Zhou Y, Gilmer S, Whitwill S, Fowke LC. Expression of the plant cyclin-dependent kinase inhibitor ICK1 affects cell division, plant growth and morphology. *Plant J*. 2000 Dec;24(5):613-23. PMID:11123800
- Wang H**, Zhou Y, Bird DA, Fowke LC. Functions, regulation and cellular localization of plant cyclin-dependent kinase inhibitors. *J Microsc*. 2008 Aug;231(2):234-46. doi: 10.1111/j.1365-2818.2008.02039.x. Review. PMID:18778421
- Wang W**, Chen X. HUA ENHANCER3 reveals a role for a cyclin-dependent protein kinase in the specification of floral organ identity in *Arabidopsis*. *Development*. 2004 Jul;131(13):3147-56. Epub 2004 Jun 2. PMID:15175247
- Wang H**, Zhou Y, Bird DA, Fowke LC. Functions, regulation and cellular localization of plant cyclin-dependent kinase inhibitors. *J Microsc*. 2008 Aug;231(2):234-46. doi: 10.1111/j.1365-2818.2008.02039.x. Review. PMID:18778421
- Weinl C**, Marquardt S, Kuijt SJ, Nowack MK, Jakoby MJ, Hülskamp M, Schnittger A. Novel functions of plant cyclin-dependent kinase inhibitors, ICK1/KRP1, can act non-cell-autonomously and inhibit entry into mitosis. *Plant Cell*. 2005 Jun;17(6):1704-22. Epub 2005 Mar 4. PMID:15749764
- Wen B**, Nieuwland J, Murray JA. The *Arabidopsis* CDK inhibitor ICK3/KRP5 is rate limiting for primary root growth and promotes growth through cell elongation and endoreduplication. *J Exp Bot*. 2013 Mar;64(4):1-13. doi: 10.1093/jxb/ert009. PMID:23440171
- Wickliffe KE**, Williamson A, Meyer HJ, Kelly A, Rape M. K11-linked ubiquitin chains as novel regulators of cell division. *Trends Cell Biol*. 2011 Nov;21(11):656-63. doi: 10.1016/j.tcb.2011.08.008. Epub 2011 Oct 4. Review. PMID:21978762
- Wilkinson KD**, Urban MK, Haas AL. Ubiquitin is the ATP-dependent proteolysis factor I of rabbit reticulocytes. *J Biol Chem*. 1980 Aug 25;255(16):7529-32. PMID:6249803
- Williamson B**, Tudzynski B, Tudzynski P, van Kan JA. Botrytis cinerea: the cause of grey mould disease. *Mol Plant Pathol*. 2007 Sep;8(5):561-80. doi: 10.1111/j.1364-3703.2007.00417.x. PMID:20507522
- Winter D**, Vinegar B, Nahal H, Ammar R, Wilson GV, Provart NJ. An "Electronic Fluorescent Pictograph" browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS One*. 2007 Aug 8;2(8):e718. PMID:17684564
- Wohlschlegel JA**, Dwyer BT, Takeda DY, Dutta A. Mutational analysis of the Cy motif from p21 reveals sequence degeneracy and specificity for different cyclin-dependent kinases. *Mol Cell Biol*. 2001 Aug;21(15):4868-74. PMID:11438644

Yang R, Tang Q, Wang H, Zhang X, Pan G, Wang H, Tu J. Analyses of two rice (*Oryza sativa*) cyclin-dependent kinase inhibitors and effects of transgenic expression of OsilCK6 on plant growth and development. *Ann Bot.* 2011 May;107(7):1087-101. doi: 10.1093/aob/mcr057. PMID:21558459

Yoshida Y, Chiba T, Tokunaga F, Kawasaki H, Iwai K, Suzuki T, Ito Y, Matsuoka K, Yoshida M, Tanaka K, Tai T. E3 ubiquitin ligase that recognizes sugar chains. *Nature.* 2002 Jul 25;418(6896):438-42. PMID:12140560

Zhou Y, Li G, Brandizzi F, Fowke LC, Wang H. The plant cyclin-dependent kinase inhibitor ICK1 has distinct functional domains for in vivo kinase inhibition, protein instability and nuclear localization. *Plant J.* 2003 Aug;35(4):476-89. PMID:12904210

ANNEXES



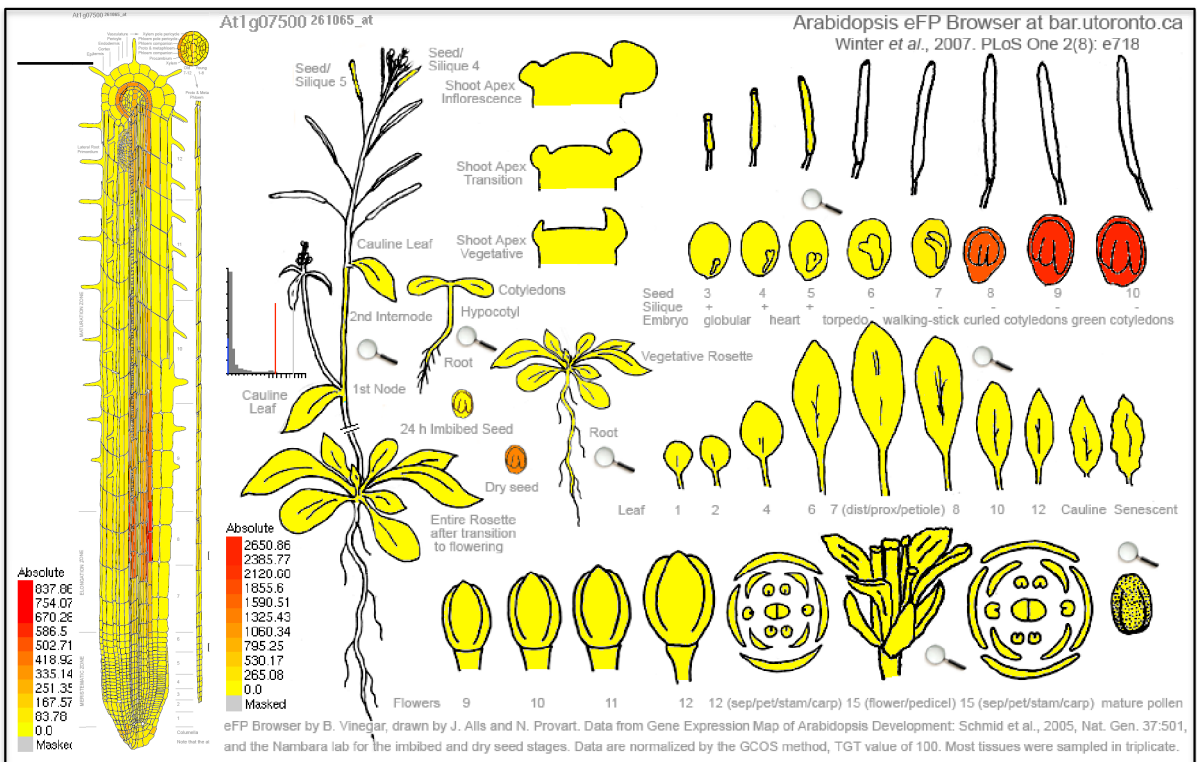
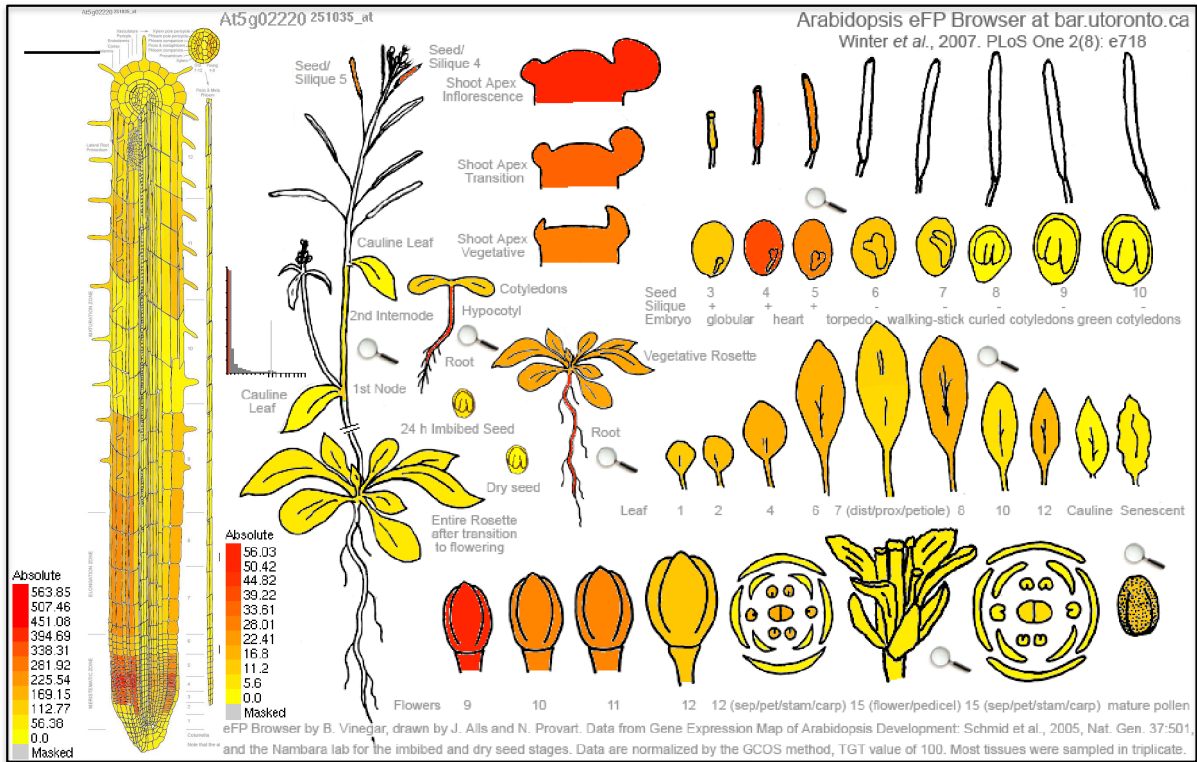
?? ? ? ? ? ? ? ? ? ? ? ? ? ? ?

?

?
?
?
?
?
?

?

.êW



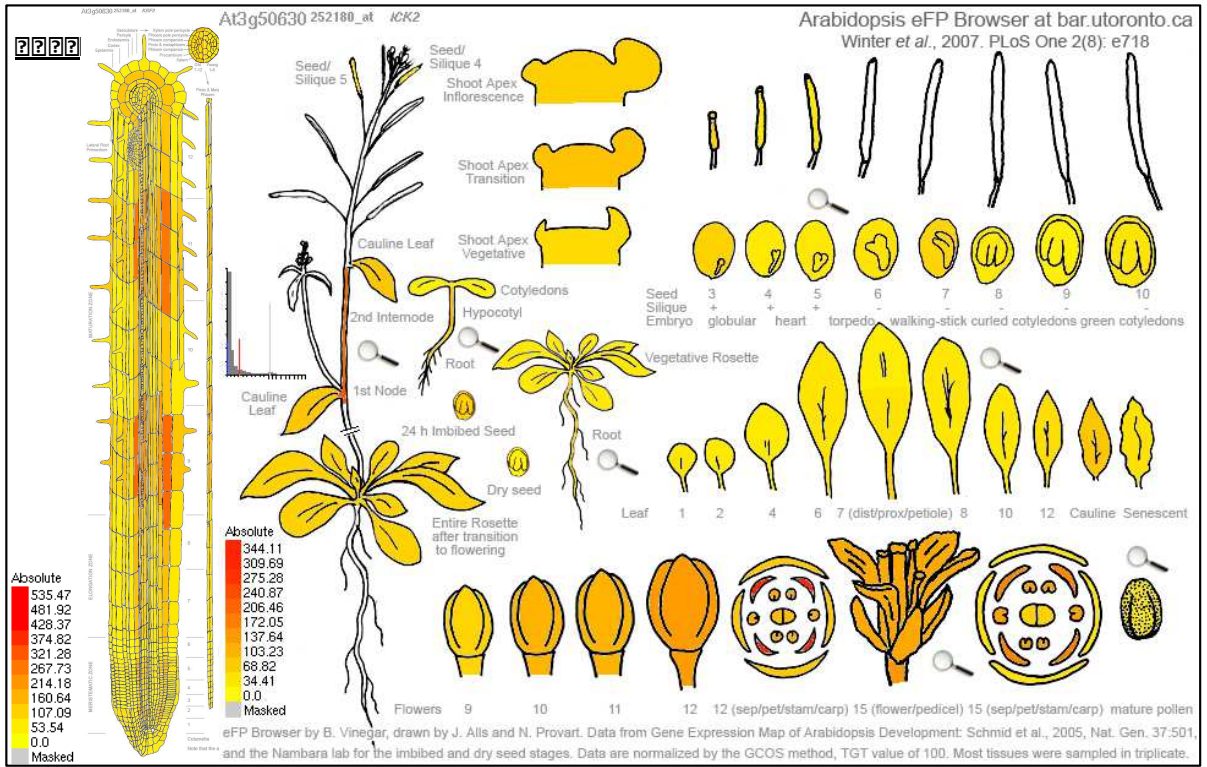
2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2

2

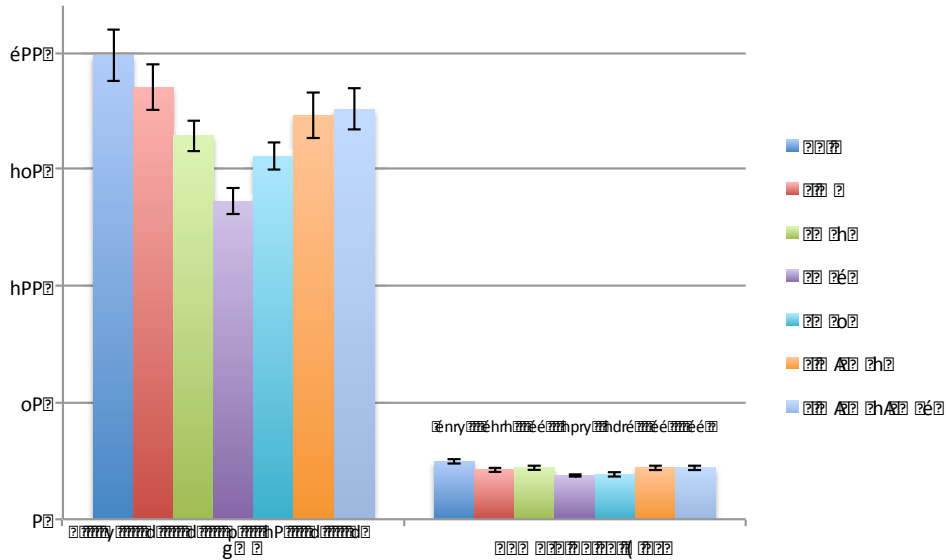
2
2
2
2
2
2

2

. êw



At1g52050 At2g18430 At2g26320 At4g12930 At5g05640 At5g06480



At1g52050 At2g18430 At2g26320 At4g12930 At5g05640 At5g06480

At1g52050 At2g18430 At2g26320 At4g12930 At5g05640 At5g06480

?

- ?
- ?
- ?
- ?
- ?

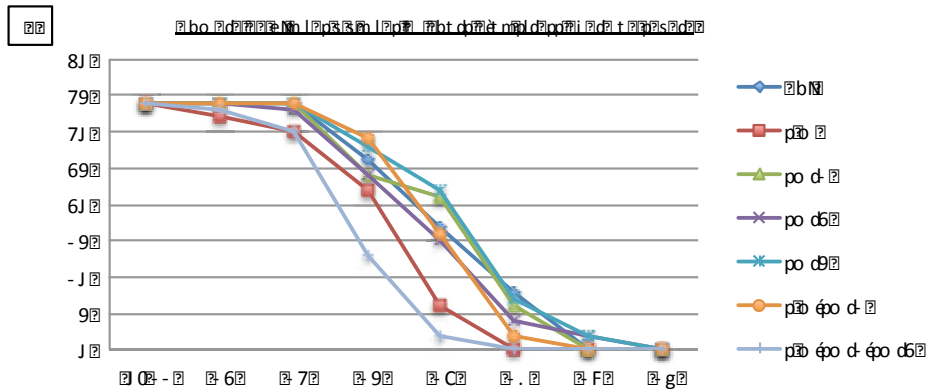
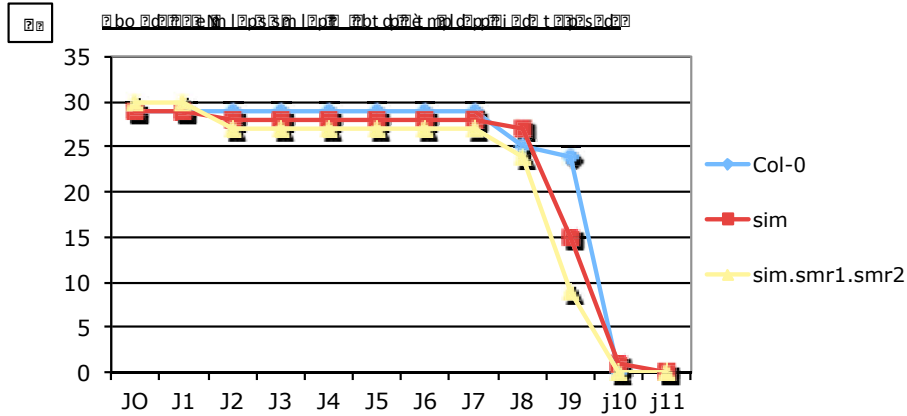


Figure 3: Text description of the experimental setup and results. The text discusses the growth and leaf number of plants under different conditions, mentioning specific genotypes and time points. It notes that all genotypes show a similar growth pattern until day J8, after which they all decline sharply, reaching near zero by day j11.

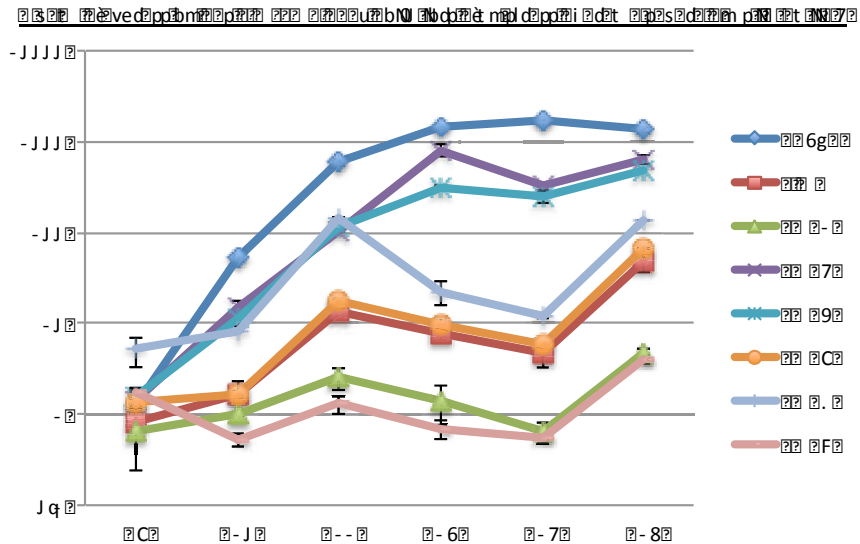


Figure 5: Text description of the experimental setup and results. The text discusses the growth and leaf number of plants under different conditions, mentioning specific genotypes and time points. It notes that all genotypes show a similar growth pattern until day J8, after which they all decline sharply, reaching near zero by day j11.

Figure 1: Accuracy of phoneme identification for the first set of stimuli.

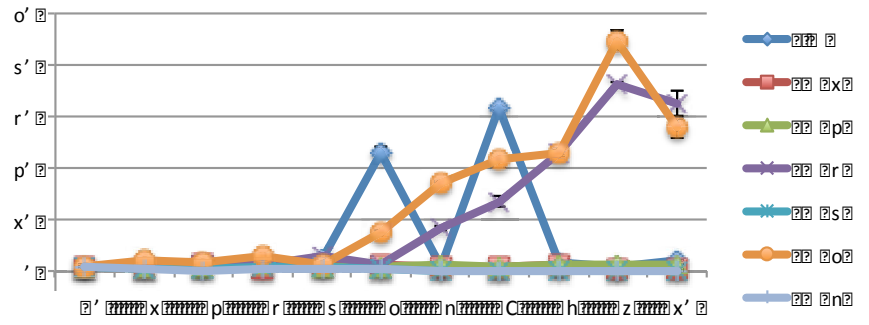


Figure 2: Accuracy of phoneme identification for the second set of stimuli.

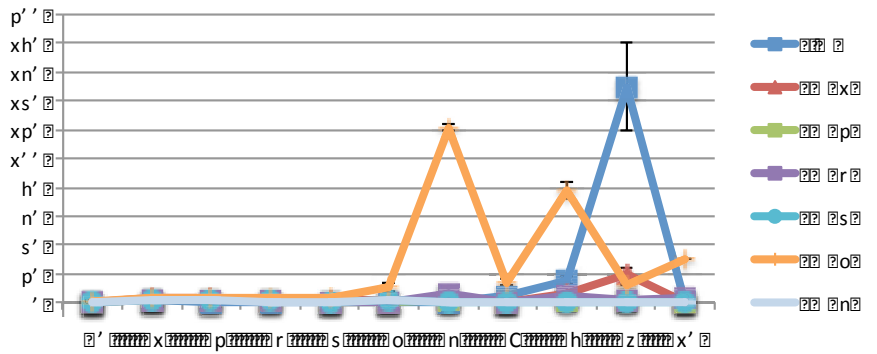


Figure 3: Accuracy of phoneme identification for the third set of stimuli.

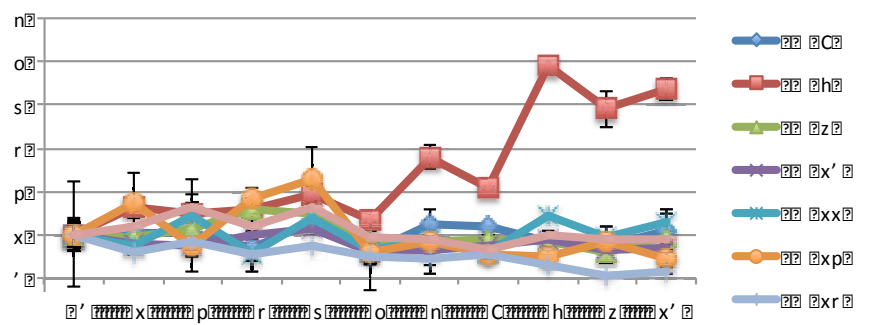


Figure 4: Accuracy of phoneme identification for the fourth set of stimuli.

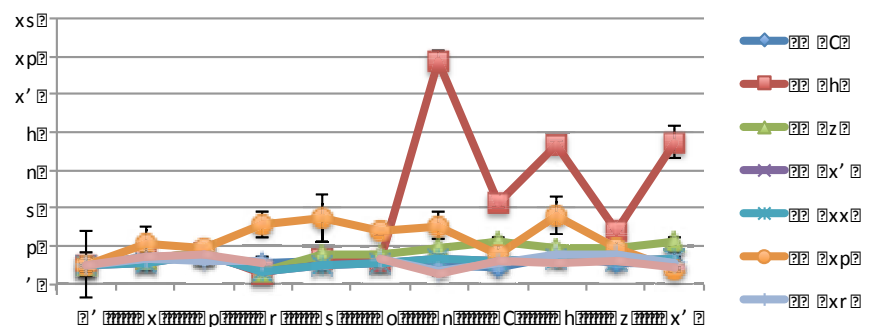


Figure 5: Accuracy of phoneme identification for the fifth set of stimuli.

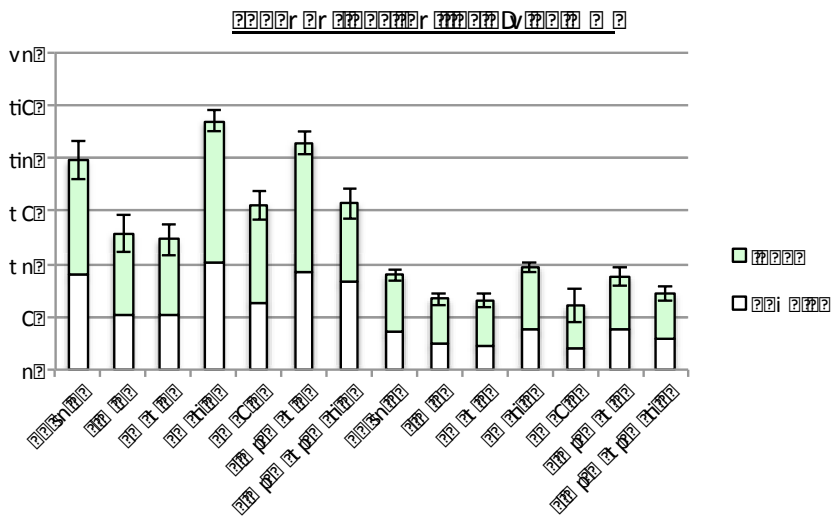
Figure 5 is a line graph showing the accuracy of phoneme identification for the fifth set of stimuli. The y-axis represents accuracy, ranging from 0% to 100%. The x-axis lists the stimuli: /xs, /xp, /x', /h, /n, /s, /p, and /'. The legend indicates the phonemes being identified: /oC/ (blue diamonds), /h/ (red squares), /z/ (green triangles), /x' (purple crosses), /xx/ (cyan asterisks), /xp/ (orange circles), and /xr/ (light blue squares). The /h/ series shows a significant peak of about 85% for the /xp stimulus. The /oC/ series shows a peak of about 75% for the /xp stimulus. The other series remain relatively low, generally below 20%.

?

- ?
- ?
- ?
- ?

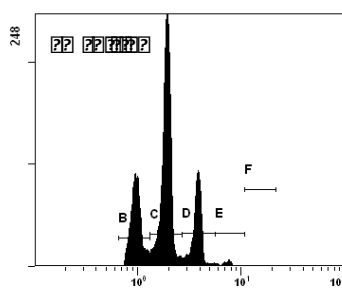
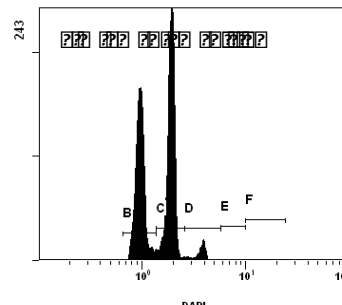
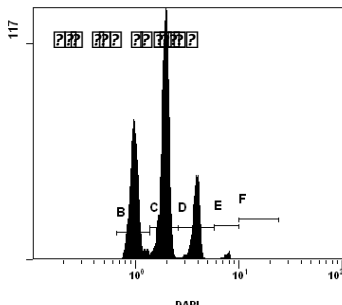
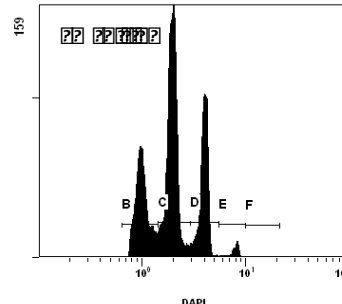
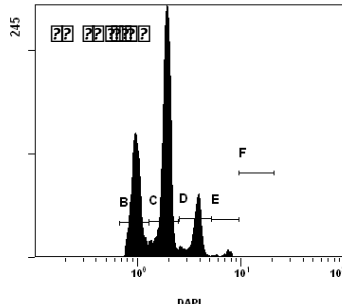
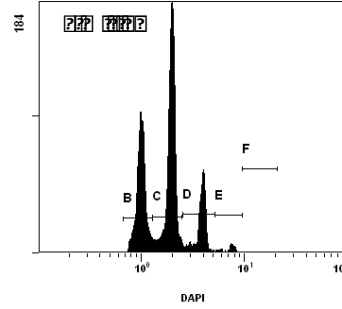
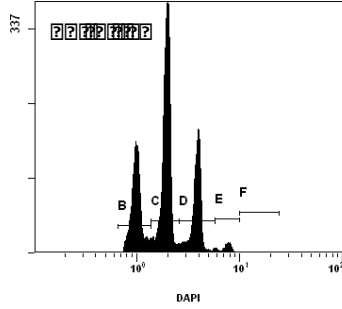


L'objectif de ce travail est d'étudier l'impact de la température sur la croissance des plantes. Les données sont présentées dans le tableau ci-dessous.

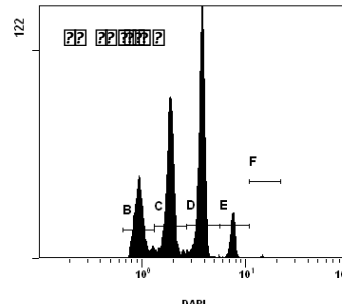
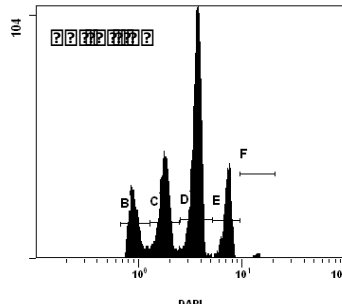


Les résultats montrent que la température a un impact significatif sur la croissance des plantes. Les plantes cultivées sous serre (à température contrôlée) ont une croissance plus rapide et plus élevée que celles cultivées à l'air libre.

22



23



22. 23. 24. 25. 26. 27. 28. 29. 30. 31. 32. 33. 34. 35. 36. 37. 38. 39. 40. 41. 42. 43. 44. 45. 46. 47. 48. 49. 50. 51. 52. 53. 54. 55. 56. 57. 58. 59. 60. 61. 62. 63. 64. 65. 66. 67. 68. 69. 70. 71. 72. 73. 74. 75. 76. 77. 78. 79. 80. 81. 82. 83. 84. 85. 86. 87. 88. 89. 90. 91. 92. 93. 94. 95. 96. 97. 98. 99. 100. 101. 102. 103. 104. 105. 106. 107. 108. 109. 110. 111. 112. 113. 114. 115. 116. 117. 118. 119. 120. 121. 122. 123. 124. 125. 126. 127. 128. 129. 130. 131. 132. 133. 134. 135. 136. 137. 138. 139. 140. 141. 142. 143. 144. 145. 146. 147. 148. 149. 150. 151. 152. 153. 154. 155. 156. 157. 158. 159. 160. 161. 162. 163. 164. 165. 166. 167. 168. 169. 170. 171. 172. 173. 174. 175. 176. 177. 178. 179. 180. 181. 182. 183. 184. 185. 186. 187. 188. 189. 190. 191. 192. 193. 194. 195. 196. 197. 198. 199. 200. 201. 202. 203. 204. 205. 206. 207. 208. 209. 210. 211. 212. 213. 214. 215. 216. 217. 218. 219. 220. 221. 222. 223. 224. 225. 226. 227. 228. 229. 230. 231. 232. 233. 234. 235. 236. 237. 238. 239. 240. 241. 242. 243. 244. 245. 246. 247. 248. 249. 250. 251. 252. 253. 254. 255. 256. 257. 258. 259. 260. 261. 262. 263. 264. 265. 266. 267. 268. 269. 270. 271. 272. 273. 274. 275. 276. 277. 278. 279. 280. 281. 282. 283. 284. 285. 286. 287. 288. 289. 290. 291. 292. 293. 294. 295. 296. 297. 298. 299. 300. 301. 302. 303. 304. 305. 306. 307. 308. 309. 310. 311. 312. 313. 314. 315. 316. 317. 318. 319. 320. 321. 322. 323. 324. 325. 326. 327. 328. 329. 330. 331. 332. 333. 334. 335. 336. 337. 338. 339. 340. 341. 342. 343. 344. 345. 346. 347. 348. 349. 350. 351. 352. 353. 354. 355. 356. 357. 358. 359. 360. 361. 362. 363. 364. 365. 366. 367. 368. 369. 370. 371. 372. 373. 374. 375. 376. 377. 378. 379. 380. 381. 382. 383. 384. 385. 386. 387. 388. 389. 390. 391. 392. 393. 394. 395. 396. 397. 398. 399. 400. 401. 402. 403. 404. 405. 406. 407. 408. 409. 410. 411. 412. 413. 414. 415. 416. 417. 418. 419. 420. 421. 422. 423. 424. 425. 426. 427. 428. 429. 430. 431. 432. 433. 434. 435. 436. 437. 438. 439. 440. 441. 442. 443. 444. 445. 446. 447. 448. 449. 450. 451. 452. 453. 454. 455. 456. 457. 458. 459. 460. 461. 462. 463. 464. 465. 466. 467. 468. 469. 470. 471. 472. 473. 474. 475. 476. 477. 478. 479. 480. 481. 482. 483. 484. 485. 486. 487. 488. 489. 490. 491. 492. 493. 494. 495. 496. 497. 498. 499. 500.

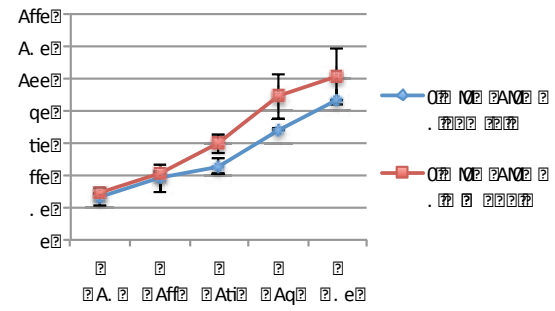
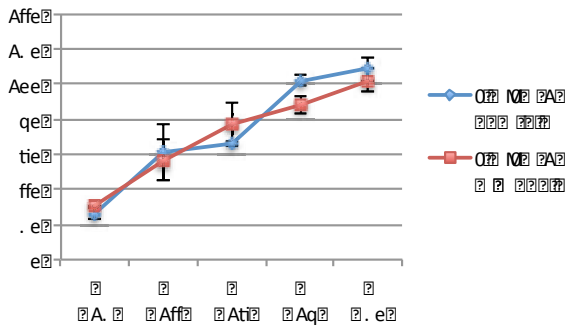
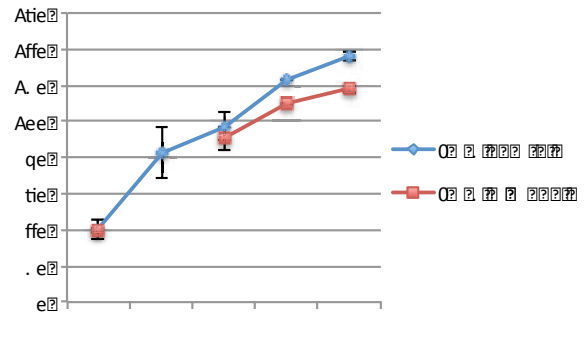
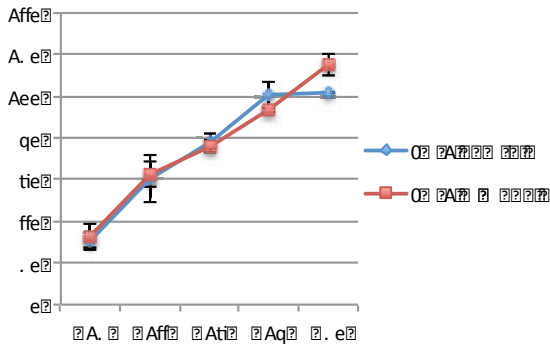
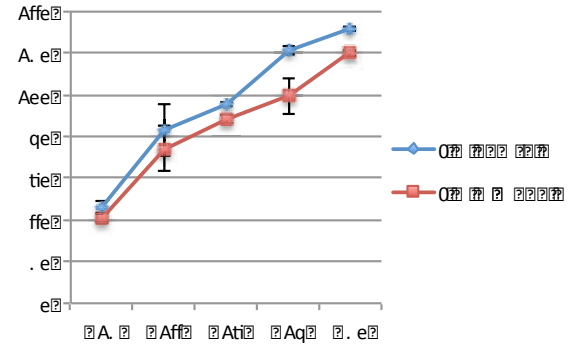
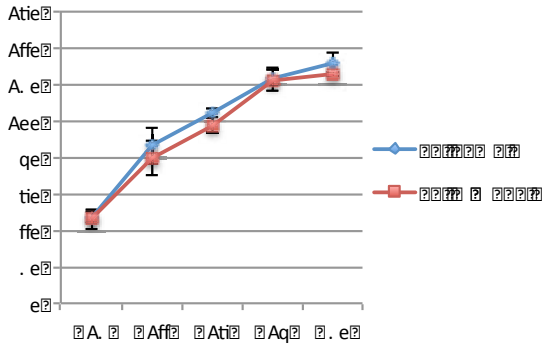
2
2

2

. ' Z

?

?



[Large block of distorted text]

?

?

?

?

?

?

?

?

?

?

?

RESUME

Chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, les protéines SIAMESE-RELATED (SIM/SMR1 à 13) forment une famille plante-spécifique d'« Inhibiteurs de Kinase Cycline-dépendante » (CKI), homologues des Kip-Related Proteins (KRP1 à 7). Les protéines SIM/SMR interagissent avec des complexes de type CYCD/CDKA et CYCA-B/CDKB au cours du cycle cellulaire. SIM et SMR1 sont des régulateurs positifs de la transition du cycle mitotique vers l'endoréplication. L'expression des gènes *SIM/SMR* est induite en réponse à des stress biotiques et abiotiques. Lors d'un stress abiotique, les plantes adaptent leur croissance en modulant la division et l'expansion cellulaire. L'un des stress abiotiques majeurs auquel les plantes doivent faire face est la sécheresse.

De même que leurs homologues les KRP, les SIM/SMR pourraient être dégradées par la voie de la protéolyse spécifique dépendante de l'ubiquitine et du protéasome (UPS). Les SIM/SMR sont considérés comme de bons candidats pour relier l'activité du cycle cellulaire aux stimuli de l'environnement. La régulation des SIM/SMR et leur rôle dans le contrôle du cycle cellulaire lors d'un stress abiotique ont donc été étudiés.

Ce travail de recherche a démontré l'implication de la voie de protéolyse UPS dans le contrôle post-traductionnel de tous membres de la famille SIM/SMR testés (SIM, SMR1 et SMR7). Il démontre également que SIM, SMR2 et surtout SMR1 sont nécessaires à l'endoréplication des cellules foliaires. Lors d'un stress hydrique, l'expression des gènes *SIM, SMR1, SMR3 et SMR5* est induite. Le profil spatio-temporel de ces inductions a mis en évidence deux groupes de gènes, *SIM-SMR1* et *SMR3-SMR5*, avec des fonctions distinctes. De plus, les mutants perte-de-fonction *sim, smr5 et sim.smr1.smr2* sont hypersensibles au stress de sécheresse. Ces résultats ont permis d'établir un modèle du rôle et de la régulation des SIM/SMR dans le contrôle du cycle cellulaire mitotique et de l'endoréplication en réponse à un stress hydrique.

Mots clés : *Arabidopsis*, CKI, SIM/SMR, Cycle cellulaire, Endoréplication, UPS, Stress hydrique

SUMMARY

In the model plant *Arabidopsis thaliana*, the SIAMESE-RELATED proteins (SIM/SMR1 to 13) are a plant-specific family of Cyclin-dependent Kinase Inhibitors (CKIs), homologous to the Kip-Related Proteins (KRP1 to 7). The SIM/SMRs proteins interact with CYCD/CDKA and CYCA-B/CDKB complexes during the cell cycle. SIM and SMR1 are positive regulators of the switch from mitotic cycle to endoreplication. The expression of *SIM/SMRs* genes is induced in response to biotic and abiotic stress. During abiotic stress, plants adapt their growth by modulating cell division and cell expansion. One of the major abiotic stress that plants face is the drought stress.

Like their homologous KRPs, the SIM/SMRs could be degraded through the specific proteolysis depending on ubiquitin and proteasome (UPS). The SIM/SMRs proteins are considered as good candidates to link cell cycle activity with environmental stimuli. So, the regulation of SIM/SMRs and their role in cell cycle control during abiotic stress have been investigated.

This research work has shown the involvement of the UPS proteolysis in the post-translational control of all the tested members of the SIM/SMR family (SIM, SMR1, SMR7). It also shows that SIM, SMR2 and mostly SMR1 are required in endoreplication of leaf cells. During drought stress, the expression of *SIM, SMR1, SMR3 and SMR5* genes is induced. The spacio-temporal pattern of those inductions revealed two groups of genes, *SIM-SMR1* and *SMR3-SMR5*, with distinct functions. In addition, the *sim, smr5 and sim.smr1.smr2* loss-of-function mutants tested are hypersensitive to drought stress. These results were used to develop a model of the role and regulation of SIM/SMRs in the control of mitotic cell cycle and endoreplication in response to drought stress.

Keys words: *Arabidopsis*, CKI, SIM/SMRs, Cell cycle, Endoreplication, UPS, Drought stress

Etude du rôle des inhibiteurs de kinases-cycline-dépendantes (CKI) de la classe des SIM/SMR en réponse au stress abiotique chez *Arabidopsis thaliana*

Résumé

Chez *Arabidopsis thaliana*, les protéines SIAMESE-RELATED (SIM/SMR1 à 13) forment une famille plante-spécifique d'Inhibiteurs de Kinase Cycline-dépendante (CKI), homologue des Kip-Related Proteins. SIM et SMR1 sont des régulateurs positifs de la transition du cycle mitotique vers l'endoréplication. L'expression des gènes *SIM/SMR* est induite en réponse à des stress. L'un des stress abiotiques majeurs pour les plantes est la sécheresse.

Les SIM/SMR pourraient être dégradées par la voie de la protéolyse spécifique de l'Ubiquitin Proteasome System (UPS). Les SIM/SMR sont de bons candidats pour relier l'activité du cycle cellulaire aux stimuli de l'environnement.

Ce travail a démontré l'implication de la protéolyse UPS dans le contrôle post-traductionnel de tous membres SIM/SMR testés. Il démontre que SIM, SMR2 et SMR1 sont nécessaires à l'endoréplication des cellules foliaires. Lors d'un stress hydrique, l'expression des gènes *SIM*, *SMR1*, *SMR3* et *SMR5* est induite. Le profil spatio-temporel de ces inductions a mis en évidence deux groupes de gènes avec des fonctions distinctes. Les mutants *sim*, *smr5* et *sim.smr1.smr2* sont hypersensibles au stress hydrique.

Arabidopsis, Endoréplication, CKI, Endoreduplication, SIM/SMR, UPS, Cycle cellulaire, Stress hydrique

Résumé en anglais

In *Arabidopsis thaliana*, the SIAMESE-RELATED proteins (SIM/SMR1 to 13) are a plant-specific family of Cyclin-dependent Kinase Inhibitors (CKIs), homologous to the Kip-Related Proteins. SIM and SMR1 are positive regulators of the switch from mitotic cycle to endoreplication. The expression of *SIM/SMRs* genes is induced in response to stress. One of the major abiotic stress for plants is the drought stress.

The SIM/SMRs could be degraded through the specific proteolysis of Ubiquitin Proteasome System (UPS). The SIM/SMRs proteins are good candidates to link cell cycle activity with environmental stimuli.

This research work has shown the involvement of the UPS proteolysis in the post-translational control of all the tested members of the SIM/SMR family. It also shows that SIM, SMR2 and mostly SMR1 are required in endoreplication of leaf cells. During drought stress, the expression of *SIM*, *SMR1*, *SMR3* and *SMR5* genes is induced. The spatio-temporal pattern of those inductions revealed two groups of genes with distinct functions. In addition, the *sim*, *smr5* and *sim.smr1.smr2* loss-of-function mutants tested are hypersensitive to drought stress.

Arabidopsis, Endoreplication, CKI, Endoreduplication, SIM/SMR, UPS, Cell Cycle, Drought Stress