HAL
open science

Nouvelle stratégie d'amélioration de la productivité végétale en condition de stress environnemental via un meilleur contrôle du cycle cellulaire

Habib Mahjoubi

To cite this version:

Habib Mahjoubi. Nouvelle stratégie d'amélioration de la productivité végétale en condition de stress environnemental via un meilleur contrôle du cycle cellulaire. Génétique des plantes. Université de Strasbourg; Université de Sfax (Tunisie), 2018. Français. NNT : 2018STRAJ059 . tel-02272352

HAL Id: tel-02272352

https://theses.hal.science/tel-02272352v1

Submitted on 27 Aug 2019

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

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

THÈSE

En vue de l'obtention du grade de Docteur de

L'UNIVERSITE DE STRASBOURG & L'UNIVERSITE DE SFAX

Spécialité : Biologie des Organismes : développement et physiologie

& Science Biologique

Nouvelle Stratégie d'Amélioration de la productivité végétale en conditions de stress environnemental via un meilleur contrôle du cycle cellulaire

---

Présentée et Soutenue par : Habib MAHJOUBI

Le 20 Septembre 2018

Membres de Jurys

Président	: Pr. ALI-FAOUZI GARGOURI	: Professeur, CBS, SFAX-TUNISIE
Rapporteur	: Dr. CECILE RAYNAUD	: DR2 CNRS, IPS2, Giff-sur-Yvette, FRANCE
Rapporteur	: Dr. KARIM BEN HAMED	: Dr, CBBC, TUNISIE
Examinateur	: Dr. ANDREA HEMMERLIN	: CR1 CNRS, IBMP, STRASBOURG-FRANCE
Examinateur	: Dr. Chantal EBEL	: Dr, ISBS, SFAX-TUNISIE
Directeur de Thèse	: Pr. MOEZ HANIN	: Professeur, ISBS, SFAX- TUNISIE
Directeur de Thèse	: Dr. MARIE-EDITH CHABOUTE	: DR2 CNRS, IBMP, STRASBOURG-FRANCE

Année Universitaire 2017-2018

Without plants, life on earth would cease to exist

Remerciements

Allah, inspirez-moi les bons pas et les justes réflexes. Donnez-moi la patience face au manque de ma famille. Aidez-moi à poursuivre mon effort pour que je puisse terminer mon chemin et réaliser mon rêve.

Je tiens à remercier Campus France pour avoir financé une partie de cette thèse. Je remercie aussi tous les membres de l'institut de Biologie Moléculaire des Plantes à Strasbourg-France et le centre de Biotechnologie de Sfax-Tunisie pour m'avoir accueilli dans leurs laboratoires, d'avoir investi leur confiance et de m'avoir soutenu matériellement et financièrement pour la réalisation de cette thèse. Cette thèse n'aurait pas pu être aussi riche en résultats, développement professionnel et personnel sans un grand nombre de personnes de l'IBMP et du CBS. Les rencontres et les collaborations ont été essentielles pour mes recherches ainsi que pour ma construction en tant que jeune chercheur. Elles ont aussi été sources de motivations et de créativités. Certaines d'entre elles ont même donner naissance à des amitiés, qui je l'espère dureront par la suite.

Je tiens tout d'abord à remercier mes directeurs de thèse, **Pr. Moez HANIN** et **Dr. Marie-Edith CHABOUTE** & **Dr. Chantal EBEL**, pour m'avoir fait confiance malgré les connaissances plutôt légères que j'avais au début de ce travail, puis pour m'avoir guidé, encouragé et conseillé tout au long de ces quatre années à la fois difficiles et riches en rebondissements, en rencontres murissantes tant sur le plan personnel que sur le plan scientifique.

Je remercie les membres de jury **Dr. Cécile RAYNAUD** et **Dr. Karim BEN HAMED** d'avoir accepté de relire cette thèse et d'en être les rapporteurs. **Dr. Andréa HEMMERLIN** d'avoir accepté d'être examinateur de cette thèse. **Dr. Ali-Faouzi GARGOURI** d'avoir accepté d'être président du jury. Je remercie également tous les autres membres d'avoir accepté d'assister à la présentation de ce travail.

Mes remerciements vont également à **Pr. Anne-Catherine SCHMIT** chef de l'équipe « INTERFACE NUCLÉOCYTOPLASMIQUE : DE LA SIGNALISATION AU REMODELAGE DE LA

CHROMATINE » à l'Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, pour la gentillesse el la patience qu'elle a manifestée à mon égard durant cette thèse, pour son aide, pour ses conseils, et pour le temps qu'elle a consacré à ce projet malgré ses nombreuses responsabilités.

Je remercie Mme **Laurence DROUARD**, directrice de l'Institut de Biologie Moléculaire des Plantes (IBMP) Strasbourg-France, ainsi que Dr. **Faical BRINI** Directeur de Laboratoire de Biotechnologie et amélioration des Plantes (LBAP) du centre de Biotechnologie de Sfax (CBS) Sfax, pour m'avoir accueilli au sein de ces institutions, et pour les conseils stimulants que j'ai eu l'honneur de recevoir de leur part.

Je pense particulièrement à toutes les assistants des Plateformes de L'IBMP, à toutes les personnes pour l'accueil et les conditions de travail privilégiées qui m'ont été offertes, et tout particulièrement, aux responsables de microscopie et d'imagerie cellulaire Drs. **Jérôme MUTTERER** et **Mathieu ERHARDT**. Les membres de la plateforme de production et purification des protéines, **Nicolas BAUMBERGER** et **Laurence HERRGOTT** pour leurs aides et conseils. Les Serristes : **Michel, Fabrice, Richard, Sébastien**. Merci aussi à **Martine** et **Lisiane** pour leurs soutiens logistiques, ainsi qu'à **Philippe** et **François**.

Je remercie également **Abelmalek ALIOUA** responsable de la plateforme Analyse de l'expression génique pour son accueil chaleureux à chaque fois que j'ai sollicité son aide, ainsi que pour ses multiples encouragements.

Je remercie énormément les membres de la plateforme Bio-informatique : **Valérie COGNAT**, **Stefanie GRAINDORGE** et **Timothée VINCENT** pour les discussions que j'ai pu avoir durant les formations que j'ai suivies avec eux qui m'ont beaucoup apporté. Je vous remercie infiniment.

Je tiens aussi à mentionner le plaisir que j'ai eu à travailler au sein de l'IBMP-Strasbourg et au CBS-Sfax, et j'en remercie ici tous les membres :

Etienne HERZOG, je te remercie d'avoir été disponible pour répondre à toutes mes questions pendant ces trois années, que ce soit sur les plans organisationnels, techniques ou scientifiques. J'espère tout de même ne pas trop t'avoir interrompu. Tes explications m'ont

permis de comprendre et d'appréhender la complexité de certains concepts scientifiques. Merci beaucoup.

J'exprime mes plus vifs remerciements à : **Esther Lechner, Marie-Claire, Patrick Achard, Jean-Michel Davière, Sandrine, Anthony, Elodie**, pour leurs gentillesses, leurs conseils et leurs interventions dans ce travail.

Riadh BEN MARZOUK & Dr. Mohamed-Najib SAIDI, je vous remercie de m'avoir permis de bénéficier de vos expertises et de votre rigueur au cours de ma dernière année de thèse en termes d'analyse in silico et de programmation R. Je vous remercie également pour vos critiques et explications qui m'ont permis de progresser dans mon analyse et dans la compréhension de certaines problématiques complexes qui m'avaient échappées.

Mariem BRADAI, je te remercie beaucoup pour ton soutien et ton aide tout au long de ma thèse, notamment pour les manips de double hybride. Merci infiniment.

Nicolas, Marlène, Alexandra, Déborah, **Chieko & Ritoparna**, je vous remercie pour votre aide et votre patience. C'était un plaisir de travailler et de discuter avec vous au laboratoire.

Enfin, ces remerciements ne seraient pas complets sans mentionner toutes les personnes qui m'ont accompagnées et soutenues tout au long de ses quatre années, je pense plus particulièrement à ma famille :

A ma chère maman qui malgré la distance a toujours su être présente pour moi, merci « Yamma » pour ton amour, pour tes conseils, et pour ton soutien. Merci également à mon cher papa, à mes frères et sœurs.

Enfin, je remercie tous les anciens et nouveaux membres du CBS:

Dr. Ines Yakoubi, Dr. Ikram ZAIDI, Dr. Kaouther Feki, Dr. Sana TOUNSI, Dr. Nibras BELGAROUI, Dr. Mouna GHORBEL, Dr. Rania DEJEMEL , Dr. Siwar BEN AMOR, Dr. Sandra GOUIAA, Chedia BOUGHANMI, Dr. Zouhair BOUALLEGUI, Dr. Nabil Zouari, Dr. Walid SAIBI, Dr. Alif CHEBBI, Dr. Hatem REKIK, Mohamed Brahmi, Adel SAIDI, Jalel AZAZA, Maher HMIDET. J'espère n'avoir oublié personne. Ce fut un plaisir de travailler avec vous et de vous rencontrer.

Merci à tous mes amis : Madelaine, Caroline, Florence, Zeineb, Séverine, Marlene, Magdalène, Xue, Qiannan, Ali, Samir, Ayoub, Idir, Florent, , Adrien, Cédric, Pierre « Le petit chinois », …

Table des matières

Table des matières 7

Abréviations 12

Liste des Figures 15

Liste des Tableaux 18

Introduction Générale 19

Etude Bibliographique 22

I- Stress Salin : Origine & effet sur la plante : 25

1- Effet précoce : sur la germination 26

2- Effet sur la morphologie des plantes : 26

3- Effet sur la physiologie : 27

II- Mécanismes de tolérance : 28

1- L'exclusion de sodium : 28

2- La compartimentation vacuolaire : 28

3- Ajustement ionique : 28

4- Régulation par les ROS : 29

5- Rôle des hormones dans la réponse au stress salin : 31

6- Importance des interactions hormonales dans la régulation de la croissance et du développement : 34

III- Cycle cellulaire 36

1- Les mécanismes de surveillance du cycle cellulaire chez les végétaux : 37

1- Contrôle de la transition G1/S et G2/M chez les végétaux : 38

2- Le cycle cellulaire en réponse au stress salin et aux hormones 39

IV- Le cytosquelette : 42

1- Les microtubules : Structure, rôle et dynamique pendant le cycle cellulaire : 43

a- Structure : 43

b- Dynamique des microtubules pendant le cycle cellulaire : 44

c- Le complexe de nucléation des Microtubules γ-TuSCs et γ-TuRCs : 45

d- GIP1 ou GCP3-Interacting Protein 1 46

OBJECTIFS DE LA THESE 47

Chapitre I 50
Etude in silico de la famille RSS1 chez les plantes 50
Introduction : 51
I- Identification et caractérisation de la famille RSS1-like chez les Poacées : 52
1- Identification de l'homologue de RSS1 chez le blé dur : 52
2- Conservation des protéines RSS1-like chez les Monocotylédones : 53
3- Etude phylogénique et propriétés structurales des protéines RSS1-like 1 : 56
4- Structure tridimensionnelle de TdRL1 et des RSS1-like : 57
5- Organisation génomique : 60
6- Etude des régions promotrices des homologues de RSS1 : 61
II- RSS1-like chez Arabidopsis : 63
1- PANS1 une protéine putative de la famille RSS1-like chez Arabidopsis : 64
2- Etude des sites de phosphorylation putatifs chez les protéines RSS1-like : 65
III- Etude transcriptomique : 68
1- Identification des gènes co-régulés avec TdRL1 en condition de stress abiotiques : 68
2- Les gènes identifiés sont bien co-exprimés avec RSS1, PANS et TdRL1 : 71
3- Le réseau génétique lié à PANS1 et l'identification de partenaires : 73
4- Analyse statistique : performance de la relation entre les gènes co-régulés et PANS1 : 74
Discussion chapitre I : 77
Chapitre II 80
TdRL1, Caractérisation moléculaire et fonctionnelle 80
Introduction : 81
I- Etude d'expression de TdRL1 chez le blé : 81
II- Etude physico-chimique et structurale de la protéine TdRL1 : 82
III- TdRL1 améliore la tolérance au stress chez la levure : 84
IV- Etude de l'interaction entre TdRL1 et TdPP1 : 87
V- Transformation transitoire & effet du stress abiotique sur la localisation de TdRL1 : 88
1- Clonage & localisation transitoire de TdRL1: 88
Discussion chapitre II : 92
Chapitre III 94
Etude fonctionnelle de TdRL1 in planta 94

Introduction : 95
I- Localisation cellulaire et tissulaire de TdRL1 95
1- Localisation cellulaire des RSS1-like dans les cellules BY-2 : 95
2- Localisation cellulaire et tissulaire de TdRL1 chez Arabidopsis 96
3- Localisation microtubulaire de TdRL1-GFP dans les cellules en division chez Arabidopsis : 98
4- Stabilité de TdRL1 et effet du MG132 : 99
II- Rôle de *TdRL1 in planta* dans la tolérance au stress salin 100
1- Effet de la sur-expression de TdRL1 chez Arabidopsis : 100
a- Effet sur la germination lors d'un stress salin et ionique : 100
b- Augmentation de la taille du méristème et de la masse fraiche en réponse au stress salin : 101
2- TdRL1 et le stress oxydatif : détoxification des ROS : 102
III- Essai de complémentation des mutants *pans1-1* et *rss1 :* 104
1- Complémentation du mutant rss1 : 105
2- Complémentation du mutant pans1-1/cmr1-2 : 106
3- Effet du sel sur le mutant pans1-1/cmr1-2 : 107
4- Sur-expression de TdRL1 chez pans1-1 : 109
Discussion chapitre III 111
Chapitre IV 114
Isolement de TdGIP1 (Triticum durum GCP3 interacting Protein 1) 114
Introduction : 115
I- Clonage du gène GIP de blé dur : 116
Discussion chapitre VI 121
Discussion générale 123
Conclusion Générale 128
Matériels & Méthodes 132
A- Matériels : 133
I- Matériel végétal : 133
II- Souches microbiennes et milieux de culture : 133
1- Souches bactériennes : 133
2- Souches de levure : 134

3- Plasmides : 134
4- Milieux de culture & antibiotiques : 135
5- Oligonucléotides : 137
6- Microscopes : 138
7- Anticorps: 138
A- Méthodes : 139
I- Culture des Plantes 139
1- Arabidopsis thaliana : 139
2- Nicotiana benthamiana : 139
3- Triticum turgidum var. durum : 139
II- Méthodes relatives à l'isolement, la manipulation et aux modifications des acides nucléiques : 139
1- Techniques relatives à l'ADN : 139
2- Techniques relatives à l'ARN : 145
III- Méthodes relatives à la production de protéine recombinante chez les procaryotes : 146
1- Production de la protéine recombinante : 146
2- Séparation et révélation des protéines : 147
IV- Méthodes relatives à la surexpression de gène chez la levure : 147
1- Transformation de levures : 147
2- Tests phénotypiques de croissance de levure : 148
3- Double hybride : 148
V- Transformation des plantes : 148
1- Transformation transitoire des feuilles de Nicotiana benthamiana (Sparkes et al., 2006) : .. 148
2- Transformation d'Arabidopsis par floral dip (Clough et Bent, 1998) : 149
VI- Techniques de Cytologie : 150
1- Coloration du matériel végétal à l'iodure de Propidium : 150
2- Immunomarquage : 150
VII- Outils bio-informatiques : 151
1- Bases de données & outils d'analyses : 151
2- Phylogénie : 151
3- Prédictions informatiques : 152

4- Analyses statistiques : 152

Bibliographie..... 153

Annexes 169

Abréviations

FAO	**F**ood and **A**griculture **O**rganization
µg	Microgramme
µl	Microlitre
µm	Micromètre
µM	Micromolaire
aa	**A**cide **a**minée
ABA	**A**cide **ab**scissique
AD	Domaine activateur dufacteur GAL4
ADN	**A**cide **d**ésoxyribonucléique
AHK3	**A**rabidopsis **H**istidine **K**inase **3**
APC	**A**naphase **P**romoting **C**omplex
APX	**A**scorbate **p**ero**x**ydase
ARN	**A**cide **R**ibo**N**ucléique
ASA1	**A**nthranilate **S**ynth**A**se**1**
H+ATPases	**H+-A**dénosine **T**riphos**P**hat**ases**
ATPases	**A**dénosine **T**riphos**P**hat**ases**
BD	Domaine de liaison à l'ADN du facteur GAL4
BET	**B**romure d'**Et**hidium
BR	**Br**assinostéroïdes
CAT	**CAT**alase
CCNS	**C**anaux **C**ationiques **N**on **S**élective
CDK	**C**yclin **D**ependent **K**inase
cDNA	**ADN C**omplémentaire
CK	**C**yto**K**inines
CKI	**C**yclin **D**ependent **K**inase **I**nhibitor
CO2	Dioxyde de carbone
CYC	**CYC**line
dATP	**D**ésoxy **A**dénosine **T**ri-**P**hosphate
dCTP	**D**ésoxy **C**ytidine **T**ri**P**hosphate
dGTP	**D**ésoxy **G**uanosine **T**ri**P**hosphate
DHAR	**D**é**H**ydro-**A**scorbate **R**éductase
DO	**D**ensité **O**ptique
dS	**d**eci-**S**iemens
dTTP	**D**ésoxy**T**himidine**T**ri**P**hosphate
E2F	Promoter-binding factor
E2s	Ubiquitin-carrying enzymes
E3s	Ubiquitin-protein ligases
EDTA	**A**cide **E**thylène-**D**iamine-**T**etra-**A**cétique
EST	**E**xpressed **S**equence **T**ag
ET	**Et**hylène
g	**G**ramme
GA	**G**ibberellic **A**cid

GCP	**G**amma-tubulin **C**omplex **P**roteins
GIP1	**G**CP3-**I**nteracting **P**rotein **1**
GPOX	**G**aïacol **P**e**ROX**ydase
GR	**G**lutathion **P**eroxydase
GST	**G**luthation-**S**-**T**ransférase
γ-TuSC	**γ**-**Tu**bulin **S**mall **C**omplex
ha	Hectare
HKT	**H**igh affinity **K**+ **T**ransporter **1**
IAA	**A**cide **I**ndole **A**cétique
ICKs/KR	Inhibiteurs des cdks chez les plantes
IPTG	**I**so**P**ropyl-d-**T**hio**G**alactopyranoside
JA	**J**asmonic **A**cid
Kb	**K**ilo**b**ase
kDa	**K**ilo**Da**lton
Kg	**K**ilo**g**rammes
KRP	**K**ip **R**elated **P**rotein
KUP-HAK	**K**+**U**ptake trans**P**orter **H**igh **A**ffinity **K**+ uptake transporter
L	**L**itre
LB	**L**uria **B**ertani
LCT1	**L**owaffinity**C**ation**T**ransporter**1**
M	**M**olaire
MAP	**M**icrotubule-**A**ssociated **P**roteins
MAPKinases	**M**itogen-**A**ctivated **P**rotein**K**inases
MDA	**M**alate**D**éhydrogèn**A**se
MDHAR	**M**ono**D**e**H**ydro **A**scorbate **R**eductase
MF	Filaments d'actine
mg	Milligramme
min	Minute
ml	Millilitre
mm	Millimètre
mM	Millimolaire
MM	**M**asse **M**olécuaire
MS	**M**urashig et **S**koog
Mt	**M**illions de **t**onnes
MT	**M**icro**t**ubule
MTOC	**M**icro**T**ubules **O**rganizing **C**entres
MZT1	**M**itotic spindle organi**Z**ing pro**T**ein **1**
NaCl	Chlorure de sodium
nm	Nanomètre
P5CS	**P**yrroline-**5**-**C**arboxylate**S**ynthétase
pb	**p**aire de **b**ase
PCR	**P**olymérase **C**hain **R**eaction
PP1	**P**rotein **P**hosphatase **1**
PPases	**P**yrophos**P**hat**ases**
PSI	**P**hoto**S**ystème **I**

PSII	**P**hoto**S**ystème **II**
qsp	**Q**uantité **s**uffisante **p**our
RAM	**R**oot **A**pical **M**eristem
RBR	**R**etino**B**lastoma **R**elated
RNase	**R**ibo**N**ucléa**se**
ROS	**R**eactive **O**xygen **S**pecies
rpm	**R**otation **p**ar **m**inute
RSS1	**R**ice **S**alt **S**ensitive **1**
SA	**S**alicylic **A**cid
SCF	**S**kp1/**C**ullin/**F**-box-protein
SDS	**S**oduim **D**odécyl **S**ulfate
SHY2	**S**hort **H**ypocotyl **2**
SOD	**S**uper **O**xyde **D**ismutase
SOS	**S**alt **O**verly **S**ensitive
TAE	**T**ris-**A**cétate-**EDTA**
TdGIP1	**T**riticum **d**urum **G**CP3-**I**nteracting **P**rotein **1**
TdRL1	**T**riticum **d**urum **R**SS-**L**ike **1**
TEMED	NNN'N'-**T**etra-**M**étyl-**E**thylène-**D**iamine

Liste des Figures

Figure 1 : Evolution de la production annuelle de blé et besoins en Blé dans le monde.

Figure 2 : Effet du stress salin chez la plante :

Figure 3 : Schéma de la voie de génération et de détoxification des ROS par le système de détoxification enzymatique.

Figure 4 : Effet du stress salin sur la réponse hormonale chez les plantes et les principaux acteurs moléculaires.

Figure 5 : Contrôle hormonale du développement des racines.

Figure 6 : Contrôle du cycle cellulaire chez les végétaux.

Figure 7 : Effet du stress salin sur l'expression des gènes essentielles pour la régulation du cycle cellulaire au niveau de la racine et de la tige.

Figure 8: Structure des microtubules, l'hétérodimère d'α et β tubulines forment le protofilament.

Figure 9 : Dynamique des microtubules au cours du cycle cellulaire.

Figure 10 : Composition de la ɣ-TuRCs, ɣ-TuSC composé de deux molécules de ɣ-tubuline en association avec GCP2 et GCP3.

Figure 11 : Alignement des séquences peptidiques de **TdRL1** (blé dur) et **TaRL1.**

Figure 12 : Alignement multiple des séquences protéiques homologues à RSS1/**TdRL1** issues de plantes monocotylédones.

Figure 13 : Arbre Phylogénétique effectué avec **(MEGA6.2)** qui montre la relation entre les différentes protéines homologues à **TdRL1** de la famille des Poacées.

Figure 14 : Composition en Acides aminées de TdRL1.

Figure 15 : Prédiction de la structure de TdRL1 obtenue par le logiciel GOR IV.

Figure 16 : Analyse avec **PONDR-FIT** par la détermination du score VSL2B.

Figure 17 : L'organisation génomique des homologues à TdRL1.

Figure 18 : Les protéines TdRL1, PANS1 et RSS1 sont des IDPs.

Figure 19 : Alignement des séquences de **TdRL1, RSS1 et PANS1**. Conservation des motifs D et DEN-box.

Figure 20 : Illustration des sites de phosphorylation sur les séquences protéique de RSS1, TdRL1 etPANS1.

Figure 21 : Diagramme de Venn indiquant l'enrichissement commun en 'Gene Ontology' (GO) dans les gènes co-regulés avec RSS1, PANS1 et TaRL1.

Figure 22 : Enrichissement des GO termes des gènes co-régulés avec RSS1, PANS1 et TaRL1 généré par AgriGO.

Figure 23 : L'analyse transcriptomique révèle la co-expression de nombreux gènes en liaison avec la division cellulaire.

Figure 24 : Réseau fonctionnel prédit de PANS1 chez Arabidopsis.

Figure 25 : Scatter plot présentant les connections entre le type de stress appliqué et la réponse des gènes co-régulés avec **PANS1.**

Figure 26 : RT-PCR semi-quantitatives sur de jeunes plantules de blé de 12 jours montrant l'expression de TdRL1 en présence des différents types de stress abiotiques.

Figure 27 : Expression hétérologue de TdRL1 chez *E. coli*.

Figure 28 : L'expression de TdRL1 chez la levure (sauvage et mutants (*glc7*) améliore la tolérance aux stress abiotiques.

Figure 29 : Test d'interaction de TdRL1-TdPP1 par immunoprécipitation.

Figure 30 : Stratégie de Clonage Gateway® de TdRL1.

Figure 31 : Localisation transitoire de TdRL1-GFP dans les feuilles de *N.Benthamiana.*

Figure 32 : Effet des stress abiotiques sur la localisation de TdRL1-GFP dans les feuilles de *N. benthamiana.*

Figure 34 : Localisation cellulaire des protéines TdRL1-GFP, RSS1-GFP and PANS1-GFP dans les cellules de *tabac BY2*.

Figure 34 : Analyse de l'expression du gène TdRL1 chez *Arabidopsis*.

Figure 35 : Localisation subcellulaire de TdRL1::GFP.

Figure 36 : Localisation subcellulaire de TdRL1::GFP dans des cellules en division.

Figure 37 : Effet de MG132 sur la stabilité de TdRL1-GFP (6h, 100 µM MG132).

Figure 38 : Influence de la sur-expression de TdRL1 chez Arabidopsis sur le pouvoir germinatif des graines transgéniques.

Figure 39 : Effet de la surexpression de TdRL1 sur la biomasse et la taille du méristème chez *Arabidopsis***.**

Figure 40 : Effet de la surexpression de TdRL1 chez Arabidopsis sur l'accumulation des ROS.

Figure 41 : Effet de la surexpression de TdRL1 chez Arabidopsissur l'accumulation des ROS et sur les activités des enzymes anti-oxydantes.

Figure 42 : TdRL1 complémente le phénotype nain de rss1 en présence d'NaCl.

Figure 43: Immunomarquage détaillant des figures mitotiques illustrant le phénotype du mutant pans1-1.

Figure 44: Immunomarquage détaillant les figures mitotiques du mutant pans1-1 en condition de stress salin.

Figure 45 : TdRL1 complémente le mutant pans1-1 en condition de stress salin.

Figure 46 : Alignement des séquences des protéines de la famille GIP1 identifiées chez les monocotylédones.

Figure 47 : Analyse phylogénétique des GIP d'Arabidopsis et de monocotylédones.

Figure 48 : Analyse par microscopie confocale de la localisation cellulaire de la protéine TdGIP1::GFP.

Figure 49 : Localisation cellulaire de TdGIP1::GFP dans les racines d'Arabidopsis.

Figure 50 : TdGIP1 est un partenaire de AtGCP3.

Figure 51 : Les résultats obtenus pendant la thèse montrent la multifonctionnalité de la protéine TdRL1.

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Protéines RSS1-like des Poacées et leurs propriétés physico-chimiques. Les % d'identité indiqués sont calculés par rapport à **TdRL1.**

Tableau 2 : Les différents éléments cis- régulateurs potentiels identifiés sur les régions promotrices des gènes (TdRL1 et RSS1) par le logiciel **PLACE.**

Tableau 3 : Liste des souches de levure utilisé.

Tableau 4 : Liste des principaux vecteurs utilisés.

Tableau 6 : liste des amorces utilisés.

Introduction Générale

INTRODUCTION GENERALE

La croissance de la demande mondiale en céréales augmente de 1 à 2 % chaque année (Bulletin de la FAO sur l'offre et la demande de céréale 2018). Cette augmentation est corrélée avec un accroissement de la consommation individuelle de blé (67 kg/an/personne en 2018). Malgré un accroissement constant de la production mondiale, celle-ci risque cependant de stagner dans les prochaines années. Les stress environnementaux (abiotiques et biotiques) impactent négativement le rendement et la qualité de la production végétale. La sècheresse et la salinité, causent une perte de rendement variant de 10 à 80% dans la région méditerranéenne (Nachit et al., 1998) et une perte de production mondiale de 50% (Bray et al., 2000). De plus, près de 400 millions d'hectares de terres sont affectés par la salinisation (Bot et al., 2000). En Tunisie, les sols affectés par la salinité naturelle couvrent 1,5 million d'hectares, soit 8 % du territoire national et près de 25 % de la surface totale des terres arables (Bleu et al., 2008). Les effets néfastes de la salinité sur la croissance des plantes sont généralement associés au faible potentiel osmotique de la solution du sol et au niveau élevé de toxicité du sodium. Ces contraintes provoquent des perturbations multiples du métabolisme, de la croissance et du développement des plantes aux niveaux moléculaires, biochimiques et physiologiques (Yamaguchi et Blumwald, 2005). La réaction d'une plante face à un stress commence par sa perception puis la transduction des signaux par des messagers pour finir par l'activation des réponses physiologiques et métaboliques appropriées. Ces réponses sont essentielles au bon développement des plantes en période de stress.

Nous pensons améliorer les rendements en conditions de stress abiotiques en influençant positivement la biomasse végétale. Or la source quasi inépuisable de biomasse chez les plantes réside dans les méristèmes apicaux et racinaires. Une augmentation de la biomasse résulte forcément d'une stimulation du cycle cellulaire via le maintien de l'activité des méristèmes. C'est dans ce cadre que s'inscrit notre travail qui porte sur l'amélioration de la tolérance du blé aux changements environnementaux.

La protéine RSS1 (Rice Salt sensitive 1) est décrite comme un régulateur positif de l'activité méristématique en conditions de stress et agirait chez le riz à l'interface entre la perception du stress abiotique et le maintien de l'activité méristématique. Nous avons entrepris l'étude fonctionnelle de l'homologue de RSS1 chez le blé dur appelé TdRL1 (*Triticum durum* RSS1-like 1). Nous avons comme objectifs de comprendre le rôle de la protéine TdRL1 en investiguant l'effet de sa surexpression chez *Arabidopsis*, son implication dans la régulation du cycle cellulaire et dans l'amélioration de la tolérance au stress salin.

Pour atteindre ces objectifs nous avons tout d'abord mené une étude *in silico* pour caractériser les protéines RSS1-Like, leur rôle potentiel dans la réponse aux stress abiotiques et l'identification de son réseau d'interactions génétiques. Dans un second temps, nous avons exprimé TdRL1 chez la levure pour évaluer son potentiel dans l'amélioration de la croissance des levures soumises à des stress abiotiques. En parallèle, nous avons généré des plantes transgéniques d'*Arabidopsis* dans le but de tester l'effet de l'expression de TdRL1 dans des conditions standard ou en présence de sel. On s'est également intéressé à étudier la localisation tissulaire et cellulaire de la protéine en absence et en présence du stress salin, et à tester sa stabilité. Dans une dernière partie, nous nous sommes intéressés à complémenter les mutants 'perte-de-fonction' *rss1* et *pans1,* dans le but d'étudier l'homologie fonctionnelle entre TdRL1 et ces deux protéines de la famille des RSS1-like.

Etude Bibliographique

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Le blé a été décrit comme la première espèce végétale cultivée par l'homme pour son apport énergétique important dans l'alimentation humaine (plus de 60% de calories). Les espèces majoritairement cultivées sont le blé tendre « *Triticum aestivum* » et le blé dur « *Triticum durum* ». La culture du blé a été initiée en 7000 av. JC dans la zone du croissant fertile, autour de l'amont du Tigre et de l'Euphrate, dans les territoires actuels de la Syrie et de la Turquie (Lev-Yadun et al., 2000). L'ancêtre sauvage, *T. monococcum L ssp* a été découvert en Grèce pour la première fois en 1833, tandis que *T. urartu* (donneur du génome AA) fut repéré en Arménie en 1937 et le blé dur, *T. turgidum spp. durum* (Desf.) en Autriche. La première classification des blés a été faite vers 1913 par Schultz renforcée par les études cytologiques du nombre de chromosomes par Sakamura en 1918 qui aboutirent à les classer en trois groupes principaux : les blés diploïdes (2n = 14), les blés tétraploïdes (blé dur, 2n = 28) et les blés hexaploïdes (blé tendre, 2n = 42) (Feldman et al., 1995).

La production mondiale des céréales atteint 2,642 milliards de tonnes dont 744 millions de tonnes de blé et 502,2 millions de tonnes de riz. Selon la FAO, les prévisions de la demande en blé et en riz pour 2017-2018 ont été revues à la hausse de 2,608 milliards de tonnes, soit 38 millions de tonnes de plus qu'en 2016-2017. Les estimations de la FAO relatives aux stocks mondiaux de céréales pour 2018 ont été relevées à 753 millions de tonnes dont 272,7 Mt de blé soit 9,2 % de plus par rapport à la campagne 2016-2017 (Figure1).

En Tunisie, les céréales qui représentent une activité stratégique et économique importante, sont cultivées sur une grande superficie (1,5 millions d'hectares) (El Felah et al., 2015). La consommation des Tunisiens en blé est la première du monde arabe (48%) en apport journalier en calories (données basées sur USDA 2011, FAO 2011) mais il y a une grande fluctuation dans la production. En effet, en 2017 la production céréalière tunisienne atteint 1,5 millions de tonnes (1,1 Mt de blé et 400 milles tonnes d'orge) mais cette production est insuffisante pour combler la forte consommation.

Marché mondial du blé	2013/14	2014/15	2015/16	2016/17 estimation	2017/18 prévision précédente (01 fév. 2018)	2017/18 prévision dernière (01 mar. 2018)
	(..... millions de tonnes .....)					
Production1/	713.1	731.8	734.2	759.8	757.6	**757.0**
Disponibilités2/	890.3	922.1	942.1	986.3	1005.7	**1006.7**
Utilisation	691.8	714.2	710.3	731.8	733.9	**733.6**
Commerce3/	158.4	156.8	167.2	177.4	174.5	**173.5**
Stocks de clôture4/	190.3	208.0	226.5	249.7	269.8	**272.7**
	(..... pour cent .....)					
Rapport stocks mondiaux-utilisation	26.6	29.3	31.0	34.0	36.1	**36.5**
Rapport stocks des principaux exportateurs-utilisation totale5/	14.9	16.7	16.3	19.1	20.3	**20.2**

Figure 1 : Evolution de la production annuelle de blé et besoins en blé dans le monde. La situation mondiale de la demande et de l'offre de céréales est restée globalement stable en 2017-2018, comme le montrent les bons rapports stock/utilisation (FAO-2018).

Selon L'institut Nationale de Statistique (http://www.ins.tn/), la consommation moyenne annuelle de blé par habitant en Tunisie est de 174,3 kg en 2015. Ainsi, l'écart entre la production et les besoins des tunisiens en blé et en orge est comblé par des importations : 2 millions de tonnes de blé et 639 milles de tonnes d'orge ont été importés en 2015-2016 (entre 20 % et 85 % de blé dur et blé tendre consommés, respectivement ; INS : http://www.ins.tn/).

La fluctuation dans la production nationale des céréales est due aux variations pluviométriques. La Tunisie est soumise à un climat semi-aride voire aride avec des étés chauds et une pluviométrie très variable d'une année à l'autre mais aussi d'une région à l'autre. Le Nord a une pluviométrie moyenne oscillant entre 400-600 mm et assure entre 60 et 70% de la production céréalière nationale (cultivées sur env. 750 à 850 000 hectares (ha)). Le centre, avec une pluviométrie entre 200-400 mm, est à vocation agro-pastorale (parcours et plantation) tandis que le Sud avec une pluviométrie aléatoire de 100 à 200 mm, est caractérisé par son aridité et la vulnérabilité de ses sols à la désertification. Les stress salin et hydrique y sont liés car l'irrigation est indispensable mais se fait le plus souvent avec une eau de mauvaise qualité qui en conjonction avec une évaporation importante engendre une salinisation des sols *ie.* une accumulation de sels solubles au-delà d'une conductivité de 4 deci-Siemens par mètre (dS/m) à 25°C (ou 40 mM NaCl). La salinité et la sécheresse sont considérées comme deux facteurs qui limitent la production et le rendement lors des

différentes campagnes céréalières. Chez le blé, la sècheresse et la salinité causent une perte de rendement variant de 10 à 80 % dans la région méditerranéenne (Nachit et al., 1998) et pouvant atteindre 50% des productions dans le monde (Bray et al., 2000).

I- Stress Salin : Origine & effet sur la plante :

Le stress salin est un stress abiotique majeur qui induit des pertes dans les cultures céréalières et une diminution du rendement (Munns et al., 2005). La salinité affecte 6% des terres agricoles et est définie par une forte accumulation de sel soluble (Munns et al., 2005). Les effets néfastes de la salinité sur la croissance des plantes sont généralement associés au faible potentiel osmotique de la solution du sol et au niveau élevé de toxicité du sodium qui provoquent des perturbations multiples sur le métabolisme, la croissance et le développement des plantes aux niveaux moléculaires, biochimiques et physiologiques (Yamaguchi et Blumwald 2005). Ainsi, la réaction d'une plante face un stress commence par la perception puis la transduction des signaux par des messagers afin d'activer les gènes de réponse et activer les réponses physiologiques et métaboliques nécessaires pour maintenir la viabilité.

La forte concentration du **Na^+** dans le sol et le faible potentiel membranaire des cellules racinaires des plantes favorise le passage passif des ions **Na^+** du sol vers la racine par le biais de **C**anaux **C**ationiques **N**on **S**électifs **(CCNS)**. L'efflux des ions **Na^+** est actif et nécessite des antiports spécifiques **Na^+/H^+** notamment de type **SOS1** (**S**alt **O**verly **S**ensitive **1**) (Shi et al., 2000). Au niveau cellulaire, la salinité affecte le développement en induisant deux types de stress. Le premier est un stress osmotique causé par la dissolution des ions **Na^+** dans le sol entrainant une diminution de l'eau disponible pour la plante. Ceci cause un déficit hydrique au niveau de la racine, déficit transmis rapidement à la partie aérienne conduisant à une diminution de la turgescence des cellules (Munns et Tester 2008). Le déficit hydrique favorise la fermeture des stomates, donc une faible assimilation du carbone et une diminution de la biomasse car il affecte la croissance des racines et des parties aériennes, le développement des feuilles et des organes reproducteurs (Munns et Tester 2008 ; Debaeke et al., 1996). Le manque d'eau après la floraison, combiné à des températures élevées,

entraînent une diminution du poids des grains et la réduction de la taille des grains (échaudage) réduisant par conséquent le rendement (Gate et al., 1992).

Le second consiste en un stress ionique induit par l'accumulation de **Na^+** dans la partie aérienne qui conduit à la nécrose et la sénescence précoce des feuilles (Roy et al., 2014). Ce stress ionique est corrélé à une diminution de l'activité de l'eau dont la distribution autour des protéines est modifiée provoquant des changements conformationnels et modifiant l'activité des enzymes (Flower et al., 1977). En outre, la forte accumulation des ions **Na^+** cause un déséquilibre ionique notamment par une diminution des ions **K^+** et Ca^{2+} essentiels pour l'activation d'enzymes, l'ajustement osmotique et l'homéostasie du pH cytoplasmique (Barragan et al., 2012). La concentration et l'assimilation d'autres éléments minéraux (Mg, N, et P) dans la plante est aussi perturbée induisant un déséquilibre nutritionnel entrainant une réduction de la croissance de la plante (Haouala et al., 2007).

La salinité provoque également des changements physiologiques et moléculaires :

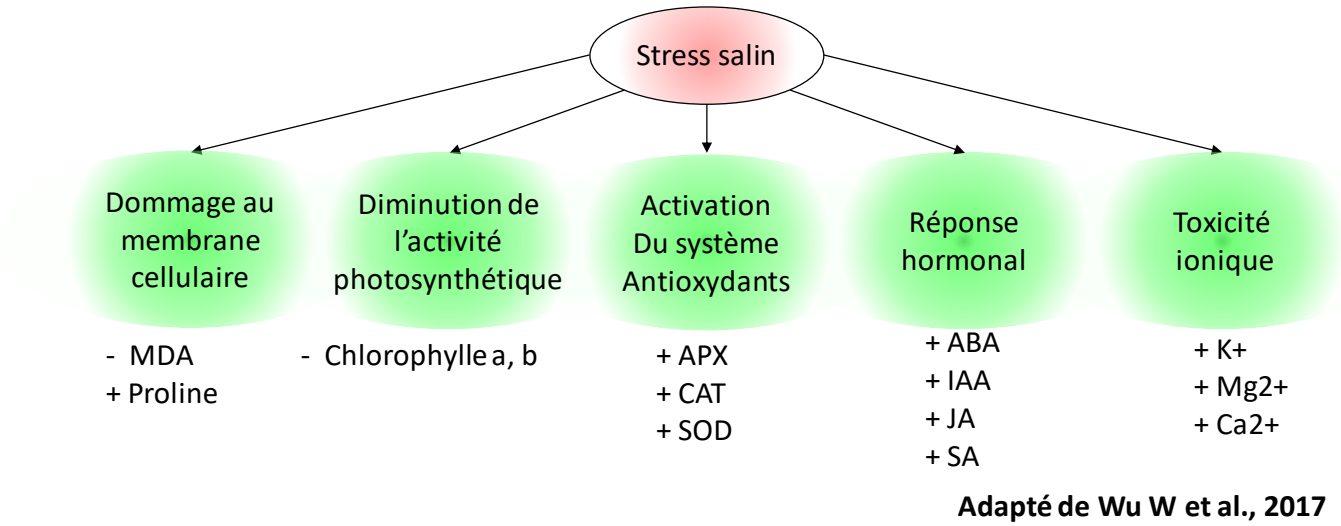
1- Effet précoce : sur la germination : La forte concentration en ions Na^+ dans le sol induit une diminution de la disponibilité de l'eau dans le sol. Or, la présence d'une quantité suffisante d'eau est essentielle pour la levée de la dormance des graines. Il a été démontré que la salinité inhibe la germination par son effet osmotique où elle affecte tous les processus de germination à la suite de la baisse du potentiel hydrique autour des graines, ce qui rend l'eau inaccessible à cette dernière pour la réhydratation et la reprise de la vie active de l'embryon (Maas et Poss 1989). La réduction du potentiel osmotique de la solution du sol empêche l'imbibition de la graine suite à une diminution des activités enzymatiques et une forte absorption de Na^+ par rapport au K^+, ce qui conduit à une toxicité embryonnaire et un retard dans les processus métaboliques (Hsiao et al., 1976).

2- Effet sur la morphologie des plantes : La salinité induit une réduction de la croissance végétative en hauteur, dans le nombre de talles et de feuilles chez les plantes (Munns et Rawson 1999). La salinité réduit le taux de croissance de la plante et de ses organes reproducteurs par la diminution du nombre des grains pollen de 24 à 37 % chez l'orge (Hu et al., 2005). De plus, des traitements de l'orge avec du sel pendant l'organogenèse

ont des conséquences irréversibles sur la fertilité de l'épi car ils provoquent l'avortement des ovules (Munns et Rawson 1999).

3- Effet sur la physiologie : La salinité affecte l'activité physiologique de la feuille, et plus particulièrement la photosynthèse, qui présente la cause principale de la réduction de la productivité végétale. La réduction de la photosynthèse est liée à la diminution du potentiel hydrique foliaire, qui est à l'origine de la fermeture des stomates (Allen et al., 1995). La diffusion du **CO_2** à l'intérieur des stomates devient alors limitée et sa fixation au niveau des chloroplastes diminue. Le photosystème I (PSI), le photosystème II (PSII) et le transport d'électrons sont significativement diminués sous 150 mM de NaCl chez *Arabidopsis*. De plus, l'excès de Cl^- conduit à la dégradation de la chlorophylle et à la chlorose en périphérie des feuilles (Amirjani et al., 2011).

Dans l'ensemble, la réponse des plantes au stress salin est complexe et fait intervenir des voies de réponse diverses (Figure 2) conduisant à des mécanismes d'adaptation qui induisent un arrêt rapide de la croissance pour une meilleure redistribution des nutriments dans les différents tissus et au rétablissement rapide de la croissance lorsque le stress est levé.



Adapté de Wu W et al., 2017

Figure 2 : Effet du stress salin chez la plante : le stress salin provoque une toxicité ionique & osmotique par l'augmentation du contenu intracellulaire en cation Na^+, Ca^{2+}, l'activation du système antioxydant et un changement de la balance hormonale provoque une forte diminution dans l'activité photosynthétique et une sénescence foliaire précoce.

II- Mécanismes de tolérance :

Pour surmonter le manque d'eau, les plantes développent plusieurs stratégies adaptatives qui varient en fonction de l'espèce et des conditions du milieu. Les événements précoces de l'adaptation des plantes au stress commencent par les mécanismes de perception puis de signalisation via une transduction de signaux et de messagers afin d'activer les diverses réponses physiologiques et métaboliques, y compris l'expression de gènes de réponse au stress. Les principales voies impliquées lors de la signalisation du stress salin sont celles du calcium, de l'acide abscissique (**ABA**), des « **M**itogen-**A**ctivated **P**rotein **K**inases » (**MAPK**inases), et des protéines « **S**alt **O**verly **S**ensitive » (**SOS**) (Chinnusamy et al., 2005 ; Mahajan et al., 2008). Au niveau cellulaire plusieurs stratégies adaptatives sont mises en jeux :

1- L'exclusion de sodium :

C'est une stratégie qui permet aux plantes de survivre en condition de stress salin et d'exclure le sodium du cytoplasme vers l'extérieur de la cellule. Dans ce cas, les plantes limitent l'entrée des éléments salins et les rejettent dans le compartiment apoplasmique (Blumwald et al., 2004 ; Munns 2005). L'exclusion du sodium est réalisée par l'action combinée d'une série de protéines de type **SOS** « salt overly sensitive » (Zhu 2003) qui sont des antiports Na^+/H^+ localisés au niveau de la membrane plasmique**.**

2- La compartimentation vacuolaire *:*

Elle permet d'évacuer les ions $\mathbf{Na^+}$ du cytoplasme en excès vers la vacuole afin d'éviter leur effet toxique et inhibiteur des processus enzymatiques qui est assuré par l'action des antiports vacuolaire sodium/proton ($\mathbf{Na^+/H^+}$) dont l'énergie est fournie par les pompes à protons ATPases (H^+ -adénosine triphosphatases) et PPases ($\mathbf{H^+}$ -pyrophosphatases) vacuolaires (Gaxiola et al., 2002; Horie et Schroeder 2004; Yamaguchi et Blumwald 2006).

3- Ajustement ionique :

Il permet de réduire et d'équilibrer la concentration d'ions dans le but d'ajuster la pression osmotique au niveau du cytoplasme (Sairam et Tyagi 2004 ; Shabala et Cuin 2007). Ceci peut être assuré par une augmentation des concentrations de potassium, outre celle des

osmolytes compatibles (Munns et Tester 2008). Afin de préserver les réactions métaboliques et de maintenir un rapport K/Na viable, les cellules végétales doivent ajuster leur teneur en potassium entre 100 et 200 mmol/L (Maathuis et Amtmann 1999). Deux systèmes d'absorption et de transport des ions K^+ et Na^+ coexistent. Premièrement, les transporteurs à forte affinité pour le potassium de la famille KUP-HAK : « K^+ uptake transporter-high affinity K^+ uptake transporter » et les transporteurs à faible affinité pour les cations (**HKT1** : « **H**igh affinity **K**$^+$ **T**ransporter **1** » et LCT1 : « **L**ow affinity **C**ation **T**ransporter **1**»).

En outre, la plante synthétise des osmolytes compatibles qui aident au maintien du statut osmotique de la cellule. Parmi ces osmoprotecteurs, on distingue les sucres (essentiellement le sucrose et le fructose), les sucres alcooliques (glycérol,..), les sucres complexes (raffinose,…), les métabolites chargés (glycine betaine) et les acides aminés telle que la proline (Munns et al., 2008). La fonction des solutés compatibles n'est pas limitée au stress osmotique. Les solutés compatibles sont hydrophiles, et peuvent être capable de remplacer l'eau des surfaces des protéines ou les membranes, et agissent ainsi comme des chaperonnes de faible poids moléculaires (Hasegawa et al., 2000) . Des études menées sur des plantes traitées par le sel montrent une accumulation de Proline. Cet acide aminé est essentiel pour la synthèse, le repliement et la stabilité des protéines. La synthèse de proline est réalisée à partir de la voie de l'acide glutamique via l'enzyme Pyrroline-5-Carboxylate Synthétase (P5CS). Chez Arabidopsis, le mutant d'insertion *p5cs1* a montré une réduction significative de l'accumulation de proline libre, de la croissance racinaire et de l'accumulation des espèces réactives de l'oxygène (Li et al., 2013).

4- <u>Régulation par les ROS :</u>

Le stress salin (comme d'autres stress) aboutit à l'augmentation des espèces oxygénées réactives (ROS). En faible concentration les ROS jouent un rôle dans la transduction du signal qui permet l'activation des réponses au stress. Mais à une concentration élevée les ROS peuvent être nuisibles à la cellule et induire de sévères dommages à l'ADN, aux protéines et aux lipides (Baxter et al., 2013). Les ROS sont des radicaux libres de type superoxyde (O_2^-), Hydroxyle ($OH^{\cdot}$) et les non radicaux comme l'oxygène singulet (O_2) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Das et Roychoudhury 2014). En condition normale, les ROS sont produits par l'activité photosynthétique par les NADPH et amines oxydases (Mittler et al.,

2002). Le contrôle de la concentration endogène des ROS est réalisé par un système de détoxification enzymatique et non enzymatique (comme l'acide ascorbique, le glutathion réduit, tocophérols et les caroténoïdes) qui permet d'atténuer les dommages causés par les ROS (Baxter et al., 2013)(Figure 3). Le système enzymatique est composé de la SuperOxyde Dismutase (SOD), l'Ascorbate PeroXydase (APX), la GuaiacolPeroXydase (GPX), la CATalase (CAT), la DéHydroAscorbate Réductase (DHAR), la MonoDéHydroAscorbateReductase (MDHAR), la gaïacol peroxydase (GPOX), la glutathion peroxydase (GR), et glutathion S-transférase (GST) (Demidchik et al., 2015).

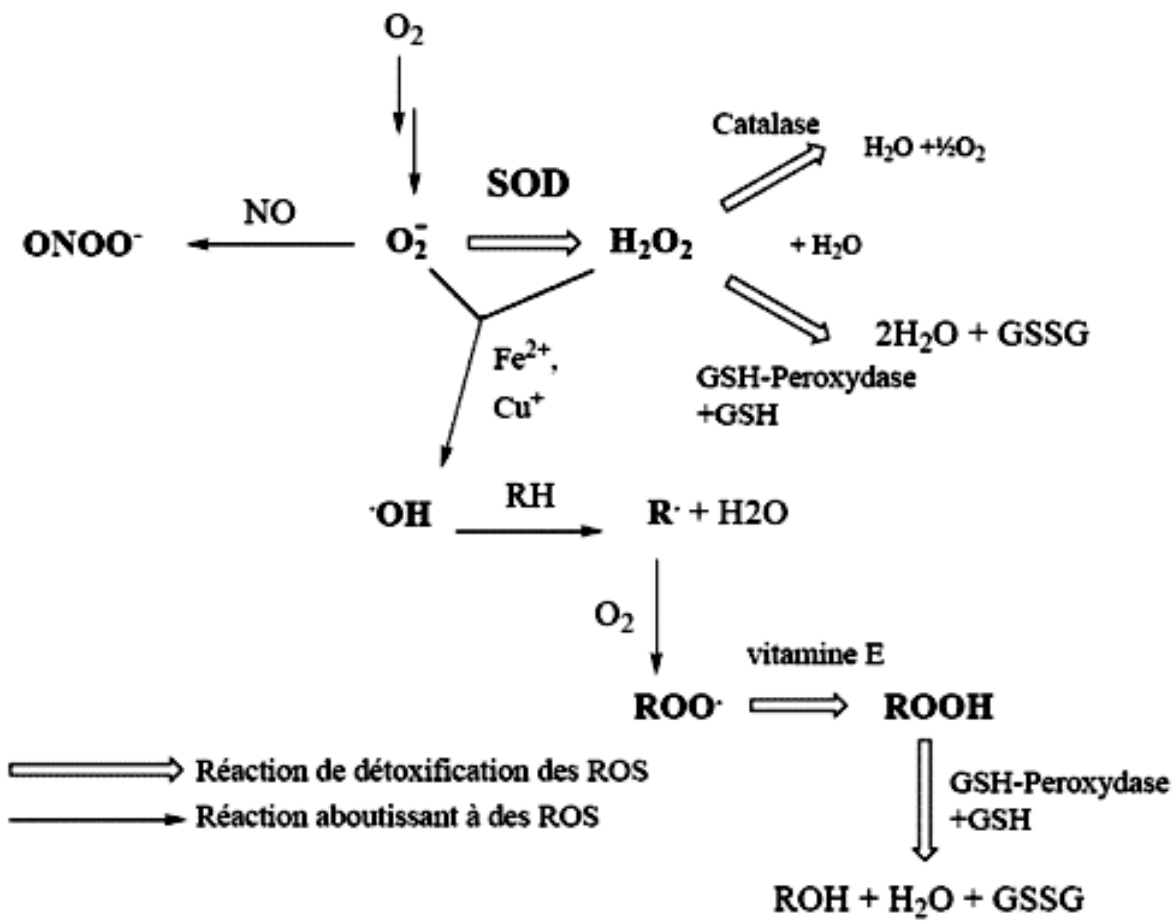


Figure 3 : Schéma de la voie de génération et de détoxification des ROS par le système de détoxification enzymatique (superoxyde dismutase, catalase, glutathion peroxydase, etc.), et par la vitamine E

La détoxification enzymatique des ROS est initiée par la **SOD** qui permet la conversion des O_2^- pour générer le H_2O_2 lui-même converti en H_2O par les enzymes **APX**, **CAT** et **GPX** (Das et Roychoudhury 2014). **DHAR, MDHAR** et **GR** sont des enzymes permettant de

produire de l'acide ascorbique à partir des produits d'oxydation (déhydroascorate, le glutathionne oxydé et monodéhydroascorbate). Le stress salin provoque un stress ionique et ainsi par les mécanismes cités plus haut (voir paragraphe I.3) favorise la diminution de l'activité du cycle de Calvin et l'accumulation de l'**H_2O_2** (Leegood et al., 1995). La diminution du **CO_2** endogène réduit la concentration en **$NADP^+$** oxydé, l'accepteur final d'électron du PSI, ce qui favorise l'acceptation d'électron par le dioxygène **(O_2)** pour former **O_2^-** (Abogadallah 2010). En condition de stress salin, les ROS sont générés par différentes organelles (chloroplaste, mitochondrie, peroxysome…). Il a été démontré que l'activité de la SOD augmente en cas de stress salin. La surexpression de la Mn-SOD chez des plants d'*Arabidopsis* ainsi qu'une surexpression de la Cu/Zn-SOD chez le tabac transgénique seraient à l'origine de la tolérance à différents stress (Gill et Tuteja 2010). De plus, une corrélation a pu être mise en évidence entre l'activité de la SOD et l'activité de la CAT. Cette corrélation résulte du fait que la SOD est responsable de la synthèse de l'H_2O_2 et que l'augmentation de la concentration en H_2O_2 est corrélée à une stimulation de l'activité de la CAT (Eraslan et al., 2007). D'autres études montrent que la surexpression des gènes contrôlant la synthèse de l'APX et GPX améliore la tolérance au stress salin (Eraslan et al., 2007).

5- <u>Rôle des hormones dans la réponse au stress salin :</u>

Les hormones représentent un composant principal des mécanismes de tolérance aux stress abiotiques en modulant les réponses moléculaires et physiologiques essentielles à la survie des plantes. Les principales hormones produites par les plantes sont les auxines, les gibbérellines (GA), les cytokinines (CK), l'acide abscisique (ABA), l'éthylène (ET), l'acide salicylique (SA), les jasmonates (JA), les brassinostéroïdes (BR) et les strigolactones. Les interactions complexes entre les voies de réponses hormonales garantissent une réponse physiologique des plantes pour coordonner la croissance et le développement de la plante en fonction des changements extérieurs comme la salinité (Figure 4). L'ABA, SA, JA et ET sont connus pour jouer un rôle majeur dans la réponse des plantes contre le stress salin (Wani et al., 2016).

L'ABA est l'une des hormones les plus importantes pour la croissance et le développement par le contrôle de la morphogenèse des embryons, la fermeture des

stomates, la sénescence foliaire mais est aussi considérée comme l'hormone du stress (Sah et al., 2016). En effet, en condition de stress salin, le niveau d'ABA endogène augmente (Luo et al., 1992). Chez *Arabidopsis* le gène qui code pour la zéaxanthine époxydase (ABA1), enzyme essentielle pour la synthèse de l'ABA (conversion de zéaxanthine en violaxanthine) est induit par la sécheresse (Li et Assmann 2010). L'ABA participe à l'ajustement osmotique chez les plantes sujettes à un stress salin par l'induction de la fermeture des stomates et l'accumulation d'osmoprotecteurs (Cabot et al., 2009). La synthèse de l'ABA induit aussi des augmentations des taux de phospholipides, de calcium et de l'oxyde nitrique (Miller et al., 2008; Neill et al., 2008). Une augmentation de l'inositol 1, 4,5-triphosphate (IP3), qui est catalysé par la phospholipase C (PLC), induit une augmentation de la concentration de Ca^{2+} cytosolique, des réactions essentielles pour la fermeture des stomates (Takahashi et al., 2001).

La régulation de développement des plantes est également régulée par l'Auxine, impliquée dans l'élongation des cellules, l'organogenèse et la dominance apicale (Lau et al., 2008). Cependant, en condition de stress salin une altération dans l'accumulation et la distribution de l'auxine a été observée chez le riz entrainant des défauts dans l'architecture et le développement des racines (Kazan et al., 2013).

L'acide gibbérellique (GA) est une hormone essentielle au développement, la photomorphogenèse et à la floraison (Davière et Achard 2013). Les protéines DELLA régulateurs négatifs de la réponse aux GA, sont impliquées dans la réponse des plantes au stress salin. Ceci est illustré par une forte accumulation des DELLAs couplée à une diminution de la forme active de GA (Achard et al., 2008). Les mutants déficients dans la biosynthèse des GA ou dans les DELLA possèdent une altération du développement et sont hypersensibles au stress salin (Achard et al., 2006). Ces résultats suggèrent un rôle important des GA dans la tolérance au stress salin. Notamment chez les céréales comme le riz, l'application de GA3, la forme bioactive du GA, augmente le pouvoir germinatif des graines, le développement et le rendement en condition du stress salin (Javid et al., 2011).

L'acide jasmonique (JA) est surtout connu comme intervenant dans la réponse aux stress biotiques mais elle est également fortement liée à la réponse et à la signalisation en condition de stress salin. Une forte accumulation de JA a été observée chez des plantes

traitées avec du sel (Moons et al., 1997). Chez le riz la protéine RSS3 est impliquée dans la voie de réponse au JA mais joue aussi un rôle clé dans la réponse au stress salin par le contrôle de l'élongation des cellules en condition de stress par l'interaction avec OsbHLH089 et OsbHLH094 (Pedranzani et al., 2017). De plus, la surexpression OsCYP94C2b (gène codant pour un enzyme qui converti le JA-Ile) améliore la tolérance au stress salin chez le riz (Kurotani et al., 2015).

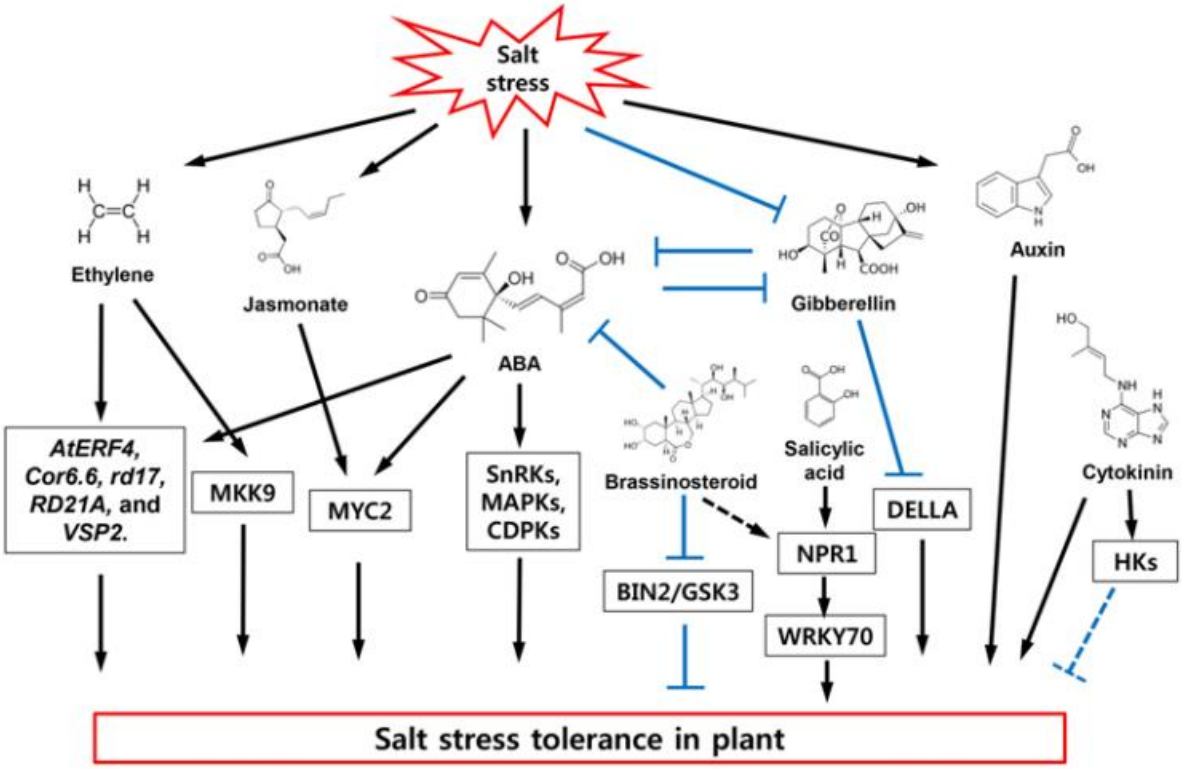


Figure 4 : Effet du stress salin sur la réponse hormonale chez les plantes et leurs principaux acteurs moléculaires. (Hojin Ryu et Yong-Gu Cho 2015).

Les cytokinines (CK) et l'éthylène sont aussi impliqués dans la réponse au stress salin. En condition de stress salin, la synthèse de CK est affectée et l'application de CKs améliore la tolérance des plantes au stress salin (Javid et al., 2011). Les mutants perte-de-fonction ***etr1-1*** et ***etr1-7,*** mutés dans le récepteur de l'ethylène montre une diminution de la tolérance au stress salin chez *Arabidopsis* (Wang et al, 2008). En outre, l'application du précurseur de l'éthylène ACC améliore la tolérance au stress salin de plants de tabac (Cao et al., 2006).

6- Importance des interactions hormonales dans la régulation de la croissance et du développement :

Chez les plantes la réponse des hormones est modulée par leur disponibilité, niveau de synthèse et de catabolisme. Le déséquilibre de cette homéostasie provoque diverses réponses sur les gènes cibles et les activités des protéines impliquées (Vanstraelen et Benkova 2012). Trois niveaux de réponse sont identifiés, réponse directe lorsque l'hormone est impliquée directement dans le contrôle de l'expression du gène cible ou module directement l'activité d'une protéine. Par contre la réponse est secondaire lorsque l'hormone a un effet sur un gène qui est sous le contrôle d'une autre hormone. La réponse est dite tertiaire ou de co-régulation lorsque deux hormones ou plus sont impliquées dans la régulation d'un processus et induisent différentes cascades de signalisation indépendantes (Chandler 2009) et le résultat de ces interactions (synergique ou additive) peut activer ou inhiber une cascade de signalisation (figure 5). De plus, les interactions hormonales sont essentielles pour le contrôle et la régulation des processus de développement et de croissance chez les plantes Par exemple, la division et la différenciation cellulaire dans le méristème racinaire (RAM) sont contrôlés par les activités antagonistes de l'auxine et de la cytokinine (Loio et al., 2007).

La réponse à la cytokinine s'initie par la perception de l'hormone par ARABIDOPSIS HISTIDINE KINASE 3 (AHK3), qui une fois activée, transmet le signal à ARR1 et ARR2 qui activent à leur tour la transcription du répresseur IAA3/SHORT HYPOCOTYL 2 (SHY2) pour atténuer la réponse à l'auxine et inhiber l'expression des gènes PIN. La carence en auxine dans la racine induit par l'inhibition des PINs provoque la diminution de l'activité méristématique (Vanstraelen et Benkova 2012). L'activité méristématique est aussi fortement affectée par une déficience dans la synthèse de GA due à une forte accumulation du répresseur DELLA réduisant la taille des méristèmes (Achard et al 2009). L'interconnexion entre l'auxine et GA dans le contrôle de l'activité méristématique est modulée par la dégradation du répresseur DELLA, puisque l'auxine stimule la transcription de GA20ox1 et GA20ox2 favorisant la synthèse de GA (Frigerio et al 2006). (figure 5).

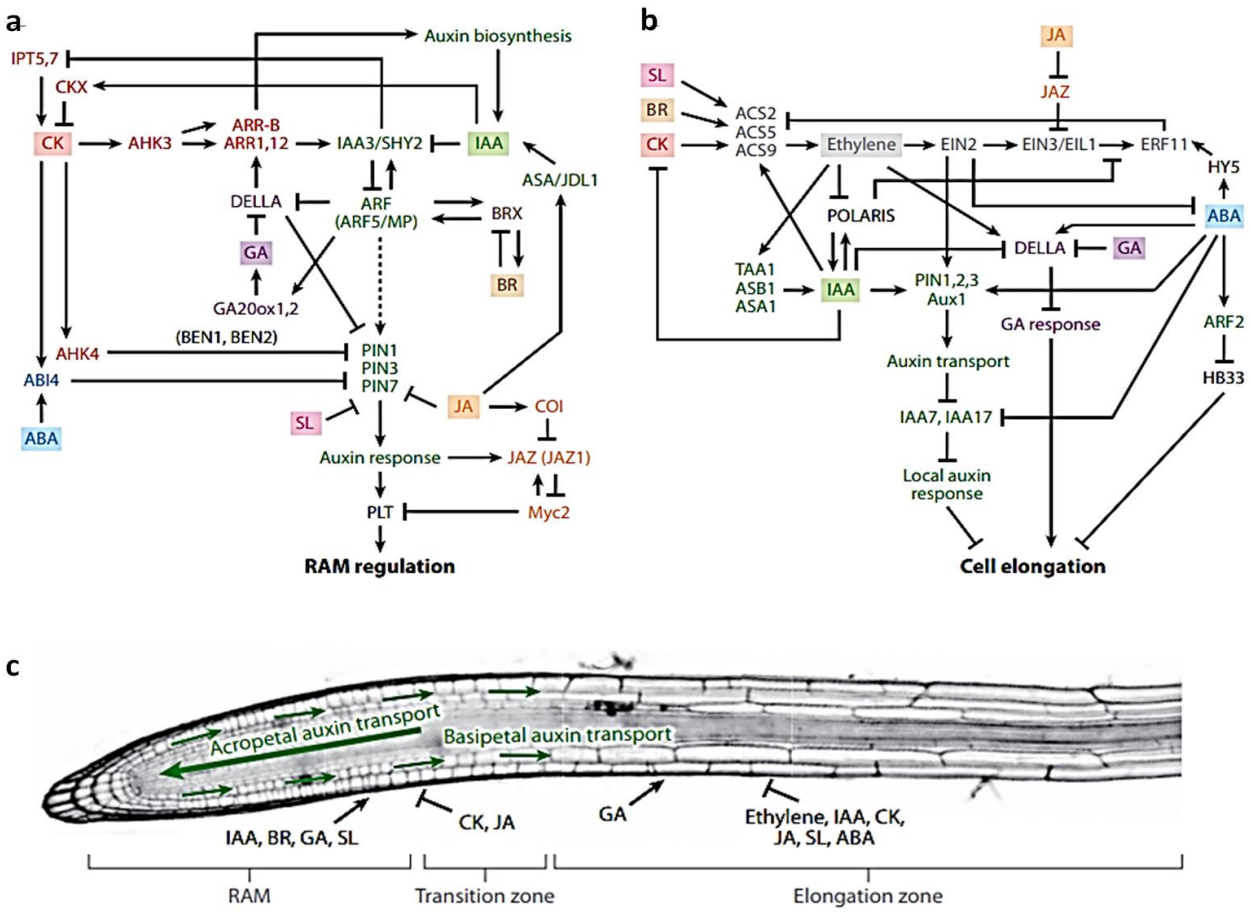


Figure 5 : Contrôle hormonal du développement des racines. (a) Interaction des réponses hormonales dans le méristème apical de la racine (RAM) dans la zone d'élongation (b) et dans la pointe de racine (c). Composants de l'auxine (vert), cytokinine (CK, rouge), acide jasmonique (JA, orange), acide abscissique (ABA, bleu), gibbérellines (GA, mauve), Brassinostéroïdes (BR, marron), Ethylène (gris), IAA = indole acidic acid ; SAM= shoot apical meristem, RAM = root apical meristem (Selon Vanstraelen et Benkova 2012).

L'effet antagoniste de l'acide jasmonique et de l'auxine dans le contrôle de l'activité méristématique est montré par une réduction du RAM (Chen et al., 2011). Le cross-talk entre JA et l'auxine se fait à travers les gènes PLETHORA (PLT), des facteurs de transcription qui contrôlent l'activité du RAM. JA inhibe l'expression des gènes PLT et PIN (Chen et al., 2011), stimule ANTHRANILATE SYNTHASE 1 (ASA1), enzyme de la voie de biosynthèse de l'auxine (Stepanova et al., 2005). De plus l'auxine contrôle la synthèse de l'acide jasmonique par l'activation des gènes *JAZ1*, répresseur de la biosynthèse du JA (Chini et al., 2007).

La balance entre l'auxine et l'éthylène est importante pour le contrôle de l'élongation cellulaire au niveau du méristème racinaire. L'éthylène stimule la biosynthèse et le transport

de l'auxine par la régulation des gènes ASA1, ASB1 ASA1 (**A**nthranilate **S**ynthase **A**lpha subunit 1), ASB (**A**nthranilate **S**ynthase **B**eta subunit 1) et tryptophane aminotransférase TAA (Stepanova et al., 2005). En outre, l'éthylène comme l'ABA inhibe la croissance racinaire. Chez le mutant sensible à l'ABA *hy5*, une diminution du taux d'éthylène a été observée suggérant une inhibition de la voie de biosynthèse de l'éthylène (Vanstraelen et Benkova 2012).

III- Cycle cellulaire

Le cycle cellulaire se définit par la succession strictement contrôlée de quatre phases avec deux points de contrôle (G1/S et G2/M). Le déroulement de ces 4 phases est sous le contrôle de facteurs internes et externes tels que les hormones, le sucre, le sel, et la chaleur. Ces stimuli en fonction du type et de leur intensité peuvent bloquer le cycle cellulaire et définissent le devenir de chaque cellule.

Le cycle de division cellulaire est l'un des processus les plus importants pour le développement des plantes. Il a été découvert il y a plus de 150 ans et a fait l'objet de très nombreuses études. Le cycle cellulaire est constitué de plusieurs étapes hautement régulées et synchronisées qui mènent à la production de deux cellules filles à partir d'une cellule mère. Après la perception d'un signal externe, la cellule quiescente en phase $\mathbf{G_0}$ entre dans un cycle de division caractérisé par l'enchainement régulier de quatre phases **G1, S, G2, M (Figure 6)**. Durant la première phase $\mathbf{G_1}$, la cellule présente une activité métabolique très importante pour la préparation à l'entrée dans la phase de réplication de l'ADN ou phase **S.** La phase **G1** comprend le point de non-retour (R) qui une fois franchi oblige la cellule à passer à la phase S et à compléter le cycle. En $\mathbf{G_2}$, la cellule synthétise les molécules nécessaires à la division cellulaire (phase **M**, ou mitose). Pendant la mitose, les chromosomes de la cellule mère se répartissent entre les deux cellules filles. Cette phase se divise en quatre étapes : prophase, métaphase, anaphase et télophase.

La mitose ouverte est caractérisée par la rupture de l'enveloppe nucléaire et l'apparition des chromosomes qui se condensent et deviennent alors visibles au microscope photonique. Enfin après la mitose, les cellules peuvent soit, passer en G1, donc dans un nouveau cycle de division, soit entrer en quiescence G0.

1- Les mécanismes de surveillance du cycle cellulaire chez les végétaux :

Le déroulement coordonné du cycle cellulaire est contrôlé par des régulateurs à travers la synthèse et la dégradation des cyclines (CYC) et leur association à des CDK formant des complexes spécifiques à chaque phase mais aussi à travers des régulations par phosphorylation/déphosphorylation des complexes **CDK/CYC** ou leur association avec des inhibiteurs de type **CKI/KRP** (Francis et al., 2007).

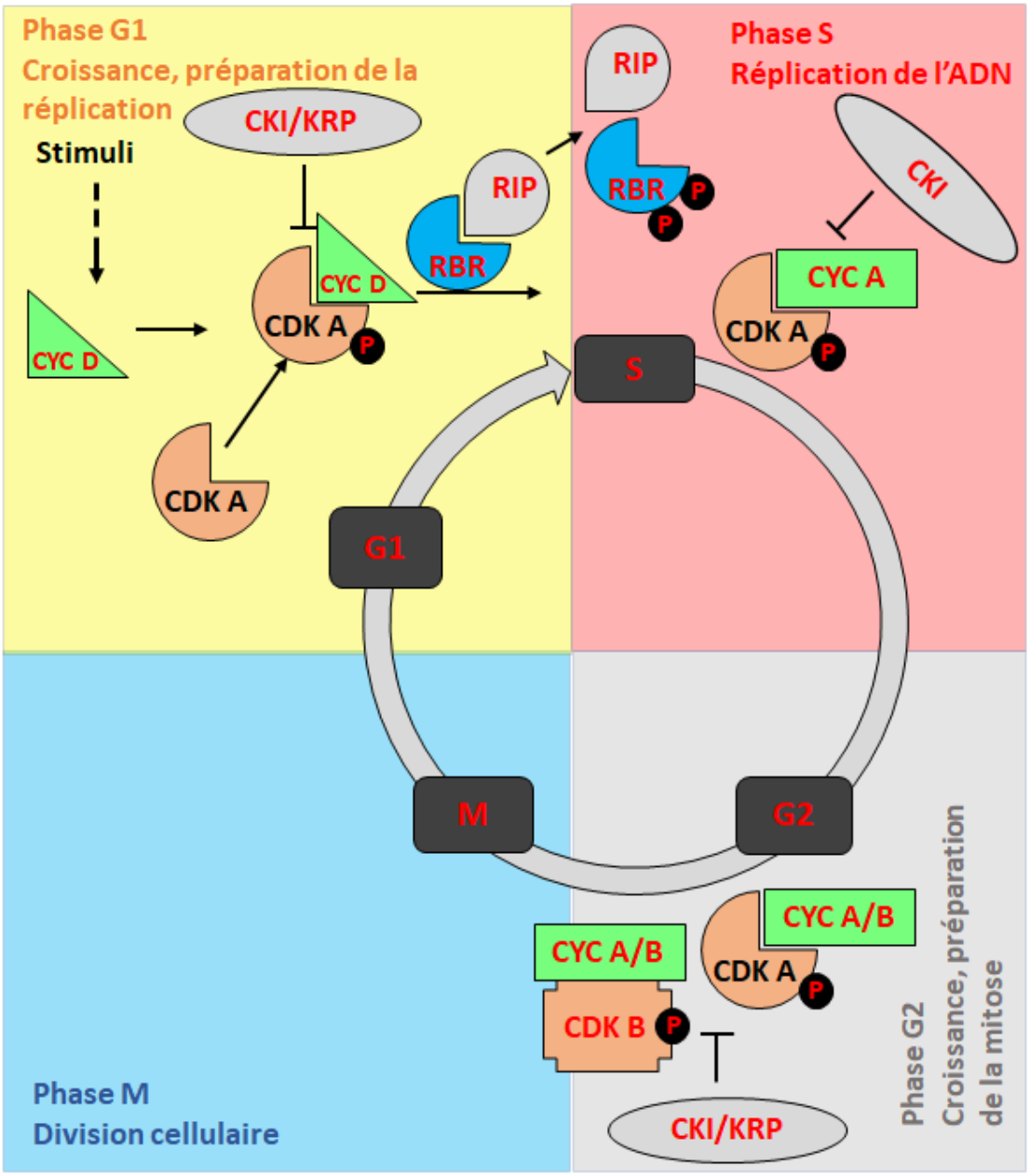


Figure 6 : Contrôle du cycle cellulaire chez les végétaux. Abréviations : CDK : Cyclin dependent kinase, KRP : Kip-related proteins, RB : Retinoblastoma protein, CKI : Cyclin-dependant Kinase Inhibitor, RIP : RBR-Interacting Protein.

La stimulation mitogénique entraîne la synthèse de cyclines de type D, qui s'associent aux **CDK** de type A. Ce complexe phosphoryle la protéine du rétinoblastome (**RBR**), ce qui conduit au relargage de protéines avec lesquelles RBR, dont le facteur de transcription E2F conduisant à l'entrée en phase **S**. La synthèse des cyclines A, lors de la phase **S**, permet la formation de complexes actifs **CDK** de type A/cycline A. A la fin de la phase **S**, les complexes **CDK**/cycline sont inhibés par phosphorylation. Les cyclines B sont synthétisées en $\mathbf{G_2}$ et deux types de **CDK A** et **B** sont actives lors de la transition $\mathbf{G_2/M}$ et s'associeraient toutes deux, aux cyclines B. Leur activation serait permise par la déphosphorylation du résidu inhibiteur tyrosine. Les séquences spécifiques trouvées chez les cyclines A et B suggèrent qu'elles sont dégradées durant la phase **M**. L'arrêt du cycle serait provoqué par l'association de **CKI** avec les cyclines de type A (Francis 2011.) **(Figure 6).**

Les **CDK**s sont une large famille de sérine/thréonine kinases qui catalysent la phosphorylation de protéines cibles lors du cycle cellulaire (Francis 2007). Elles forment un complexe hétérodimérique avec les cyclines, leurs sous unités régulatrices, pour les activer par phosphorylation entrainant un changement conformationnel. Sept **CDK** ont été identifiées chez Arabidopsis et nommées **CDKA** à **CDKF**. Le groupe de **CDKB** est unique aux plantes et contient deux sous classes B1 - exprimée pendant la phase S et B2 - exprimée au moment de transition $\mathbf{G_2/M}$.

1- <u>Contrôle de la transition G1/S et G2/M chez les végétaux :</u>

Le cycle cellulaire possède deux points de contrôles : i) en **G1**, le passage du point R ('restriction point') permet de contrôler l'entrée dans le cycle en fonction des activités stimulatrices ou inhibitrices du cycle et ii) en **G2** où s'effectue le contrôle de l'intégrité du génome.

Après perception d'un signal externe (facteurs de croissances, stresses…) des cyclines de type D s'associent avec **CDKA** pour former un complexe qui régule la transition $\mathbf{G_1/S}$ par la phosphorylation de **RBR**. Cette phosphorylation induit la diminution de l'affinité de **RBR** pour les facteurs transactivateurs **E2Fa-b/DP** jusque-là séquestrés par **RBR** et donc inactifs. Leur libération entraine la transcription des gènes de la transition G1/S et de la phase S (Dyson 1998 ; Sekine et al., 1999 ; Boudolf et al., 2004). L'entrée en mitose nécessite l'activation des CDKs de type A et B (Francis 2011).

La transition G2/M est sous le contrôle de **CDKA** et CDKB en s'associant avec une cycline B par phosphorylation d'un résidu tyrosine des **CDK** (Inze and De Veylder 2006). Une fois les complexes **CDK/CYC** formés, ils phosphorylent diverses protéines cibles qui contribuent à l'entrée en mitose. L'activité des complexes **CDK/CYC** impliqués dans la transition G2/M est également régulée par des phosphorylations inhibitrices des résidus thréonine 14 et tyrosine 15 des **CDK** catalysées par la protéine kinase **WEE1** (Vandepoele et al., 2002) qui est dégradée par le protéasome 26S (Cook et al., 2013).

La progression du cycle cellulaire sous le contrôle du système de dégradation des protéines : l'**A**naphase **P**romoting **C**omplex (**APC**) (Glotzer et al., 1991). L'**APC/C** est un complexe enzymatique qui possède une activité ubiquitine-ligase qui lui permet d'étiqueter les protéines contenant des motifs de dégradation (D-box et KEN-box) avec l'ubiquitine et ainsi les cibler spécifiquement vers la dégradation par le protéasome 26S (Radivojac et al., 2010).

2- Le cycle cellulaire en réponse au stress salin et aux hormones

Le cycle cellulaire peut être contrôlé par des facteurs internes incluant les hormones (Dudits et al., 2011). L'auxine, et les cytokinines sont les principales phytohormones favorisant l'expression des CDK et cyclines soit directement soit à travers divers facteurs de transcription. L'entrée en phase S peut être stimulée par l'addition d'auxine qui active **CDK-A**, **CYC-D1** (Zhipanova et al., 2006). De plus, chez *Medicago*, l'auxine stimule l'entrée en mitose par l'activation de la transcription des gènes **CDKB2** (Zhipanova al., 2006). Chez *Arabidopsis*, l'auxine agirait à travers ARGOS et AXR1 et le facteur de transcription AINTEGUMENTA (ANT) pour stimuler l'expression de la cycline D3 et assurer la maintenance des méristèmes et la prolifération cellulaire (Mizukami et Fisher, 2000 ; Vernoux et al., 2010 ; Dudits et al., 2011). L'expression des CDKA et CDKB est également régulée différentiellement par les cytokinines (Pasternak et al. 2007 ; Nieuwland et al. 2007) ; tandis que l'éthylène stimule la transition **G2/M** par l'activation des gènes **CDKB2-**1 comme cela a été démontré chez *Medicago* (Zhipanova et al., 2006).

D'autre part, les régulateurs du protéasome 26S et de l'APC/C en régulant la dégradation des cyclines participent aussi dans le contrôle du développement. SAMBA, régulateur négatif de l'APC/C cyclosome, régulerait la prolifération cellulaire dans les méristèmes en contrôlant la dégradation des cyclines A2 (Eloy et al. 2012). Le mutant KO *samba* entraine une

augmentation de la taille des méristèmes due à une augmentation de la division et de l'expansion cellulaire (Eloy et al., 2012). La mutation *samba*, mais aussi la sur-expression du récepteur de l'acide gibbérellique *BRI1* ou de *SAUR19* (*Small Auxin Up-regulated RNA*) affectent positivement la croissance foliaire indiquant que SAMBA, BRI1 et SAUR19 jouent des rôles centraux dans les réseaux de signalisations régulant la croissance foliaire (Vanhaeren et al., 2014) contrôlée par diverses hormones.

Les stress abiotiques ont un effet négatif sur la progression du cycle cellulaire et la croissance des plantes. De nombreuses études suggèrent que le stress salin affecte la transition du cycle cellulaire et est capable de l'arrêter à une phase spécifique tout en modulant l'expression des gènes régulateurs du cycle cellulaire (Alexander et al., 2001). Lors d'un stress salin, les **CYC** (**CYCB1;1 et CYCA2;1**) sont fortement touchées avec une chute du niveau de transcription associée à une augmentation de la transcription de l'inhibiteur **CKI/KRP** (Pettkó-Szandtner et al., 2006). Le cycle cellulaire peut être bloqué à la transition G_1/S lorsque les cellules sont exposées à une forte concentration en sel avec une réduction de nombre des cellules actives dans la zone méristématique (West et al., 2004) Le stress salin induit une diminution du niveau d'expression des protéines de contrôle du cycle cellulaire (Burssens et al., 2000, West et al., 2004) (Figure 8). En effet, dans les racines d'*Arabidopsis* exposées à une forte concentration de sel, on observe une diminution du niveau de transcription de gènes essentiels du cycle cellulaire tels que **CDKA** / **CDKB** et **CYC A, B**, cruciales pour la progression et **G_1/S** (Burssens et al., 2000). Les CDKs et Cyclines sont aussi réprimées suite aux irradiations UV ou aux traitements par des éliciteurs fongiques chez *Arabidopsis* (De Veylder et al., 2007). Dans les racines d'*Arabidopsis*, il a été montré que le complexe RBR-SCR est responsable de la protection du centre quiescent du stress génotoxique (Cruz-Ramirez et al. 2013). En outre, à travers les protéines DELLAs, le GA favoriserait l'activité mitotique dans les méristèmes en conditions de stress en modulant l'activité des CDKs (Achard et al., 2009). L'ABA participe à la réduction de la prolifération cellulaire chez l'alfaalfa en réduisant l'activité des CDK (Meszaros et al. 2000) probablement à travers l'induction de l'expression de KRP1 en phase G1 (Wang et al., 1998 ; Del Pozo et al., 2005).

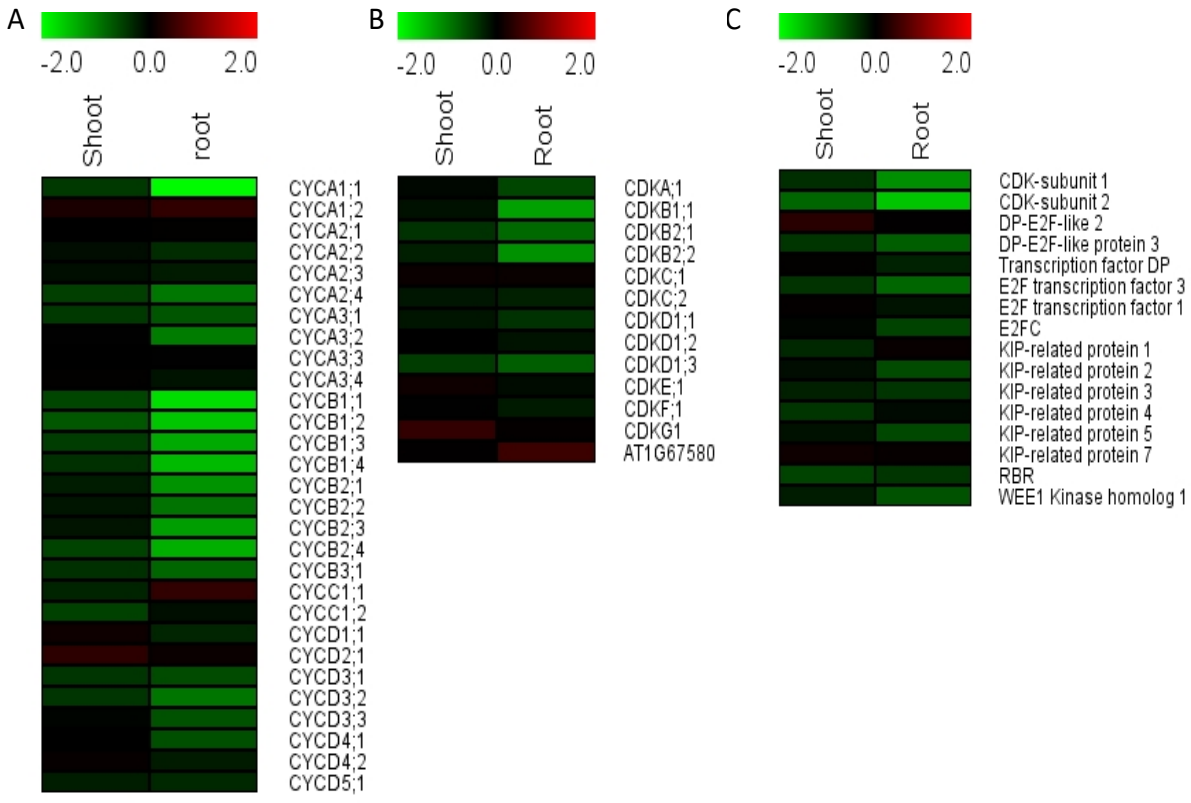


Figure 7 : Effet du stress salin sur l'expression de gènes essentiels pour la régulation du cycle cellulaire au niveau de la racine et de la tige (**Genevestigator®).**

Récemment, RSS1 (RICE SALT SENSITIVE 1), un nouveau composant stimulant le cycle cellulaire lors d'un stress salin a été découvert suite à un criblage génétique d'une population de riz mutagénéisée avec le rétrotransposon *Tos17*. La perte de fonction du gène *RSS1* provoque un nanisme avec des racines chétives et branchées lorsque les plantes sont cultivées en conditions de fortes concentrations salines mais pas en conditions normales (Ogawa et al., 2011). Le mutant *rss1*, possède un phénotype irréversible lorsque les plantules sont exposées à une concentration de 150 mM de NaCl pendant deux semaines. De plus, après un traitement salin les tailles du méristème et de la zone d'élongation sont hautement affectées. La réduction du méristème est associée à une diminution des nombres cellules et à un arrêt du cycle en G1/S.

Le gène RSS1 code pour une protéine de 243 acides aminés, possède des motifs caractéristiques D-Box et DEN-Box, essentiels à sa dégradation via l'APC/C^{cdc20} (Ogawa et al., 2011). **RSS1** interagit avec la protéine **OsPP1a,** une phosphatase de type 1 (Ogawa et al.,

2012) une sérine/thréonine phosphatase impliquée dans une multitude de processus moléculaires incluant la signalisation, l'expression des gènes et le cycle cellulaire. En interagissant avec PP1, régulateur potentiel de la protéine du Rétinoblastome (RBR) qui orchestre la transition G1/S, RSS1 stimulerait la transition G1/S en inhibant l'activité catalytique de PP1. Ceci empêcherait la déphosphorylation de RBR et permettrait le relargage du facteur E2F/DP actif pour une entrée rapide en phase S. RSS1 jouerait ainsi un rôle crucial dans l'interconnexion de la réponse aux stress abiotique et le contrôle de la division.

La protéine RSS1 est conservée chez les monocotylédones, mais pas chez *Arabidopsis*, dont la protéine AT3G14190 ne possède qu'une faible homologie de séquence avec **RSS1** (26%). En 2013, le locus AT3G14190 a été décrit comme étant PATRONUS (**PANS1)** (Cromer et al., 2013 ; Zamariola et al., 2014). Le mutant *pans1-1* (un mutant d'insertion de T-DNA), a été identifié lors d'un criblage de gènes impliqués dans la méiose (Cromer et al.2013, Zamariola et al. 2014). En parallèle, le mutant *cmr1-2* (*COPPER-MODIFIED RESISTANCE 1 ou CMR1*) affecté dans le gène AT3G14190 a été identifié à la suite d'un criblage d'une collection de mutants EMS d'*Arabidopsis* hypersensibles au cuivre. . Le mutant *pans1-1/cmr1-2* présente une réduction de la croissance racinaire de 55 % (Juraniec et al., 2014). associée à une réduction du nombre de cellules de l'apex racinaire montrant que PANS1/CMR1 est requis pour la croissance racinaire en conditions normales et en conditions de stress (Juraniec et al., 2014). La coloration des grains de pollen, montre que le mutant *pans1-1* possède une réduction de la viabilité du pollen, et l'étude de la partie femelle de la fleur montre 20 % de défauts de développement des gamétophytes (Cromer et al., 2013). La déficience gamétophytique résulte de défauts méiotiques : pendant la métaphase I, les chromosomes homologues s'alignent deux à deux mais en revanche en métaphase II, des ségrégations aléatoires des chromatides ont été observées avec la formation de ponts. Ces observations montrent que PANS1 est essentiel pour la cohésion centromérique pendant la méiose chez *Arabidopsis* (Cromer et al., 2013).

IV- Le cytosquelette :

Le Cytosquelette est une structure intracellulaire filamenteuse impliquée dans différentes fonctions cellulaires : la division cellulaire, le transport intercellulaire et à la morphogenèse

Chez les plantes, le cytosquelette est constitué de deux différents polymères protéiques : les filaments d'actine (AF) et les microtubules (MT) :

- les microfilaments d'actines (MF ; de 7 à 8 nm de diamètre et de 17 µm de longueur) situés sous la membrane plasmique sont composés du polymère d'actine F (filament) et du monomère d'actine G (globulaire) (Holmes et al., 1990). Ces filaments sont polarisés et forment des doubles hélices orientées. Les filaments d'actines sont très dynamiques et se polymérisent à l'extrémité (+) et se dépolymérisent du côté (-). Le degré de polymérisation définit la forme globale de la cellule et sa plasticité est nécessaire pour l'endocytose et la division.

- Les microtubules (MT) : Les microtubules sont formés de dimères de tubulines qui sont constitués de deux sous-unités α et β liées par des liaisons non covalentes. Les tubulines ont des structures cylindriques creuse de 25 nm de diamètre. Dans la cellule les microtubules jouent un rôle dans l'architecture de la cellule, la division cellulaire et la ségrégation des chromosomes.

Ensemble les MT et les filaments d'actine forment un réseau très dynamique qui intervient dans différentes activités dans la cellule, *ie.* du cycle cellulaire, la morphogenèse, transduction des signaux à la réponse au stress salin (Wang et al., 2011).

1- Les microtubules : Structure, rôle et dynamique pendant le cycle cellulaire :

a- Structure : Les microtubules sont des hétérodimères α et β tubulines qui interagissent de manière non covalente pour former une structure cylindrique d'environ 25 nm de diamètre. Les hétérodimères s'assemblent pour former 13 protofilaments. L'orientation des dimères de tubulines confère une polarité aux microtubules :l'extrémité positive contient des β tubulines tandis que les α tubulines sont du côté négatif (Kollman et al., 2011) (Figure 8).

En contexte cellulaire la dynamique des microtubules est liée à leur polymérisation, son assemblage, et à leur nucléation qui s'effectue dans des sites spécialisés et permettent de catalyser l'assemblage des MT à une concentration physiologique d'α et β-tubulines. Les MT sont stabilisées par des protéines **MAP** (**M**icrotubule-**A**ssociated **P**rotein). Chez les plantes la nucléation des MT peut se faire à trois niveaux : l'enveloppe

nucléaire (Canaday et al., 2000), la membrane plasmique (Chan et al., 2003) et au niveau des microtubules existants (Murata et al., 2005). La polymérisation des microtubules se fait à partir de l'extrémité négative au niveau de sites de nucléation spécialisés ou centre organisateur **MTOC** (**M**icro**T**ubules **O**rganizing **C**enter), lorsque la concentration des α-β tubuline atteint 2 µM dans la cellule.

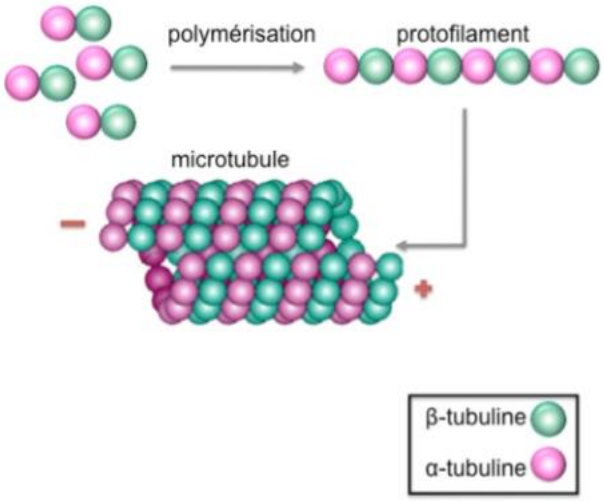


Figure 8 : Structure des microtubules, l'hétérodimère α et β tubulines forment le protofilament. L'assembage de treize protofilaments forment un microtubule d'environ 25 nm de diamètre (Kollman et al., 2011).

b- Dynamique des microtubules pendant le cycle cellulaire : Dans la cellule l'organisation et la distribution des microtubules changent au cours du cycle cellulaire. Au cours de l'interphase, les microtubules sont répartis dans tout le cortex cellulaire, orientés perpendiculairement à l'axe d'élongation cellulaire (Canaday et al., 2004). Avant la rupture de la membrane nucléaire, les microtubules forment le 'pre-prophase band' en début de G2. Ensuite le fuseau est formé et les microtubules se concentrent au niveau de deux pôles. Après la ségrégation des chromosomes, les microtubules se concentrent aux zones médianes de la cellule pour former le phragmoplaste (Canaday et al., 2004). (Figure 9)

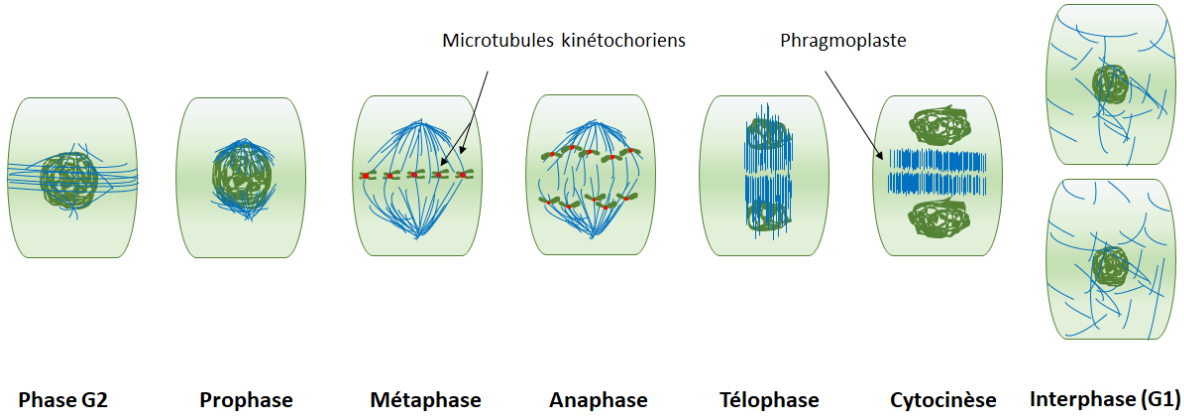


Figure 9 : Dynamique des microtubules au cours du cycle cellulaire et de la division. Les microtubules corticaux (en bleu) forment l'anneau préprophasique (phase G2), profuseau (prophase), fuseau (Métaphase), apparition des microtubules kinétochoriens et interpolaires (Anaphase). En télophase les microtubules forment le phragmoplaste pour donner deux cellules filles par la suite (Masoud et al., 2013).

c- **Le complexe de nucléation des Microtubules ɣ-TuSCs et ɣ-TuRCs :** La nucléation des microtubules nécessite la ɣ-tubuline, protéine hautement conservée chez tous les organismes. Dans la cellule végétale, la ɣ-tubuline est détectée au niveau de l'enveloppe nucléaire (Erhardt et al., 2002), dans les deux pôles du fuseau mitotique, dans le phragmoplaste et sur les microtubules kinétochoriens (Liu et al., 1993 ; Binarová et al, 2003). La ɣ-tubuline est présente dans un complexe protéique pour former le complexe ɣ-TuSC (ɣ-tubulin Small Complex), complexe tétramérique formé par deux molécules de ɣ-tubulines associées à deux protéines GCP2 et GCP3 (Gamma-tubulin Complex Proteins) (Oegema et al, 1999) (Figure 10).

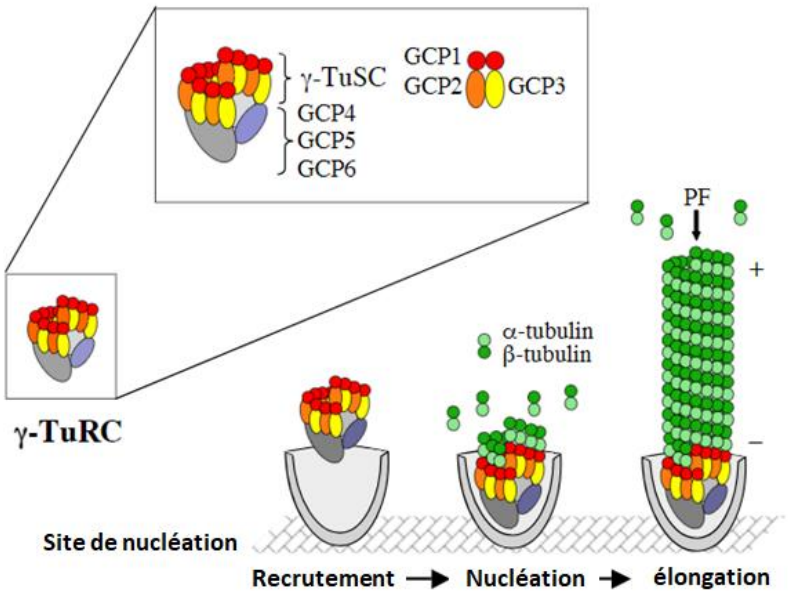


Figure 10 : Composition et fonctionnement du complexe ɣ-TuRCs dans la formation des MT (Canaday et al., 2004).

L'association de plusieurs sous-unités de γ-TuSCs avec les protéines GCP4, GCP5 et 6 forment la γ-TuRCs. La présence du γ-TuRCs permet une meilleure stabilité des MT, puisqu'il stabilise l'extrémité (-) (Anders and Sawin 2011).

d- **GIP1 ou GCP3-Interacting Protein 1 :** la protéine GIP1 a été découverte suite au criblage d'une banque double hybride de cDNA d'*Arabidopsis* afin d'identifier des protéines interagissant avec la protéine GCP3. L'interaction directe de GIP avec GCP3a été confirmée par GST-pull down (Janski et al., 2012). L'homologue humain de GIP1 nommée MZT1 (Mitotic Spindle OrganiZing protein 1) est associé aux γ-TuRCs (Hutchins et al., 2010). Il existe 2 protéines GIP, GIP1 et GIP2 chez *Arabidopsis* et chez la plupart des plantes (Janski et al., 2012). Les protéines GIPs sont des petites protéines multifonctionnelles impliquées d'une part dans la stabilité des réseaux mitotiques (Janski et al., 2012), d'autre part dans la régulation de l'architecture nucléaire et la cohésion centromérique (Batzenschlager et al., 2013, 2015).

OBJECTIFS DE LA THESE

TdRL1 : UN NOUVEL ACTEUR DANS LA REPONSE AU STRESS ABIOTIQUE AU CŒUR DU CYCLE CELLULAIRE

Le **L**aboratoire de **B**iotechnologies et d'**A**mélioration des **P**lantes (**LBAP**) du Centre de Biotechnologie de SFAX-TUNISIE a comme objectif de développer de nouvelles variétés de céréales plus résilientes face aux contraintes environnementales par l'identification et la caractérisation fonctionnelle de gènes impliqués dans la tolérance aux stress abiotiques. La compréhension des mécanismes de tolérance du blé au stress abiotique est une nécessité économique en Tunisie car le blé tendre (*T. aestivum*) et le blé dur (*T. durum*) y sont les espèces céréalières les plus consommées. Les rendements annuels des cultures tunisiennes sont insuffisants pour couvrir la consommation des tunisiens qui atteint 204 kg/an/personne (d'après « Statistique Tunisie » : http://www.ins.nat.tn/) et nécessite une importation de blé conséquente. Or, ces espèces sont sensibles à la sècheresse et à la salinité causant une perte de rendement variant de 10 à 80% dans la région méditerranéenne à climat semi-aride voire aride (Nachit et al., 1998), ainsi qu'une une perte de 50% de la production mondiale (Bray et al., 2000). Les effets néfastes de la salinité sur la croissance des plantes sont souvent dus au faible potentiel osmotique de la solution du sol et au niveau élevé de toxicité du sodium entrainant des perturbations multiples des plantes aux niveaux moléculaires, biochimiques et physiologiques (Yamaguchi and Blumwald, E 2005). Les plantes étant sessiles se doivent de maintenir leur viabilité et leur prolifération malgré les contraintes environnementales en contrôlant strictement la division cellulaire.

Récemment, l'équipe s'est intéressée aux relais moléculaires liant le contrôle du développement de la plante et la réponse au stress à la suite de l'identification de RSS1 (Rice Salt Sensitive 1) chez le riz. RSS1 a un rôle dans la régulation du cycle cellulaire au niveau de la transition G1/ S et le maintien de l'activité méristématique au cours du stress abiotique et plus particulièrement la salinité chez le riz (Ogawa et al., 2011).

Ainsi, j'ai cherché à explorer les différentes voies de régulation RSS1-like chez le blé, notamment grâce à l'identification de l'homologue de RSS1 chez le blé, TdRL1 et à sa caractérisation fonctionnelle. Par ailleurs, les Protéines GIP/MZT caractérisées chez

Arabidopsis dans l'équipe d'AC Schmit de l'Institut de Biologie Moléculaire des Plantes du CNRS (IBMP, CNRS UPR2357) participent à l'organisation du méristème, à la stabilité génomique et la maintenance de l'architecture nucléaire (Batzenschlager et al., 2013, 2015). Une interaction GIP avec une ascorbate peroxydase cytoplasmique (APX1) et l'accumulation d'espèces d'oxygènes réactives (ROS) dans les mutants *gip1gip2* suggèrent que ces protéines soient également impliquées dans la transduction des signaux vers le noyau à la suite d'un stress.

L'objectif de la thèse est ainsi de caractériser la voie signalétique entre la perception du stress et le contrôle du cycle cellulaire par la détermination du rôle des protéines RSS1-like et GIP dans la régulation du cycle cellulaire en présence de stress salin.

Le manuscrit est constitué de quatre chapitres :

Chapitre I : Etude *in silico* de la famille RSS1-Like chez les plantes : L'objectif du chapitre et de montrer la conservation des RSS1-like chez les plantes grâce à des études phylogénétiques, des alignements de séquences, des prédictions bio-informatiques et des analyses transcriptomiques. L'ensemble des études a permis de caractériser les différents orthologues de RSS1 chez les Poacées et aussi chez *Arabidopsis*, d'étudier leurs caractéristiques physico-chimiques et d'identifier les réseaux putatifs d'interaction.

Chapitre II : Isolement et caractérisation de TdRL1, l'homologue de RSS1 chez le blé : Après une analyse détaillée des caractéristiques biochimiques, je me suis intéressé dans ce deuxième chapitre au rôle de TdRL1 dans la réponse au stress salin et ce par la sur-expression de la protéine chez la levure et l'étude de sa localisation par expression transitoire dans des cellules de tabac.

Chapitre III : Etude fonctionnelle de TdRL1 *in planta* : Dans le but de déchiffrer la fonctionnalité de TdRL1 des plantes transgéniques qui sur-expriment TdRL1 dans différents fonds génétiques d'*Arabidopsis* et de riz ont été générées pour voir son implication dans la tolérance au stress salin. Des analyses physiologiques et moléculaires permettent de mettre

en évidence le rôle de TdRL1 dans la régulation de la réponse à la salinité via l'activation du système antioxydant

Chapitre IV : Isolement de *TdGIP1* (Triticum durum GCP-Interacting Protein 1) : Parce qu'un lien existerait entre GIP et les RSS1-like dans la réponse au stress salin, j'ai isolé l'homologue de la protéine AtGIP1 à partir d'une variété tunisienne de blé dur. Ultérieurement, l'étude d'une possible interaction fonctionnelle avec TdRL1 sera envisagée.

Chapitre I

Etude in silico de la famille RSS1 chez les plantes

ETUDE *IN SILICO* DE LA FAMILLE RSS1 CHEZ LES PLANTES

Introduction :

La réponse des plantes aux stress abiotiques est très complexe et fait intervenir des cascades de signalisation aboutissant à diverses modifications adaptatives. La protéine **RSS1** identifiée chez le riz par Ogawa et al. en 2011 est décrite comme une nouvelle protéine qui ne présente aucune homologie avec des protéines de fonction connue mais qui joue un rôle essentiel dans la réponse au stress salin en préservant les méristèmes des effets délétères du stress sur la division des cellules totipotentes.

RSS1 est hautement conservée chez les Monocotylédones et semble être absente des Eudicotylédones comme *Arabidopsis*, mais présente chez des gymnospermes, mousses et angiospermes comme *Amborella trichopoda*. Au niveau protéique la séquence de **RSS1** contient des domaines hautement conservés comme les DEN-Box, D-box/D-box-like qui sont des éléments clés pour la régulation post-traductionnelle de **RSS1** par dégradation via l'APC/C^{cdc20} cyclosome (Ogawa et al., 2011). En revanche le domaine WAGE est moins bien conservé et de rôle inconnu. Le motif RVxF a été identifié comme essentiel à la liaison à une protéine phosphatase de type 1 (Ogawa et al., 2011, 2012).

L'étude du mutant d'insertion *rss1* a permis de suggérer que la protéine **RSS1** contrôlerait la progression en G1/S du cycle cellulaire en interagissent avec une **P**rotéine **P**hosphatase de type **1** (**PP1**). Le mutant ne possède aucun phénotype et se développe normalement en absence de stress mais il est hypersensible au stress salin et osmotique : la plante est naine et le développement des racines est altéré (Ogawa et al., 2011). Sous l'effet du sel, la plante naine montre une diminution du taux de division cellulaire dans les méristèmes indiquant un rôle essentiel de la protéine **RSS1** dans le maintien de l'activité méristématique en conditions de stress. En outre, l'analyse transcriptomique du mutant *rss1* en conditions salines montre une augmentation de l'expression des gènes de réponse aux stress, de facteurs de transcription et de gènes codant pour des osmoprotecteurs. Cette augmentation

est concomitante à une diminution du taux d'expression des gènes intervenant dans la réplication et le contrôle du cycle cellulaire (Ogawa et al., 2011).

I- Identification et caractérisation de la famille RSS1-like chez les Poacées :

1- Identification de l'homologue de RSS1 chez le blé dur :

La protéine **RSS1** ayant été décrite chez le riz uniquement, nous nous sommes intéressés à caractériser ses homologues chez les Poacées, notamment chez le blé dur. Un cDNA de blé tendre (*Triticum aestivum*) disponible dans la base de données **TIGR** (http://www.jcvi.org/wheat/index.php ; TA75750_4565), code pour une protéine montrant une forte homologie de séquence protéique avec **RSS1** et a donc servi de base pour l'isolement du cDNA de blé dur. Des amorces choisies sur l'EST TA75750_4565 de blé tendre présent dans les bases de données a permis d'amplifier deux fragments de 1 kb à partir de cDNAs issus des variétés tunisiennes de blé dur Oum Rabiaa3 et Mahmoudi.

```
TdRL1   1  MAFPAPAAVFLDENLPIHRGKRTDGLNARPLKPSAKPSARKALRDVSNTSKPQAPSIQKG  60
           MAFPAPAAVFLDENLPIHRGKR*DGLNARPLKPSAKPSARKALRDVSNTSKPQAPSIQKG
TaRL1   1  MAFPAPAAVFLDENLPIHRGKRADGLNARPLKPSAKPSARKALRDVSNTSKPQAPSIQKG  60
                     DEN-BOX                          D-BOX

TdRL1  61  HPLKDRSVLKDKSALRSQEAIKKNPLSKTTIYADEATKKCHEWAKGGVECTHFTGNDAQR  120
           HPLKDRSVLKDKSALRSQEAIKKNPLSKTTIYADEATKKCHEWAKGGVECTHFTGNDAQR
TaRL1  61  HPLKDRSVLKDKSALRSQEAIKKNPLSKTTIYADEATKKCHEWAKGGVECTHFTGNDAQR  120
                                                 WAGE-Domain

TdRL1 121  LDSDKIDKRVKKKVEKITSALHDWSDVIFDPLLFPAKAVAPFYEEVNVLELEPEILPDIS  180
           LDSDKIDKRVKKKVEKITSALHDWSDVIFDPLLFPAKAVAPFYEEVNVLELEPEILPDIS
TaRL1 121  LDSDKIDKRVKKKVEKITSALHDWSDVIFDPLLFPAKAVAPFYEEVNVLELEPEILPDIS  180

TdRL1 181  GRLSISGDKAKLTEDSFDEVELDSYSFLEDKPVEFQLRDEMSLYPWSLESVN  232
           GRLSISGDKAKLTEDSFDEVELD**SFLEDKPVEFQLRDE*S*YPWSLESVN
TaRL1 181  GRLSISGDKAKLTEDSFDEVELDCCSFLEDKPVEFQLRDEISRYPWSLESVN  232
```

Figure 11 : Alignement des séquences peptidiques de **TdRL1** (blé dur) et **TaRL1** (issu de la base de données **TIGR** : TA75750_4565) du blé tendre. Les acides aminés surlignés en bleu sont polymorphiques. Les acides aminés surlignés en jaune, vert et rouge représentent les acides aminés des motifs **DEN**, **D-box** et **WAGE** respectivement (alignement réalisé avec **Mega6 (**http://www.megasoftware.net/).

L'analyse des séquences obtenues a montré une identité de 100 % entre les deux cDNAs de blé dur et une identité de 99% avec l'EST de blé tendre. Seuls 5 acides aminés (colorés en bleu), diffèrent entre les séquences protéiques de blé tendre et de blé dur. Ces modifications ne concernent pas les acides aminés des motifs DEN, D-BOX et WAGE décrits par Ogawa et al. (2011), qui sont des motifs essentiels pour la régulation post-

traductionnelle de **RSS1** par le protéasome. Les cDNAs isolés ont une identité de 80% avec celui de RSS1. L'homologue de **RSS1** chez le blé dur nommé **TdRL1** (***T**riticum **d**urum***RSS-**L**ike**1**), présente **68%** d'homologie avec **RSS1** au niveau protéique.

2- Conservation des protéines RSS1-like chez les Monocotylédones :

Douze protéines homologues à **TdRL1 et RSS1** ont été identifiées chez les monocotylédones à partir de la base de données **UniProt** (http://www.uniprot.org/). Les numéros d'accession, et les séquences génomiques ont été obtenues à partir de Ensembl Genome (http://www.ensembl.org/index.html).

Toutes les protéines des Poacées identifiées ont une masse moléculaire similaire allant de 25.51 kDa (*Brachypodium distachyon*, 229 aa) à 28.14 kDa (*Setaria italica*, 248 aa, Tableau 1). D'autres propriétés physico-chimiques telles que les points isoélectriques sont conservées et varient entre 6.18 (*Setaria italica*) et 9.57 (*Hordeum vulgare,* Tableau 1).

Protéine	Accession	% d'identité *	(aa)	MM**	Index d'hydrophobicité ***
Triticum durum : TdRL1	AIP89948.1	-	232	25,891	0,430
Triticum urartu	EMS47367.1	98.0%	232	25,896	0.431
Triticum aestivum	W5G815-1	98.0%	232	25,896	0.431
Aegilops tauschii	EMT31368.1	100%	232	25,891	0.432
Hordeum vulgare	BAK07257.1	94.0%	232	25,970	0.430
Brachypodium distachyon	XP_003575314.1	80.0%	229	25,518	0.431
Oryza Brachyantha	XP_006647477.1	60.0%	243	27,198	0.418
Oryza Japonica : RSS1	NP_001047380.1	59.0%	243	27,264	0.412
Oryza glaberrima	A3A8W0	59.0%	243	27,260	0.403
Oryza Indica	EAY86615.1	59.0%	230	25,930	0.403
Sorghum bicolor	XP_002454142.1	52.0%	249	27,877	0.410
Zea mays	NP_001142736.1	48.0%	248	27,801	0.414
Setaria italica	XP_004962143.1	55.0%	248	28,149	0.403

Tableau 1 : Protéines RSS1-like des Poacées et leurs propriétés physico-chimiques. Les % d'identité indiqués sont calculés par rapport à **TdRL1**. La Masse Moléculaire (****MM**), est calculée avec **ProtParam** (http://web.expasy. org /cgi-bin/protparam/protparam), (*****l'indice d'hydrophobicité**) est estimé par **FoldIndex** (http://bip.weizmann.ac.il/fldbin/findex)

De plus, toutes les protéines sont hydrophobes avec un indice d'hydrophobicité égale à 0.4, ce qui est caractéristique des protéines intrinsèquement désordonnées (voir tableau 1).

L'alignement des séquences en acides aminés des différentes protéines RSS1-like identifiées montre clairement l'existence de motifs conservés (Figure 12). Ogawa et al. (2011) a décrit la présence dans RSS1 de trois motifs conservés nommés D et DEN et WAGE qui sont bien conservés chez TdRL1 et chez les orthologues des Poacées (Figure 12). Liées à cdc20, les boîtes D et DEN sont responsables d'un contrôle post-traductionnel via une dégradation de RSS1 par l'APC cyclosome en fin de mitose (Ogawa et al. 2011). La préservation de ces deux motifs chez les graminées suggère fortement que toutes les protéines RSS1-like pourraient être contrôlées par l'APC/C^{cdc20} au niveau post-traductionnel.

Une analyse plus détaillée de la séquence d'acides aminés de TdRL1 avec les autres protéines de type RSS1 a révélé la présence de cinq motifs conservés supplémentaires qui n'ont pas été rapportés pour RSS1 mais qui ont été confirmés en utilisant l'outil MEME (Bailey et Elkan 1995) nommés ci-après GP, Lys, SW, Glu et LE (Figure 12). Ces motifs sont également conservés en taille et en position le long de la séquence primaire de toute la famille RSS1-like (Figure 12). Ces régions ont été soumises à UniProt, Pfam (Finn et al., 2013), ou BLAST (Altschul et al., 1990) et aucune relation structure-fonction n'a pu être assignée à aucun des cinq motifs. La signification biologique de ces motifs conservés pour la fonction de RSS1 reste donc inconnue.

De plus, RSS1 est capable de se lier à une protéine phosphatase de type 1 (OsPP1a, Ogawa et al., 2011, 2012). Les protéines interagissant et régulant les PP1 présentent un motif commun appelé RVxF motif (en détail [RK] x [IV] x [FW]). Ce motif RVxF favorise la liaison à une cavité hydrophobe de PP1 (Bollen et al., 2010) qui déclenche une régulation positive ou négative de l'activité PP1 ou contrôle sa localisation subcellulaire (Bollen et al., 2010). Quatre-vingt-dix pour cent des protéines interagissant avec PP1 contiennent le motif d'ancrage RVxF, mais d'autres motifs comme SILK ou MyPhoNE peuvent également être trouvés dans une moindre mesure (Bollen et al., 2010, Heroes et al., 2013).

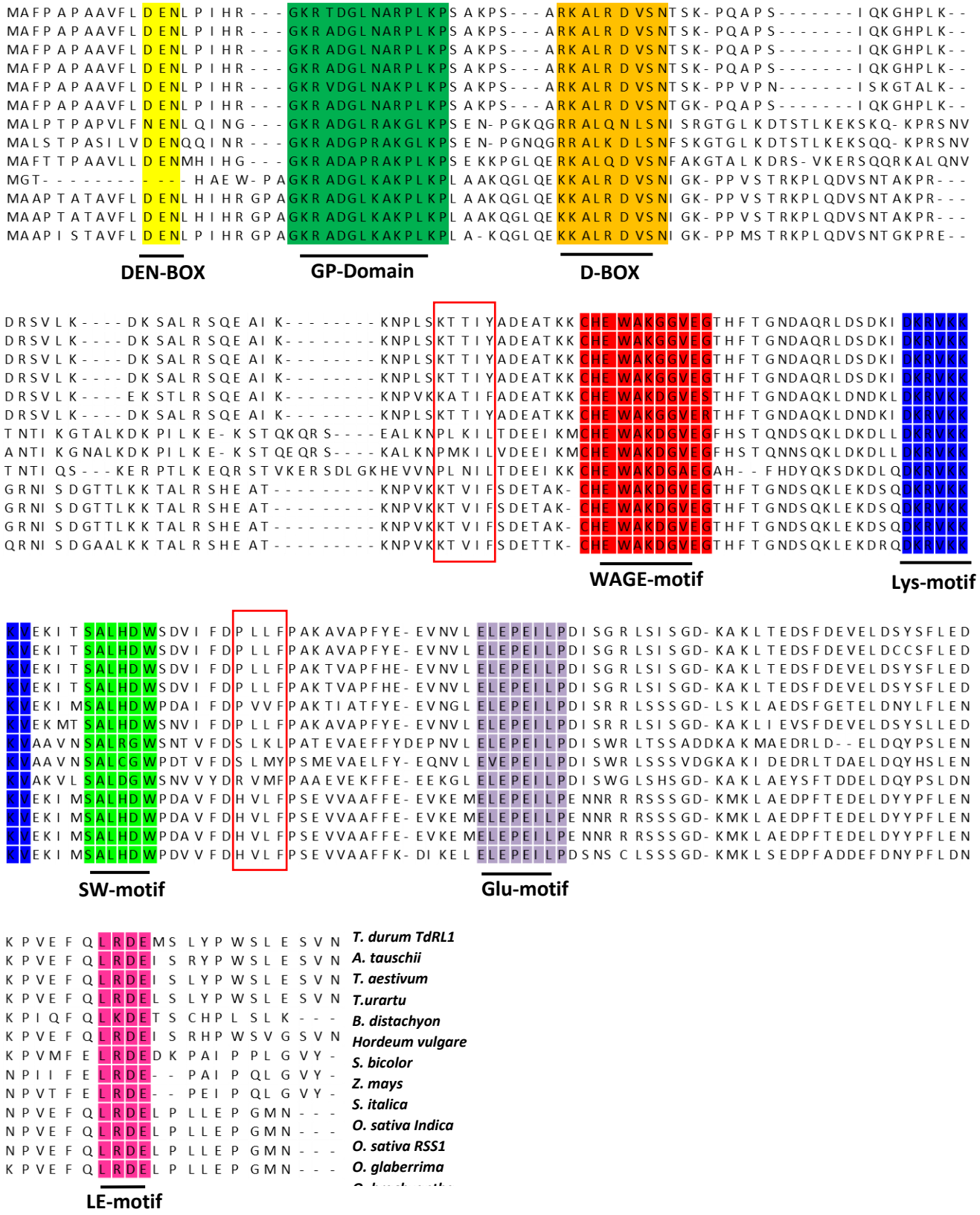


Figure 12 : Alignement multiple des séquences protéiques homologues à RSS1/**TdRL1** issues de plantes monocotylédones, effectué par le logiciel **MEGA** (MEGA, version 6.2). Les domaines conservés DEN-Box, D-box, WAGE et Lys –sont colorés et soulignés en noir. Les motifs **KTVIF** et **HVLF** de fixation aux **PP1** sont entourés de rouge.

Dans RSS1, Ogawa et al. (2012) décrit deux motifs RVxF: KTVIF (aa 103-107) et HVLF (aa 165-168). Aux mêmes positions dans TdRL1, ces motifs ne sont que faiblement conservés (boîtes rouges, Figure 12) et n'ont pas été reconnus comme consensus RVxF en utilisant ScanProsite (De Castro et al., 2006). Cependant, les recherches de motifs utilisant le motif [RK] x [IV] x [FW] sur TdRL1 conduit à l'identification d'un motif KPVEF à la position 211-215 (Figure 12). Lorsque la recherche a été étendue à d'autres RSS1-like des Pooideae, ce motif est conservé en séquence et en position mais plus divergente chez les Ehrartoideae comprenant le riz.

3- Etude phylogénique et propriétés structurales des protéines RSS1-like 1 :

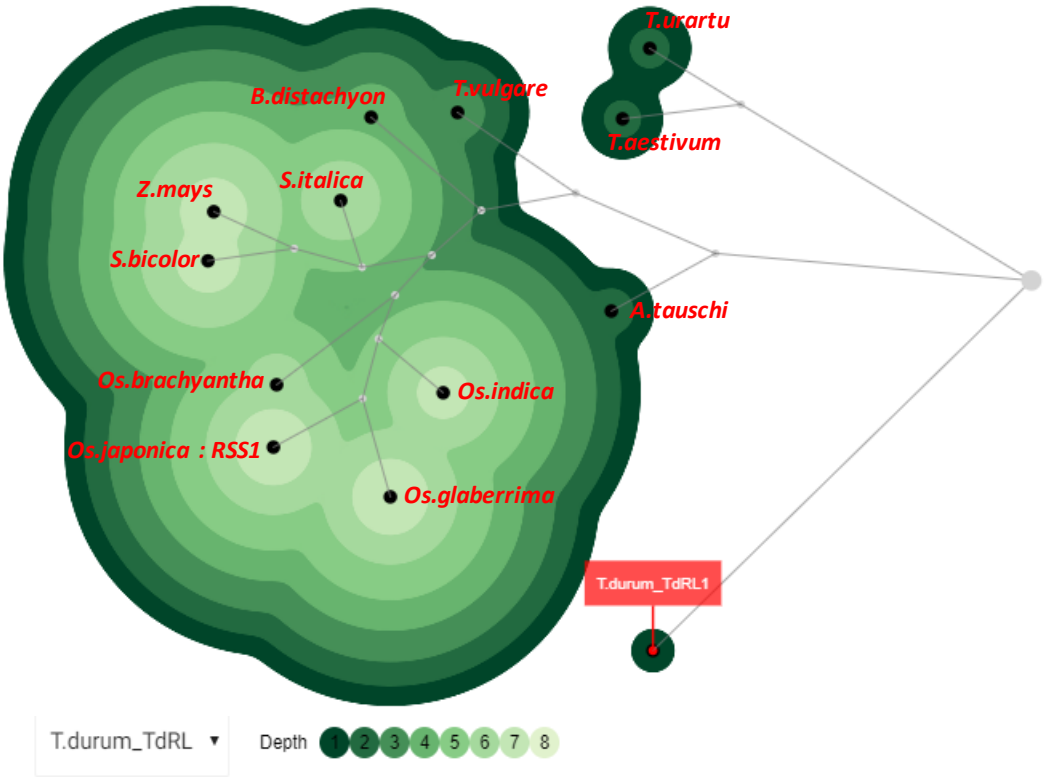


Figure 13 : Arbre Phylogénétique effectué avec **(MEGA6.2)** qui montre la relation entre les différentes protéines homologues à **TdRL1** de la famille des Poacées. La visualisation de l'arbre est faite avec Topo-phylogeny (http://bar.utoronto.ca/Topo-phylogeny/) qui permet de visualiser chaque nœud en tant que point sur une carte bidimensionnelle, avec le placement, la couleur environnante et la distance des autres nœuds. Les formes de contour topographiques indiquent les nœuds liés. Les écarts entre les grappes indiquent des clades d'une lignée différente.

L'étude phylogénétique s'est focalisée sur les séquences issues de plantes monocotylédones de la famille des Poacées. La plus grande homologie de TdRL1 est

observée avec les séquences d'*Aegilops* et de *Triticum urartu (***98 %***),* ancêtres du blé. Ce résultat est confirmé par l'arbre phylogénétique (Figure 13) réalisé à partir de l'alignement de l'ensemble des séquences protéiques disponibles dans les bases de données.

Cette analyse phylogénétique montre que les séquences des différentes variétés de blé et d'orge forment un groupe en deux sous classes spécifiques à ces deux céréales. Cependant, les séquences les plus proches de **TdRL1** sont des séquences putatives non identifiées au niveau moléculaire et dont aucune information n'est disponible. Par ailleurs, TdRL1 est plus proche du riz que du maïs et du sorgho.

4- Structure tridimensionnelle de TdRL1 et des RSS1-like :

Les compositions en acides aminés des RSS1-like montrent une richesse en acides aminés polaires et chargés indiquant que toutes les protéines RSS1-like pourraient, tout comme **RSS1,** être thermostables à 100°C (Ogawa et al. 2012) et faire partie des **IUP/IDP** ou protéines intrinsèquement non structurées. En effet les RSS1-like sont riches en Ser (5-10%), Glu (7-11 %), Pro (7%), résidus associés au désordre, et dépourvues en Tyr, Trp et Cys (Voir Figure 14).

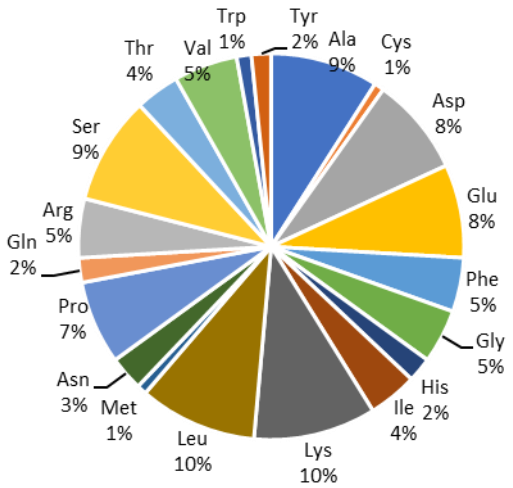


Figure 14 : Composition en Acides aminées de TdRL1.

Les prédictions de structure tridimensionnellede **TdRL1** montrent effectivement que celle-ci n'est pas structurée (**FoldIndex©** ; http://bip. Weizmann .ac. il/ fldbin/findex, Tableau

1). On remarque que les autres protéines RSS1-like sont également largement désordonnées (les 2/3 des protéines sont sans structure). Le tiers structuré de **RSS1** et de ses homologues est constitué d'hélices α (entre 32 à 44 %) et d'enroulements (49 à 61 %), (Pole Rhone-Alpes de Bioinformatique :(https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa seccons.html). En effet, en utilisant le serveur Pôle Bioinformatique lyonnais GOR IV (Garnier et al., 1998) (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sspred.html) nous avons pu voir que 31,9 % de TdRL1 est partiellement structurée en hélice α (voir Figure 15).

```
         10        20        30        40        50        60        70
          |         |         |         |         |         |         |
MAFPAPAAVFLDENLPIHRGKRTDGLNARPLKPSAKPSARKALRDVSNTSKPQAPSIQKGHPLKDRSVLK
cccccccchhhcccccccccccccccccccccccccchhhhhhhhhcccccccccccccccccccchhhh

DKSALRSQEAIKKNPLSKTTIYADEATKKCHEWAKGGVEGTHFTGNDAQRLDSDKIDKRVKKKVEKITSA
hhhhhhhhhhhhcccccccceeeehhhhhhhhhccccccceeeeccccccchhhhhhhhhhhhhhhheeeee

LHDWSDVIFDPLLFPAKAVAPFYEEVNVLELEPEILPDISGRLSISGDKAKLTEDSFDEVELDSYSFLED
ccccccceeccccccccccccccchhhhcccccccccccccccccceeccccccccccccccchhhhhhhhhccc

KPVEFQLRDEMSLYPWSLESVN
cchhhhhhhhceeccceeeeeec
```

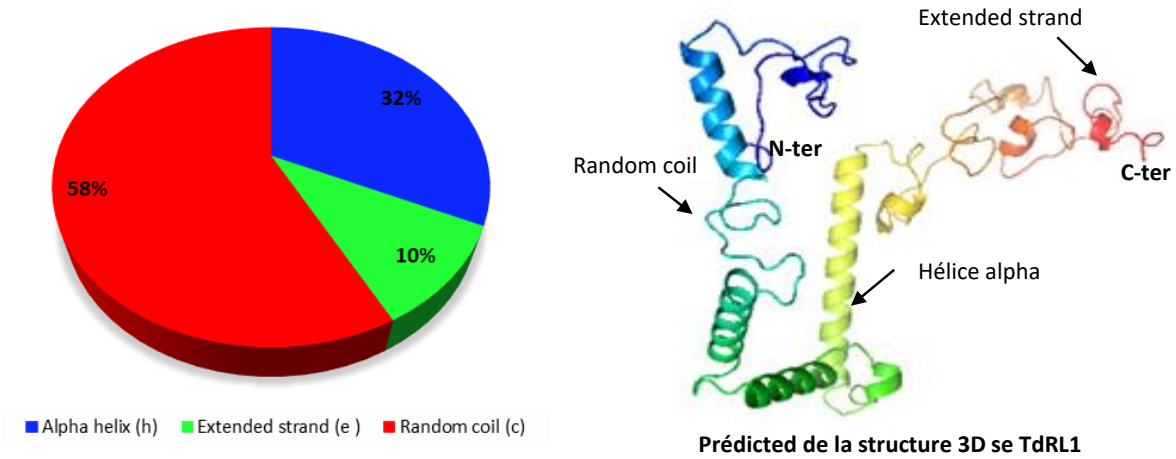


Figure 15 : Prédiction de la structure de TdRL1 obtenue par le logiciel GOR IV (Garnier et al., 1998). L'analyse de structure secondaire montre que 58 % de TdRL1 sont des enroulements aléatoires démontrant la flexibilité de la structure 3D de la protéine.

Ces résultats nous ont encouragé à pousser l'étude vers la recherche de la structure 3-D. Nous avons débuté par la recherche d'homologues structuraux dans la base de données Protein Data Bank protein (http://www.ebi.ac.uk/pdbe/). L'homologue structural le plus proche ayant 24 % d'identité est la phosphoglycérate déshydrogénase de Mycobactérium (PDB 1YGY_A). Grâce au serveur de prédiction SCRATCH Protein Predictor (http://scratch.proteomics.ics.uci.edu/) et en choisissant la commande 3Dpro, le modèle suivant représenté dans la figure 16 a été suggéré. Le modèle généré reste une prédiction et n'atteint pas la fiabilité des méthodes physiques tels que la RMN et la cristallographie mais constitue une base qui peut nous aider à évaluer le rôle de TdRL1 comme protéine intrinsèquement désordonnée.

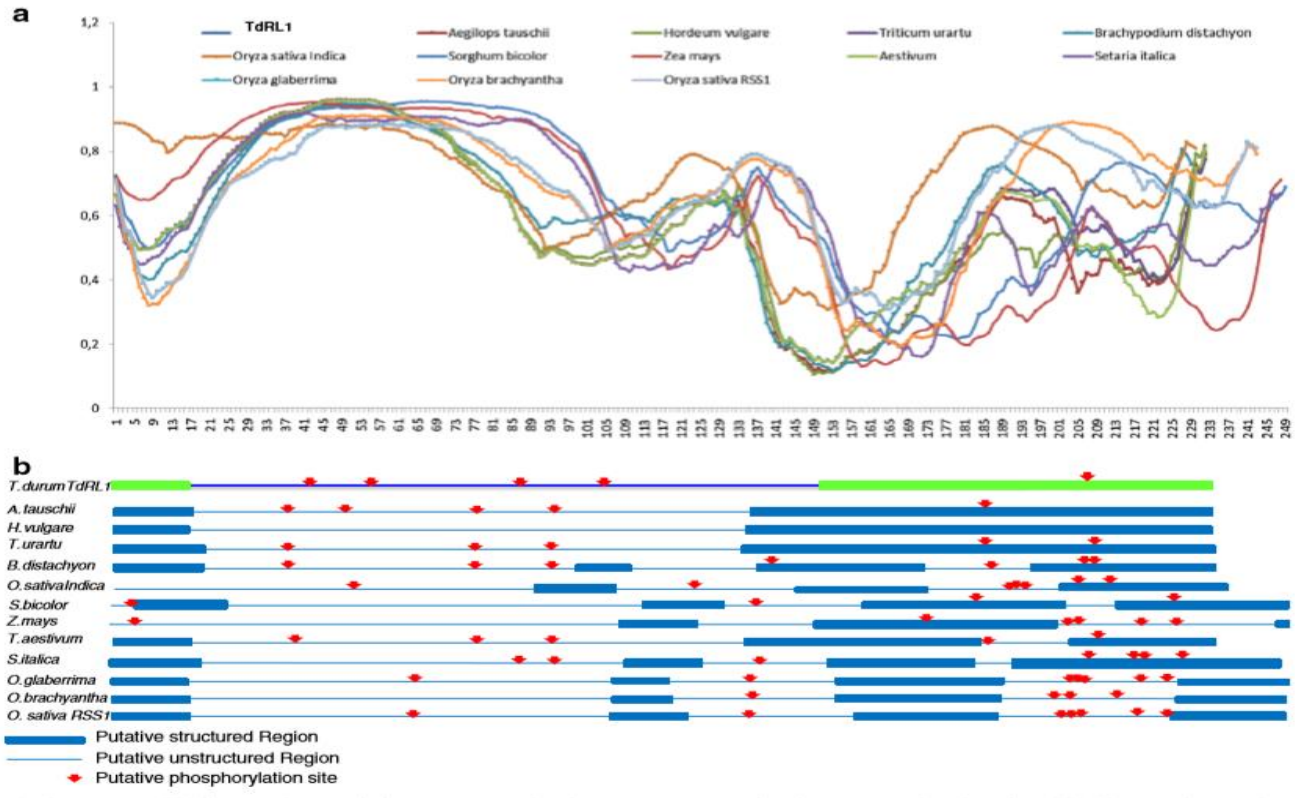


Figure 16 :(A) Analyse avec **PONDR-FIT** (http://disorder.compbio.iupui.edu/) par la détermination du score VSL2B. L'analyse se base sur les propriétés structurales des protéines homologues à TdRL1 qui montre les régions non structurées dans la séquence protéique lorsque le score est supérieur à 0.5. (B). Corrélation entre la répartition des sites de phosphorylation et les zones désordonnées dans les séquences protéiques des RSS1-Like.

Les **IUP/IDP** sont généralement solubles et n'ont pas de structure tridimensionnelle particulière sauf lorsqu'elles entrent en interaction avec d'autres facteurs comme une autre protéine par exemple. Ces protéines se situent à mi-chemin entre les protéines globulaires très bien définies et les protéines dénaturées qui ont perdu leur structure et qui laisserait à penser qu'elles n'ont pas de fonction bien définie. En fait, ces protéines, grâce à leur « souplesse » facilite différentes interactions (Wright et al. 1999) et sont souvent associées à plusieurs fonctions biologiques.

La prédiction de désordre avec PONDR-FIT, VSL2B montre la conservation des régions désordonnées dans la partie centrale de la séquence (Figure 16). Toutes les protéines testées possèdent des régions où le score VLS2B> 0,4, ce qui est un synonyme de régions non structurées. Fait intéressant, un chevauchement entre les régions structurées et des régions non structurées a été observées parmi ces protéines, ce qui indique que la conservation des protéines la famille RSS1-like n'est pas seulement limitée à leur séquence primaire mais est aussi étendue à leur propriété structurale en solution.

5- Organisation génomique :

L'architecture exon-intron est un aspect très important pour comprendre l'apparition des gènes et leur évolution à travers les espèces. Des études phylogénétiques se focalisent, en effet, sur le nombre d'exons, la longueur des introns, les positions des sites d'épissage et l'étude des variations structurelle des exons et introns.

L'analyse de l'organisation génomique des homologues de **TdRL1** montre un nombre d'exons variant entre 5 et 6. On remarque chez les ancêtres du blé comme *Aegilops tauschii* et *Triticum urartu* qu'ils possèdent tous les deux 5 exons alors que le blé tendre (*Triticum aestivum*) en possède 6 (Figure 17). La corrélation positive entre l'échelle de l'évolution et l'acquisition des exons a été montrée pour d'autres génomes notamment chez les animaux. Chez le blé on a remarqué la substitution d'un exon mais on a des introns de longueurs similaires. En revanche chez le riz on remarque une organisation différente avec la perte d'un exon entre les variétés *O.s. indica* et *O.s. japonica* (**RSS1**). L'analyse globale des variations exon-intron entre les 11 homologues RSS1-like présente trois types de

divergences : soit une acquisition, soit une perte d'exon, soit une divergence de longueur des introns.

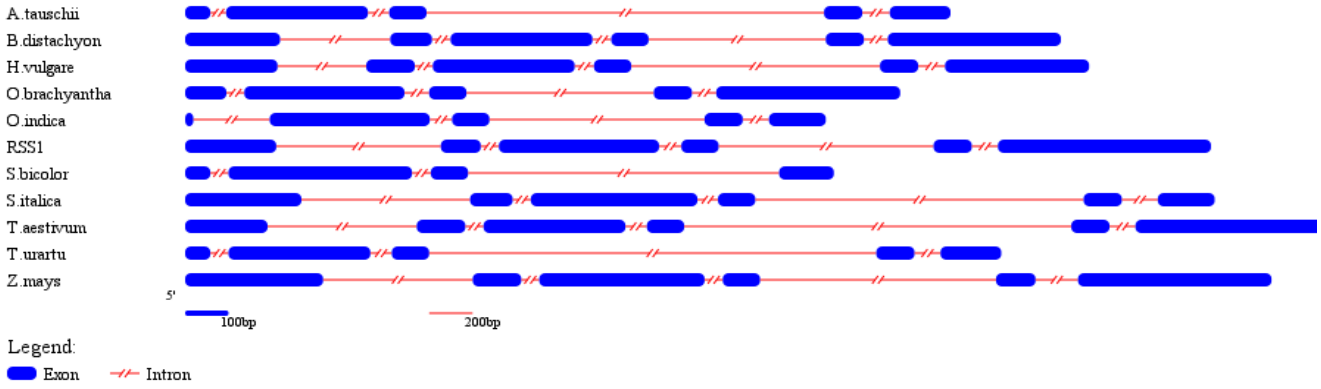


Figure 17 : L'organisation génomique des homologues à TdRL1 montre une divergence au niveau du nombre des exons et la longueur des introns déterminée grâce au serveur **GSDS** (http://gsds.cbi.pku.edu.cn/).

6- <u>Etude des régions promotrices des homologues de RSS1 :</u>

Les séquences des régions promotrices des gènes homologues à RSS1 disponibles (au moins 500 bp précédent l'ATG) ont été soumises à la base de données **PLACE** (htpp://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html) qui reconnait la plupart des motifs cis-régulateurs des gènes d'origine végétale. L'analyse globale a mis en évidence la présence de nombreuses boîtes régulatrices qui sont nécessaires à l'expression des gènes impliqués dans divers types de stress abiotiques (sécheresse, salinité, chaleur) et hormonal (Tableau 2). Pour comparer la régulation putative de **RSS1** et **TdRL1** nous avons comparé les éléments cis-régulateur des différents gènes (Tableau 2). Dans un deuxième temps, le promoteur de TdRL1 a été isolé, cloné et séquencé. Son analyse montre la présence de plusieurs sites de fixation d'éléments régulateurs incluant des éléments pour la régulation en conditions de stress abiotiques, en fonction des phases du cycle cellulaire notamment, des éléments essentiels à la transition G1/S et G2/M avec beaucoup des sites de fixation des facteurs de transcriptions (MYB, DOF et WRKY…).

Les sites de fixation potentiels de facteurs de transcription comme ERF, MYB, MYC et WRKY ont été identifiés (Tableau 2). Parmi ces éléments régulateurs, il y a le consensus MYB

responsable de l'activation de gènes impliqués dans le stress hydrique et ceci par la fixation des facteurs de transcription AtMYB2.

Putative cis-élément/consensus	Nbre de sites Chez TdRL1	Nbre de sites Chez RSS1	Séquences consensus	Fonctions	Références
ABRERATCAL	3	4	MACGYGB (M=C/A, Y=T/C, B=T/C/G)	Déshydratation et étiolement	**Kaplan et al., 2006**
TATABOX5	6	7	TTATTT	Régulation de la transcription	**Tjaden et al., 1995**
MYBCORE	11	8	CNGTTR	Activation des gènes du stress hydrique	**Lüscher et Eisenman1990**
MYCCONSENSUSAT	12	10	CANNTG N=A/T/G/C	déshydratation	**Hartmann et al., 2005**
MYC consensus	12	9	CANNTG (N=A/T/G/C)	Site de fixation des activateurs transcriptionnels AtMYC2 et AtMYB2 dans la voie de l'ABA	**Abe et al., 2003**
ARR1AT	24	19	NGATT (N=G/A/C/T)	Site de fixation des activateurs transcriptionnels ARR1	**Ross et al., 2004**
WRKY71OS	9	7	TGAC	Site de fixation des répresseurs de la voie de signalisation de la gibbérelline	**Zhang et al., 2004**
WBOXNTERF3	5	2	TGACY Y=C/T	Activation des genes DE ERF3	**Nishiuchi et al., 2004**
CACGCAATGMGH3	2	2	CACGCAAT	Confers auxin inducibility; Binding site of nuclear en FRprotein	**Ulmasov T, et al., 1995**
GT1CONSENSUS	20	16	GRWAAW R=A/G; W=A/T	Régulateur des gènes de réponse à la lumière	**Terzaghi et Cashmore, 1995**
POLLEN1LELAT52	12	8	AGAAA	Régulateur des gènes spécifique de pollen	**Filichkin et al. 2004**
RHERPATEXPA7	3	3	KCACGW K=G/T; W=T/A	Root Hair-specific cis-Elements	**Kim DW,et al., 2006**
CCAATBOX1	3	5	CCAAT	- Régulation de la floraison d'*A.thaliana*	**Wenkel et al., 2006**
GT1GMSCAM4	9	5	GAAAAA	induit par un pathogène et par le stress salin	**Park et al., 2004**
E2F; AP2	3	2	TTTCCCGC	Activé les promoteurs des genes de transition G1/S	**Jager SM,et al., 2001**
ELRECOREPCRP1	3	2	TTGACC	Elément de réponse au éliciteur	**Rushton PJ,et al., 2002**
ERELEE4	4	2	AWTTCAAA	élément de réponse à l'éthylène	**Tapia G et al., 2005**
MYBCORE	22	23	GCCGCC	Déhydratation, stress abiotique	**Solano R al., 1995**

Tableau 2 : Les différents éléments cis- régulateurs potentiels identifiés sur les régions promotrices des gènes (TdRL1 et RSS1) par le logiciel **PLACE** (hpp://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html)

Le consensus MYC est responsable de la fixation des activateurs transcriptionnels AtMYC2 et AtMYB2 impliqués dans la voie de signalisation par l'acide abscissique ABA, et l'acide jasmonique chez *Arabidopsis* (Abe et al., 2003). La présence de ce type de séquence permet de suggérer que l'activation transcriptionnelle des gènes **RSS1-like**, suite à un certain type de stress, peut être dépendante de la fixation des protéines de type **MYB/MYC** au complexe d'initiation de la transcription. L'analyse des promoteurs montre également la présence de sites de fixation du facteur **ERF1** (**E**thylene **R**esponse **F**actor**1**). Ce facteur de transcription est un régulateur clé de la réponse au stress salin et hydrique (Cheng et al, 2013) et permet l'activation des gènes de la transition G1/S (De Jager et al., 2001).

II- RSS1-like chez Arabidopsis :

Arabidopsis présente une protéine **RSS1**-like nommée PANS1 (AT3G14190) ayant des caractéristiques de **RSS1**, notamment grâce à la présence de motifs de dégradation (D et DEN-Box). Toutefois, cette protéine n'a qu'une faible homologie de séquence (**24 %)** avec **RSS1** restreinte à sa partie N-terminale (Figure 18 et 19).

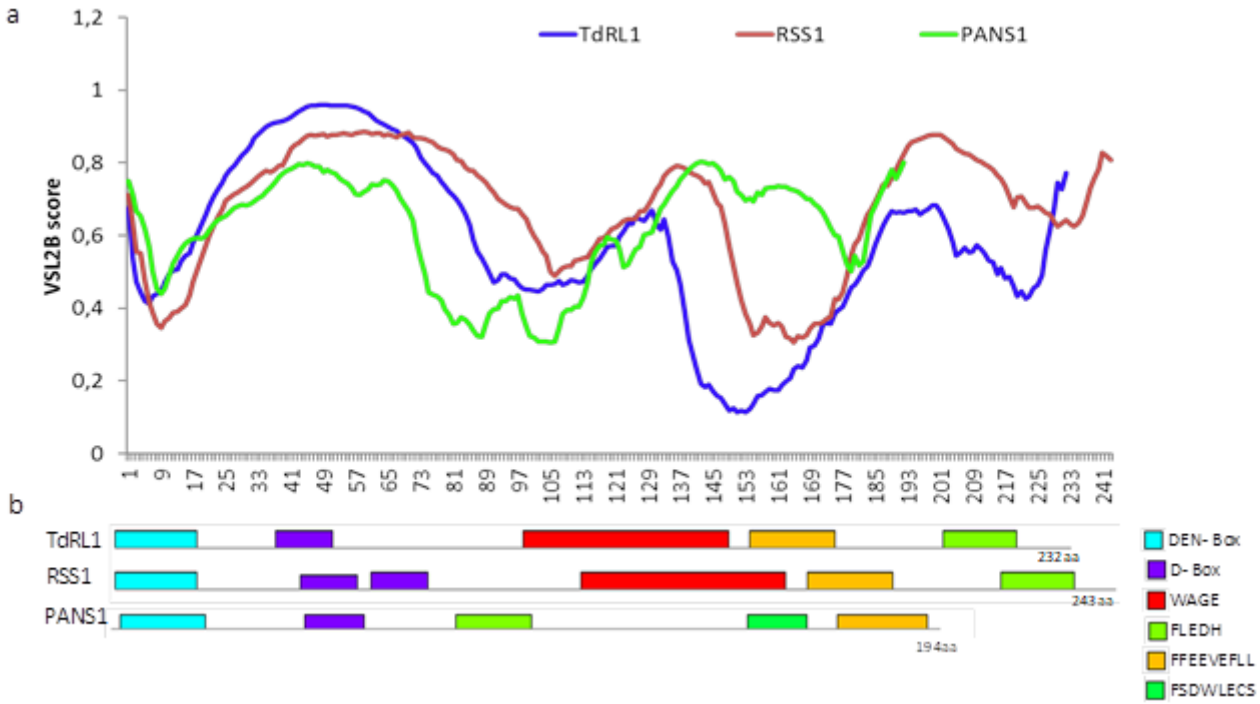


Figure 18 : Les protéines TdRL1, PANS1 et RSS1 sont des IDPs. (a) Analyse avec PONDR-FIT (http://disorder.compbio.iupui.edu/) par la détermination du score VSL2B. L'analyse se base sur les propriétés structurales des protéinesTdRL1, RSS1 et PANS1. (b) Domaines communs aux 3 protéines RSS1-like après analyse en utilisant MEME.

1- <u>PANS1 une protéine putative de la famille RSS1-like chez Arabidopsis :</u>

Le gène AT3G14190 appelé PATRONUS1 (PANS1) code pour une protéine impliquée dans la ségrégation des chromatides sœurs pendant la méiose II (Cromer et al. 2013). Ce gène a également été décrit comme étant **C**OPPER **M**ODIFIED **R**ESISTANCE ou CMR (Juraniec et al. 2014). L'analyse du mutant KO *pans1-1* révèle une sensibilité au stress salin (NaCl) avec des racines courtes en présence de 80 mM de NaCl (Cromer et al. 2013). D'autre part dans un criblage indépendant le mutant *pans1-1/cmr1-1* s'est révélé hypersensible au cuivre et à d'autres stress abiotiques en particulier au stress salin (Juraniec et al. 2014).

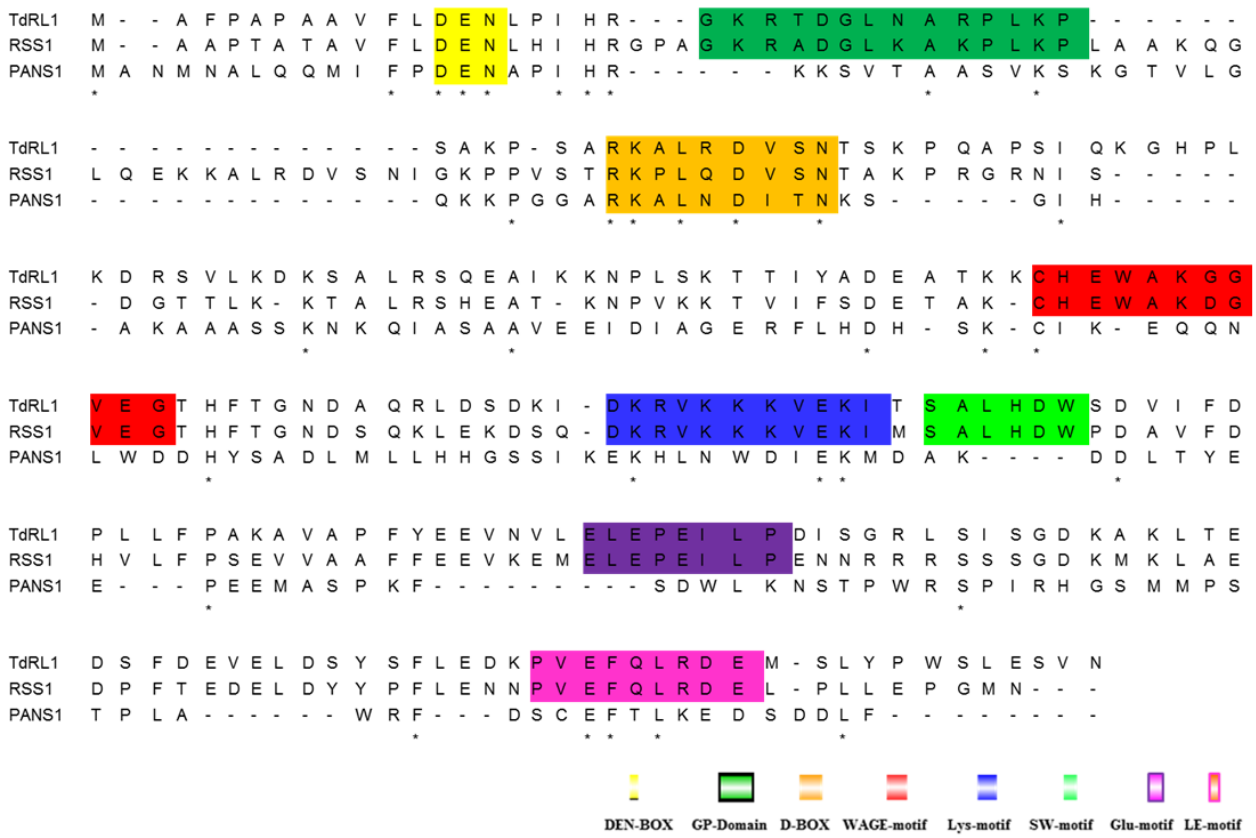


Figure 19 : Alignement des séquences de **TdRL1, RSS1 et PANS1**. Conservation des motifs D et DEN-box.

L'analyse du mutant *pans1-1* montre que PATRONUS est indispensable au maintien de la cohésion centromérique des chromatides sœurs pendant la méiose II au vu des défauts dans la ségrégation des chromosomes et de la réduction de la viabilité du pollen et des ovules (Cromer et al. 2013, Zamariola et al. 2014).

Le mutant *cmr1-2* montre une réduction du nombre de cellules dans l'apex racinaire en conditions de stress due à une sortie prématurée du cycle cellulaire (Juraniec et al., 2014 ; Juraniec et al. 2016). Le défaut de croissance racinaire est corrélé à un défaut mitotique lié à une entrée prématurée des cellules en anaphase engendrant des défauts de ségrégation des chromosomes. Ceci montre un rôle de PANS1 dans le contrôle de la ségrégation chromosomique (Juraniec et al. 2016). De plus, moins de cellules entrent en mitose dans le mutant, comparativement au sauvage, après synchronisation de la division dans les méristèmes racinaires par l'hydroxy urée qui crée un stress réplicatif (Juraniec et al. 2016). La présence des motifs conservés DEN et D-box fait que les deux protéines **RSS1** et **PANS1** peuvent être dégradées par le protéasome et en particulier par l'APC/C^{cdc20} ; les deux protéines se liant par ailleurs à CDC20 (Cromer et al. 2013, Ogawa et al. 2011). La surexpression de la forme délétée *PANS1ΔD* a montré un fort défaut de croissance chez *Arabidopsis* (Cromer et al. 2013) et la surexpression de *CMR1* entraine une stabilisation de la cycline mitotique CYCB1;2 (Juraniec et al. 2016). Ces données suggèrent un rôle de PANS1 dans la régulation négative de l'APC/C^{cdc20} (Juraniec et al. 2016).

Par ailleurs, les analyses de séquences par les outils IUPRED et Fold Index montrent que PANS1, comme TdRL1 et RSS1, est une protéine intrinsèquement désordonnée (Figure 19). Ainsi la ressemblance des phénotypes des mutants *pans1-1/cmr1-2* avec celui du mutant *rss1* et le fait que les protéines, soient, malgré leur faible homologie de séquence primaire, largement désordonnées suggèrent que PANS1 appartienne à la famille des RSS1-like. Toutefois, RSS1 a été décrit comme une protéine régulant la transition G1/S dans les cellules méristématiques en conditions de stress alors que PANS1/CMR1 serait davantage impliquée dans le contrôle de la mitose (Ogawa et al. 2011 ; Juraniec et al. 2016).

2- <u>Etude des sites de phosphorylation putatifs chez les protéines RSS1-like :</u>

Les modifications post-traductionnelles (**PTM**s) des protéines augmentent la diversité fonctionnelle du protéome par l'addition covalente ou l'enlèvement de groupes fonctionnels qui modifient la nature chimique des acides aminés. La phosphorylation des protéines est l'une des modifications post-traductionnelles les plus importantes et la plus fréquente. La phosphorylation est catalysée par des protéines kinases spécifiques, tandis que les phosphatases enlèvent les résidus phosphorylés. Les kinases et phosphatases sont en

général régulées par des signaux extérieurs, comme les hormones. Les événements de phosphorylation sont très importants dans la régulation du cycle cellulaire, l'activation des points de contrôle de la réplication de l'ADN et des protéines impliquées dans la régulation de l'entrée en mitose via le contrôle de CDK (cyclins dependant kinases) (Scofield et al., 2014). La phosphorylation se fait par le transfert d'un groupement phosphate de l'ATP à un acide aminé. Cette addition ajoute des charges négatives à la protéine qui peuvent induire des modifications structurales de la protéine et donc de son activité, ou la modification des interactions protéine-protéine (Narayanan et Jacobson, 2009). La progression du cycle cellulaire nécessite aussi la présence des protéines kinases "mitotique" notamment les protéines kinases Aurora et les protéines de contrôle de l'assemblage du fuseau mitotique (SAC) qui contrôlent la progression de la mitose (Komaki et al., 2017). Les travaux de Ogawa *et al.*, en 2011 et 2012 montrent que la protéine **RSS1**, homologue de **TdRL1**, interagit avec des protéines phosphatases de type Sérine/Thréonine phosphatases notamment **PP1**. D'autre part, **RSS1** ne serait active qu'en présence de stress car le mutant *rss1* se développe normalement en absence de stress mais les étapes entrainant l'activation de **RSS1** après perception du stress salin et permettant sa liaison avec **PP1** sont inconnus.

Les sites potentiels de phosphorylation des séquences des protéines **RSS1**, **PANS1** et **TdRL1** ont été déterminés en utilisant les serveurs **PPSP** et **Netphos2**. L'analyse nous permis d'identifier plusieurs sites potentiels (Tableau 1 : **Annexe**). L'analyse montre la présence de sites potentiels de phosphorylation qui sont conservés entre les différentes protéines au niveau de leur position et de la nature des kinases potentiellement impliquées (Figure 20).

Des dizaines de sites de phosphorylations putatifs de résidus sérine (**S**) tyrosine (**Y**) et Thréonine (**T**) ont été identifiés (Tableau 1: annexe). Parmi ceux-ci, les 3 protéines possèdent des sites putatifs de phosphorylation par la kinase mitotique, Aurora kinase. Un site de phosphorylation putatif dans la partie N-terminale (Figure 20), est particulièrement conservé entre **RSS1**, **PANS1** et **TdRL1** avec la présence du motif "**PLKPSAKPS** ", "**LRDVSNIGK** "et "**HRKKSVTAA** " pour **TdRL1**, **RSS1** et **PANS1** respectivement et potentiellement phosphorylé par Aurora kinase.

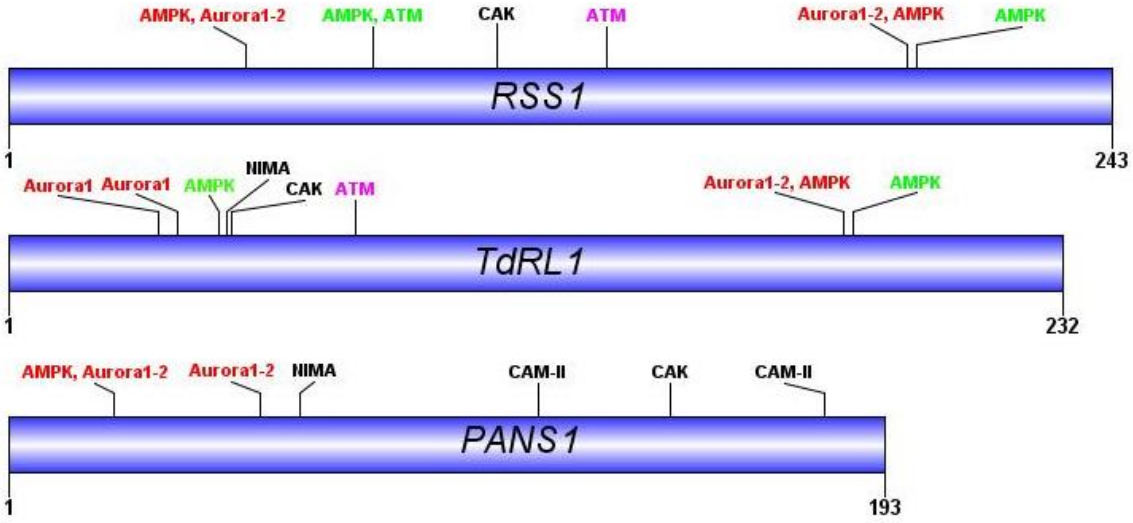


Figure 20 : Illustration des sites de phosphorylation sur les séquences protéique de RSS1, TdRL1 etPANS1. Les sites les plus conservés situés dans la partie N-terminale incluent des sites potentiels de phosphorylations par les kinases mitotiques de type Aurora kinase A-B et ATM.

Les kinases Aurora sont une famille de sérine/thréonine kinases dont l'activité augmente pendant la division cellulaire (Carmena et Earnshaw 2003 ;). Trois kinases Aurora 1, 2 et 3 ont été identifiées chez Arabidopsis et leurs fonctions commencent seulement à être élucidées (Weimer et al., 2016). Les kinases Aurora1 et 2 ont des patrons de localisation proches de ceux de la gamma tubuline associées aux MT et sont impliquées dans le contrôle de la stabilité des MT alors qu'Aurora 3 est liée aux centromères, elle pourrait jouer un rôle dans le contrôle de la ségrégation des chromosomes mais cela n'a pas encore été démontré.

Les logiciels de prédiction montrent la conservation de ces sites de phosphorylation entre les trois protéines **TdRL1**, **RSS1** et **PANS1** dans la partie N-terminale, particulièrement conservée dans la famille RSS1-Like. La conservation des sites de phosphorylation cibles des kinses Aurora 1-2 dans les séquences protéiques de **RSS1**, **PANS1** et **TdRL1** suggère une possible implication de ces protéines dans le contrôle de la stabilité des MTs pendant la mitose.

III- Etude transcriptomique :

Les réponses des plantes aux stress abiotiques nécessitent l'interaction de différentes voies de signalisation qui interagissent de manière synergique ou antagoniste et permettent l'activation ou l'inactivation de gènes de réponse au stress. L'évolution et le développement des outils bio-informatiques permet d'étudier la complexité de ces interactions par l'analyse des propriétés physico-chimiques des protéines, de leur expression, leur localisation, leurs sites potentiels de modifications post-traductionnelles, et leurs protéines associées. Tous ces outils nous amènent à prédire leur fonction et permet à l'expérimentateur d'orienter ses recherches. Les études transcriptomiques permettent d'identifier les gènes impliqués dans un mécanisme donné. En effet, si des gènes sont co-exprimés de façon similaire dans un contexte particulier, au cours du temps ou entre espèces, c'est que ces gènes sont probablement liés et interviennent dans la même voie de signalisation. La co-expression de ces gènes peut être expliquée par trois raisons : soit les gènes ont la même fonction, soit ils ont la même localisation dans le génome, soit ils sont régulés de la même manière ou sous le contrôle du même facteur de transcription.

L'analyse des données transcriptomiques et de co-expression entre les gènes RSS1, TdRL1 et PANS1 issus des trois espèces riz, blé et *Arabidopsis* ont été exploitées afin d'identifier les gènes ayant un rôle dans la réponse au stress abiotique et participant particulièrement à la voie de signalisation régulée par les protéines RSS1-like. Ces données ont été collectées à partir des bases de données de transcriptomes **PLEXdb** (http://www.plexdb.org/) et **GENEVESTIGATOR©** (https://genevestigator.com/gv/).

1- Identification des gènes co-régulés avec TdRL1 en condition de stress abiotiques :

Nous avons analysé les données transcriptomiques publiées et disponibles dans les bases de données. Chez le blé, le nombre de données transcriptomiques disponibles est restreint et concernent uniquement le blé tendre. Ainsi, le gène **TaRL1** de *T. aestivum* (blé tendre), orthologue à **TdRL1** est utilisé et les gènes co-régulés de manière positive (coefficient de corrélation de Pearson <0.05) sont considérés. Ceci est permis grâce à la proximité phylogénétique entre les génomes de blé dur et tendre. Vue l'annotation

incomplète du génome du blé, seuls 18 % (72 parmi 400 gènes), des gènes co-exprimés ont pu être identifiés. Cependant, le génome d'*Arabidopsis thaliana* est entièrement séquencé et annoté. Ainsi, nous avons identifié chez celle-ci les orthologues des gènes candidats du blé. Le même travail a été effectué chez le riz en cherchant les gènes co-régulés avec RSS1 et chez Arabidopsis pour les gènes co-exprimés avec PANS1.

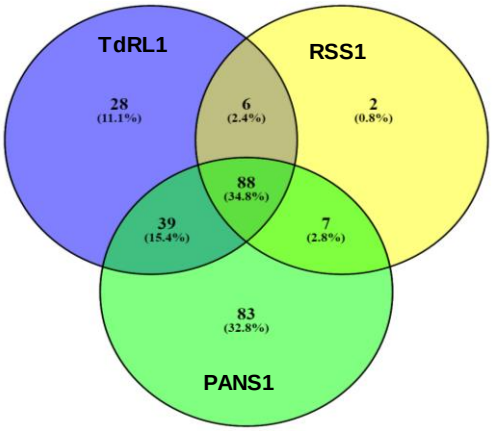


Figure 21 : Diagramme de Venn indiquant l'enrichissement commun en 'Gene Ontology' (GO) dans les gènes co-regulés avec RSS1, PANS1 et TaRL1.

Nous avons ensuite analysé l'ontologie des gènes identifiés en utilisant agriGO (http://bioinfo.cau.edu.cn/agriGO/analysis.php) en considérant le processus biologique dans lequel ils sont impliqués, leur fonction moléculaire et le composant cellulaire (localisation subcellulaire). Nous avons analysé les « probesets » des gènes co-régulés des 3 espèces séparément. Le nombre de GO identifiés à partir du riz et du blé est moindre par rapport à celui trouvé à partir d'Arabidopsis, ce qui reflète la bonne annotation du génome d'Arabidopsis. Après un recoupement des termes GO communs par une analyse Venn, nous avons pu montrer que les gènes co-régulés avec **RSS1, TaRL1** et **PANS1** comportent des termes GO communs. Parmi les GO enrichis, 34,8 % concernent le processus biologique, le compartiment cellulaire et la fonction moléculaire. L'analyse du diagramme de Venn a révélé 42 processus biologiques communs. Cependant, 21 **GO** termes sont spécifiques au blé et 52 spécifiques à *Arabidopsis*. Deux GO termes sont communs au riz et au blé (GO : 0006355 ; régulation de la transcription) et 28 entre le blé et *Arabidopsis* (Annexes : Annexe 2). Cette analyse de GO a révélé que les gènes identifiés sont impliqués dans divers processus métaboliques. Plus particulièrement, la plupart des termes d'enrichissement **GO** révèlent un

composant intracellulaire commun liés à l'enveloppe nucléaire et le cytosquelette, notamment les MT (Figure 22).

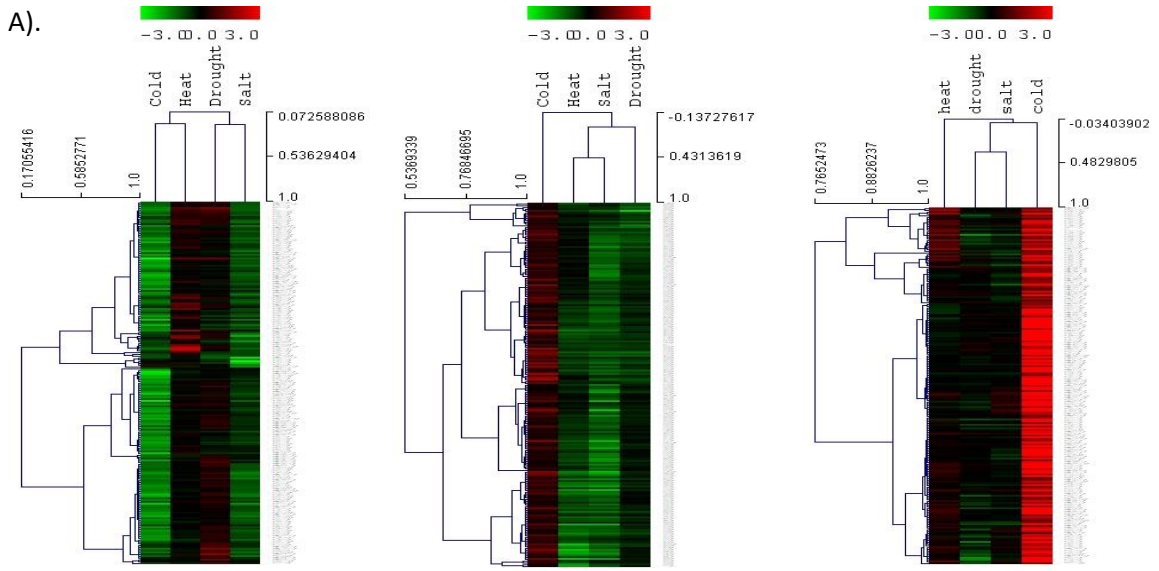
Figure 22 : Enrichissement des GO termes des gènes co-régulés avec RSS1, PANS1 et TaRL1 généré par AgriGO (http://bioinfo.cau.edu.cn/agriGO/analysis.php) A). Processus biologique. B). Compartiment cellulaire. C). Fonction moléculaire

En terme de processus biologique, l'analyse montre que la communication cellulaire, la régulation du cycle cellulaire, et la réponse aux stimuli sont les GO majeurs identifiés (voir annexe 2). L'analyse montre qu'il y a une fonctionnalité commune entre TdRL1, RSS1 et PANS1 dans la cellule. Cette fonctionnalité est liée à la régulation du cycle cellulaire au moment du stress avec l'implication du cytosquelette.

2- <u>Les gènes identifiés sont bien co-exprimés avec RSS1, PANS et TdRL1 :</u>

L'analyse du taux d'expression d'un gène se fait par la mesure de la quantité d'ARNm dans un échantillon biologique au temps t et dans des conditions expérimentales données. Le suivi du taux d'expression d'un gène, la dynamique d'expression peut être évaluée d'une manière positive ou négative c'est-à-dire par la diminution ou l'augmentation de son taux d'expression. L'expression d'un gène peut moduler l'expression d'un autre, on parle ainsi de gènes co-régulés. La co-régulation de deux gènes peut être induite par différents facteurs tels que les stress abiotiques. La similarité d'expression nous permet de définir des groupes de gènes. Un réseau de co-régulation de gènes peut être construit pour associer des gènes à une réponse ou à un stimulus. Dans notre étude, les données des gènes différentiellement exprimés (DEGs ; Differentially Expressed Genes), analysés à partir des données microarrays (voir Méthodes) peut nous aider à déterminer la fonction d'un gène et identifier son réseau.

A).



TdRL1 **RSS1** **PANS1**

B).

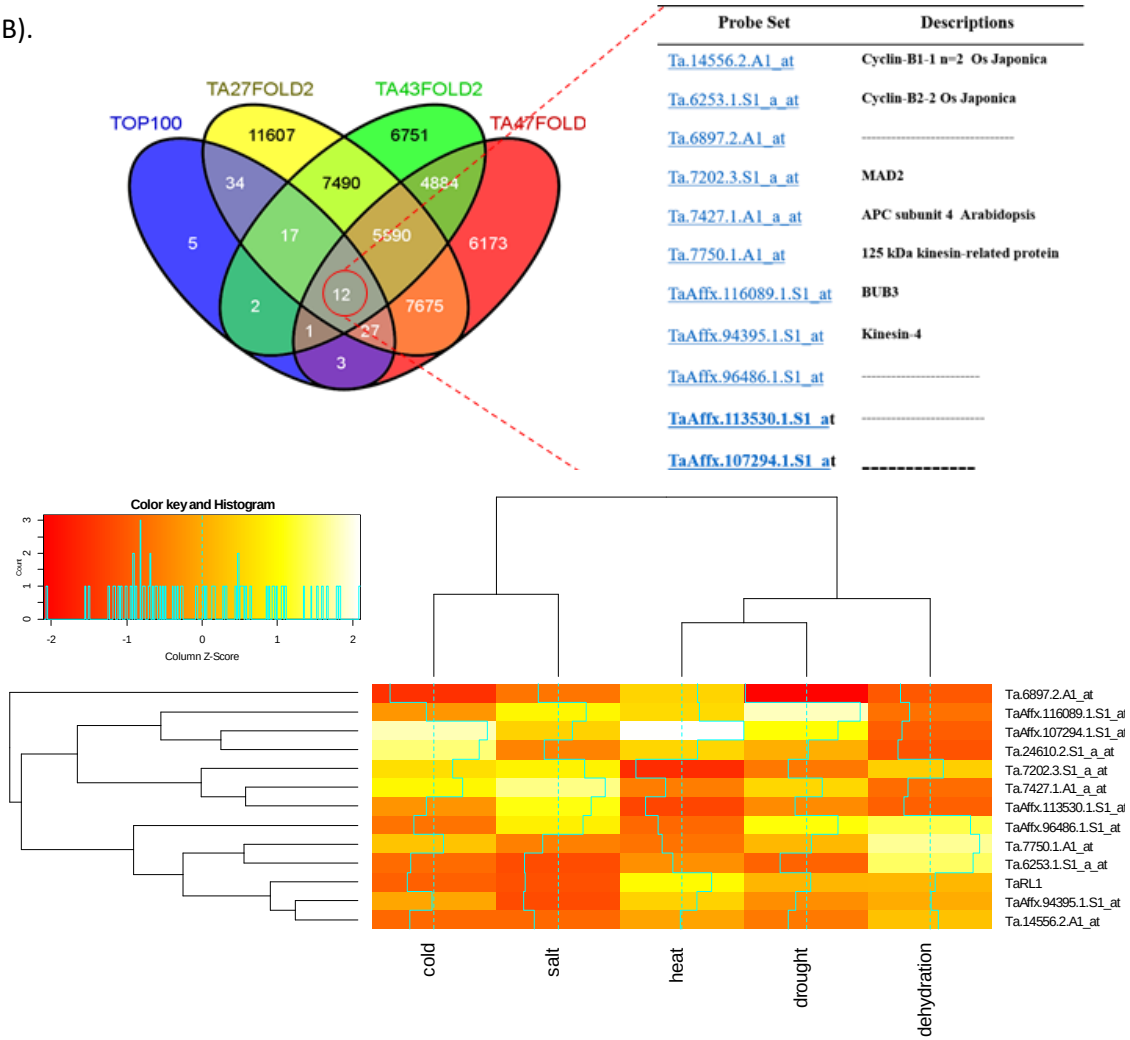


Figure 23 :L'analyse transcriptomique révèle la co-expression de nombreux gènes en liaison avec la division cellulaire. (A) Clustering hiérarchique de l'expression des gènes. Valeur de « Fold-change » (basé sur log2) des 200 premiers gènes co-regulés avec TaRL1 (B) Diagramme de Venn indiquant l'enrichissement **G**ene **O**ntologie (**GO Number**) chevauchants entre RSS1, PANS1 et TaRL1 en utilisant **AgriGO** (http://bioinfo.cau.edu.cn/agriGO/analysis.php). (C) Heatmap présentant les différentes expressions des gènes co-exprimés avec TaRL1 en fonction des stress abiotiques appliqués.

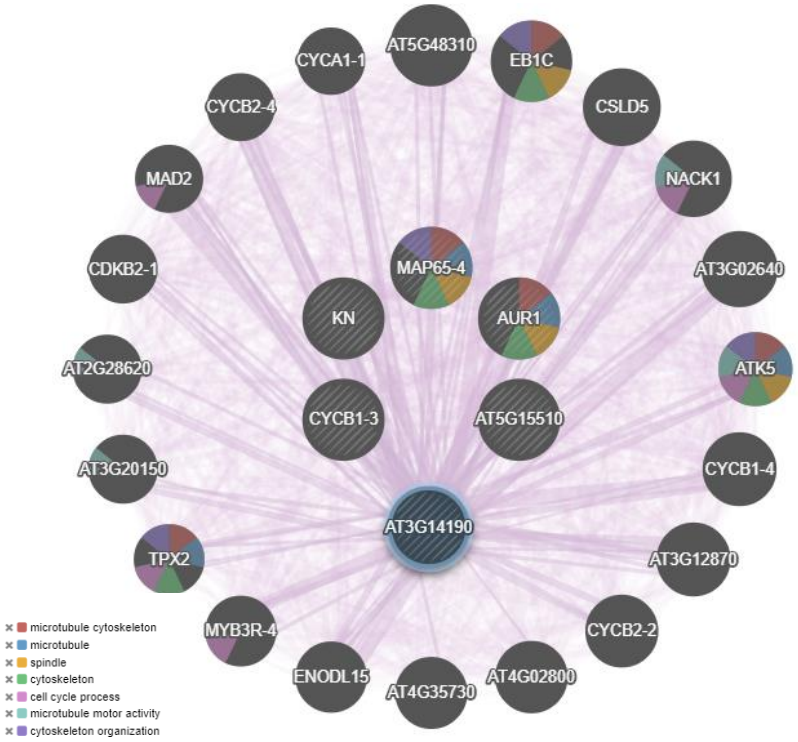
Comme décrit précédemment, les identifiants des DEGs obtenus à partir du blé ont été convertis et leurs orthologues chez le riz et Arabidopsis ont été utilisés pour l'analyse. Parmi les meilleurs scores de prédiction (valeur de p-value < 0,001) nous avons trouvé 16 triplets de gènes orthologues chez le blé, le riz et *Arabidopsis* dont 7 sont co-régulés avec **TaRL1** sous stress abiotiques (sel et froid). Chaque orthologue dans les trois espèces partage les

mêmes profils d'expression dans les trois espèces avec une diminution d'expression de manière significative en réponse au stress salin (Figure 22-A).

3- Le réseau génétique lié à PANS1 et l'identification de partenaires :

Les diverses interactions (physiques, prédites, co-expression, génétiques) de PANS1 (AT3G14190) obtenues à partir de la base de données **GeneMANIA** révèlent vingt nœuds correspondant à 20 protéines qui ont des relations avec PANS1. Le réseau d'interaction est formé de partenaires physiques, co-exprimés ou co-localisés. Le premier groupe de partenaires a regroupé les deux interactions physiques, HBT (CDC27B/ HOBBIT) et le gène cdc20.1 comme cela a été montré par Cromer et al en 2013. Le deuxième groupe de gènes co-exprimés et de protéines colocalisées, est composé de 18 gènes (Figure 23). Les gènes comportent des gènes essentiels pour la régulation de cycle cellulaire notamment la transition G1/S et G2/M (CYCB2-4, CYCA1-1, CYCB1-1, CDK2-1 et MAD2), le gène UBC20 code pour l'enzyme E2-20 essentielle pour la dégradation des protéines via l'APC/C-ubiquitine dépendant. Le réseau comporte aussi des gènes de fonction inconnue (AT3G12870, AT3G51280…). Toutes ces données montrent que PANS/TdRL1 possèdent un rôle dans la régulation et la progression du cycle cellulaire, notamment au cours de la mitose.

Locus	Gène
Gene direct connectées avec PANS1 Microarray)	
AT3GG02640	Unknown
AT3G12870	Unknown
AT4G15830	ARM repeat superfamily protein
AT2G25880	AtAurora2
AT3G58100	Plasmodesmata callose-binding protein6
Gene direct connectées avec PANS1 (RNAseq)	
AT2G25060	early nodulin-like protein 14
AT3G60840	microtubule-associated protein 65-4
AT3G11520	CYCB1-3
Gènes co-exprimées avec PANS1	
AT5G06150	CYCB1-2
AT2G25060	ENDOL14
AT3G60840	MAP65-4
AT3G11520	CYCB1;3
AT5G56120	unknown
AT5G17160	unknown
AT2G34190	permease
AT4G32830	AUR1
AT5G15510	TPX2
AT2G25880	AUR2
AT1G08560	SYP111
AT4G33260	Transducin
AT3G20150	kinase motor
AT5G05510	MAD3
AT5G11510	MYB3R-4
AT5G67270	EB1C
AT4G33270	Transducin
AT3G03130	Unknown
AT5G48310	Unknown
AT5G25090	ENDOL13
AT4G37490	CYCB1;1



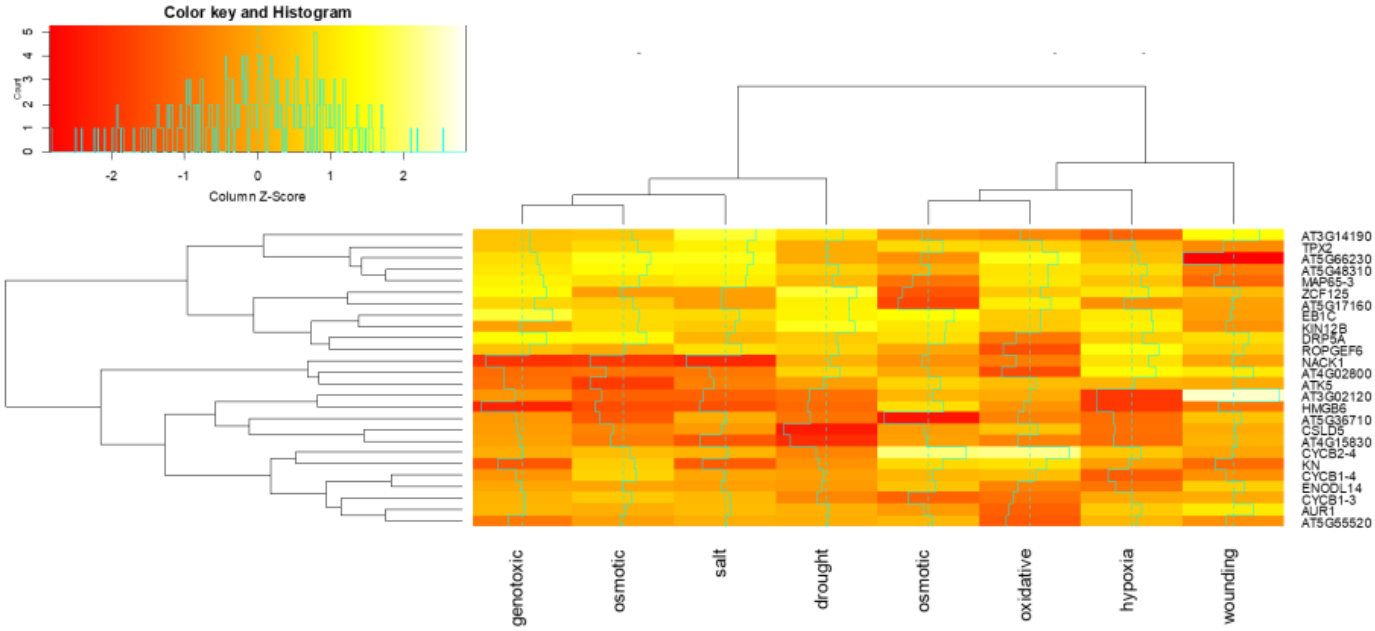


Figure 24: Réseau fonctionnel prédit de PANS1 chez Arabidopsis : A). Réseau de PANS1 identifié par **GeneMANIA** (https://genemania.org/) B). Expression Relative des gènes interagissant avec PANS1 téléchargée à partir de **GENEVESTIGATOR®** (https://genevestigator.com/gv/) et présentées en cluster heatmap avec **R** (https://www.r-project.org/)

4- Analyse statistique : performance de la relation entre les gènes co-régulés et PANS1 :

Pour étudier et mettre en évidence les relations dans la réponse aux différents stress abiotiques des gènes co-régulés avec PANS1, la connexion entre les différentes expressions des gènes est déterminée par une représentation graphique « scatter plot » avec la détermination du coefficient de corrélation de Pearson's « R ».

La « scatter plot » est une méthode simple pour déterminer la relation entre la nature du stress et la réponse des gènes. La dispersion est donnée par le coefficient de Pearson qui montre la covariance divisée par l'écart type, entre la réponse au stress et un gène. La réponse est très complexe ce qui est montré par la corrélation positive dans notre étude donnée par le coefficient **0.05 < R < 0.88.**

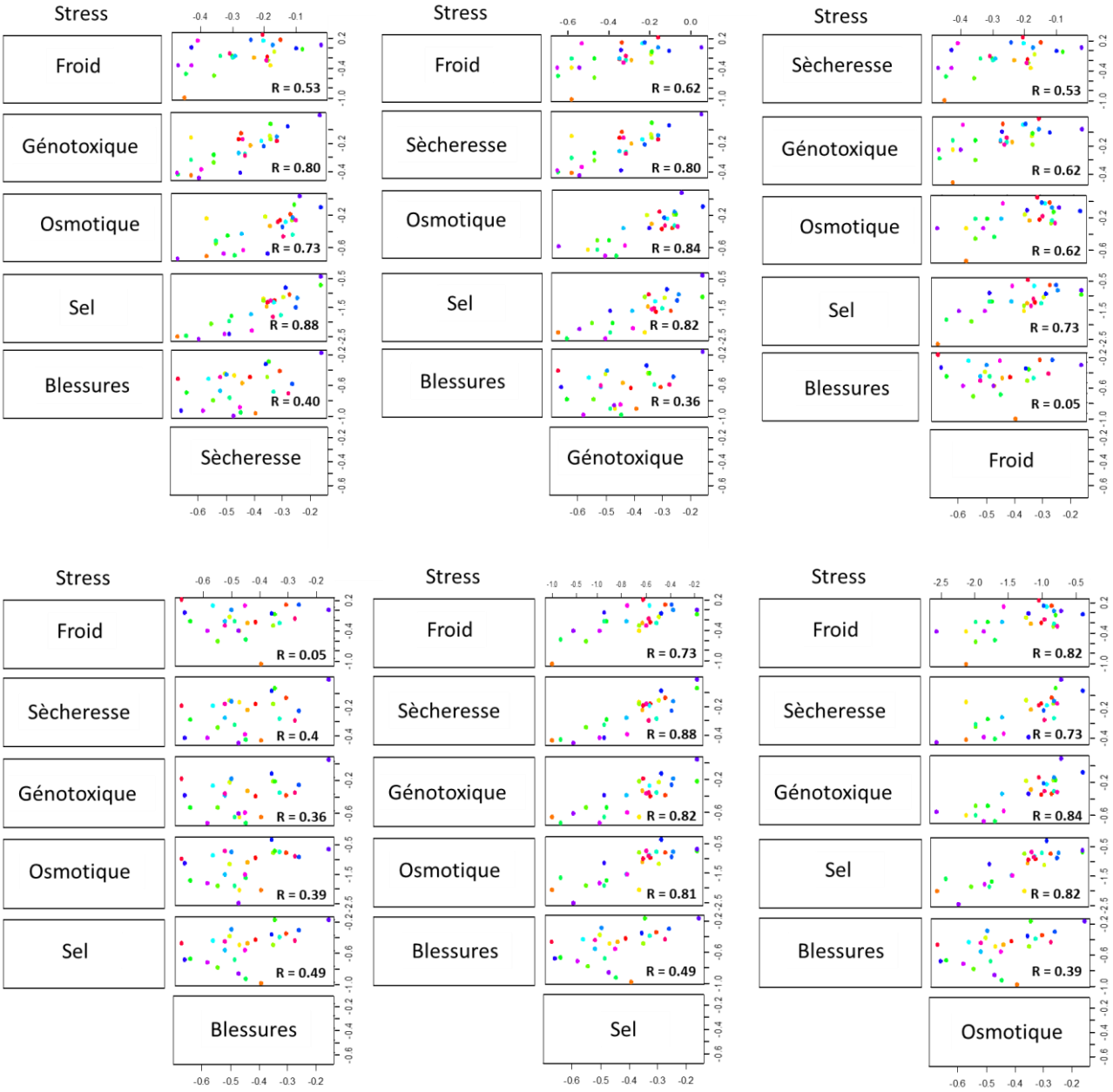


Figure 25 : Scatter plot présentant les connections entre le type de stress appliqué et la réponse des gènes co-régulés avec **PANS1**, présenté en utilisant **R** (https://www.r-project.org/). Le coefficient de corrélation R > 0 montre une corrélation positive dans la réponse aux différents stress.

La corrélation la plus grande se situe entre la réponse au stress salin et la sècheresse **R = 0.88,** ce qui signifie qu'il y a des chevauchements entre les réponses au stress salin et à la sècheresse par rapport aux autres stress. La différence peut être interprétée par la

divergence dans la voie de signalisation. Le stress salin et la sècheresse peuvent activer les mêmes facteurs de transcription de nature **DREB2** et **ABF-ABA**-dépendant et ce par leur fixation sur des éléments cis-régulateurs de type **CRT/DRE** et ABRE respectivement (Stockinger et al., 1997 ; Yamaguchi et Shinozaki ., 1994). La plus faible corrélation est observée entre la blessure et le froid. Cette divergence est interprétée par la nature du stress puisque qu'ils utilisent des voies de signalisation distinctes.

Discussion chapitre I :

La découverte de **RSS1** comme un régulateur positif du cycle cellulaire en condition de stress salin a permis d'ouvrir de nouvelles perspectives dans la connaissance de la relation entre la perception du stress et le contrôle de la division. Chez les graminées, les *RSS1*-like sont conservés au niveau de l'organisation génomique des gènes et de leur séquence protéique. La protéine de blé **TdRL1**, possède une forte homologie avec les autres protéines des Triticales (entre 98 et 88%), et de 59%) avec celle du riz ; ce qui suggère une fonction similaire. Cette conservation est particulièrement importante au niveau des D et DEN-Box, motifs essentiels pour la modification post-traductionnelle des protéines et la dégradation de la protéine par l'**APC/C^{cdc20}.** De plus, on remarque la présence d'autres motifs conservés de fonction inconnue qui sont présents dans toutes les séquences protéiques de la famille RSS1-like. La présence de ces motifs conservés indique que **RSS1** et **TdRL1**seraient soumis aux mêmes régulateurs et auraient des fonctions similaires.

Les études d'Ogawa et al en 2011 montrent que **RSS1** interagit avec **OsPP1**, une phosphatase de type 1 qui peut déphosphoryler une multitude de protéines (Bollen et al., 2010). La reconnaissance de ses substrats et/ou l'activation de la protéine **PP1** est réalisée par la fixation de régulateurs portant un motif de type **RVxF**. L'analyse des séquences protéiques de **RSS1** et ses homologues chez les Poacées montre une divergence au niveau de la position et du motif. Cependant, cette divergence n'exclut pas une interaction des protéines RSS1-like avec les protéines phosphatases de type1 car d'autres motifs de liaison aux PP1, tels que les motifs de type **SILK** et **MyPhoNE** (Bollen et al., 2010 ; Heroes et al., 2013). Chez les mammifères, 90 % des régulateurs de **PP1** sont des protéines intrinsèquement désordonnées (**IUP**) (Bollen et al., 2010). **RSS1** a été décrit aussi comme une protéine intrinsèquement désordonnée (Ogawa et al., 2012). L'étude des protéines RSS1-like des Triticales montre la conservation des régions désordonnées. L'absence de structure 3D fixe est un atout qui permet à la protéine d'avoir une grande flexibilité pour interagir avec un très grand nombre d'autres protéines. Il est à noter que les UDP sont connues pour évoluer plus rapidement parce que les régions désordonnées ne sont pas limitées par leur structure. La conservation limitée de la séquence primaire entre monocotylédones et les eudicotylédones reflète cette évolution rapide du gène pour

l'adaptation à un système cellulaire particulier. Cependant, la conservation importante de la séquence primaire dans les protéines de type RSS1 des Graminées indique que les réseaux d'interaction pour la tolérance aux stress abiotique sont sous forte sélection et sont importants pour conférer la tolérance.

L'étude *in silico* montre une grande conservation de **RSS1** chez les Poacées mais pas chez les eudicotélydones comme *Arabidopsis.* PANS1, a été décrite comme un homologue putatif de RSS1 chez *Arabidopsis*. PANS1, possède une faible homologie restreinte à la partie N-terminale et aux boites D et DEN. Cependant, les analyses prédictives réalisées ici suggèrent fortement que PANS1 appartienne à la famille des RSS1-like de par son manque de structure tridimensionnelle fixe d'une part, de la ressemblance des phénotypes des mutants *rss1* et *pans1-1* d'autre part, mais aussi parce qu'ils partagent des réseaux de co-régulation similaires.

La présence des sites de phosphorylation dans RSS1, TdRL1 et dans les autres protéines de type RSS1 peut expliquer un autre niveau de régulation phospho-dépendant de la phosphorylation. Les études montrent aussi la conservation des sites de phosphorylation par des kinases mitotiques notamment la kinase Aurora. Les logiciels de prédiction montrent la conservation de ces sites de phosphorylation chez les trois protéines **TdRL1, RSS1** et **PANS1** dans la partie N-terminale, la plus conservée dans la famille RSS1-Like.

La phosphorylation est importante dans la régulation du cycle cellulaire notamment en G2/M. Pendant la mitose la séparation des chromatides sœurs est assurée par les MT ancrés aux kinétochores. Des inhibiteurs spécifiques de l'activité des Aurora kinases ie. Hespéridine, engendrent des défauts de ségrégation des chromosomes dans des cellules synchronisées de tabac BY2 (Kurihara et al., 2008), suggérant que les kinases Aurora jouent un rôle dans le contrôle de la dynamique et stabilité des MT, notamment l'ancrage des MT au kinétochore chez les plantes. Récemment, les protéines stabilisatrices MAP 65-1 sont montrées comme substrat des kinases Aurora, en plus des histones H3 et TPX2 (Demidov et al., 2005 ; Tomaštíková et al., 2015). Cette phosphorylation est requise pour assurer une progression efficace du cycle cellulaire liée à la dynamique des MT, particulièrement à l'enveloppe nucléaire pour la mise en place du fuseau et la formation du phragmoplaste à partir de l'anaphase (Boruc et al., 2016). Or, des défauts de ségrégation sont observés chez le mutant

pans1-1 avec une augmentation des signaux centromériques CENH3 suggérant une aneuploïdie et montrant le rôle de PANS1 dans la cohésion centromérique des chromatides sœurs pendant la méiose (Zamariola et al. 2014) et pendant la mitose (Juraniec et al 2016).

Les résultats des analyses de co-expression confirment le rôle du gène PANS1 dans la régulation du cycle cellulaire et la transition des phases du cycle cellulaire. De nombreux gènes du réseau de co-expression de PANS1 sont des acteurs du cycle cellulaire comme les **CYCLINES** et **MAD2)** ou comme la protéine **TPX2**, essentielle dans l'assemblage des fuseaux pendant la mitose et cible de la kinase Aurora (Vos et al., 2008 ; Tomaštíková E et al., 2015). Les données des DEGs obtenus à partir du blé et du riz corrélées avec les données d'*Arabidopsis* ont renforcé l'hypothèse suggérant PANS1 comme étant un homologue fonctionnel putatif de TdRL1 et RSS1. En effet, l'étude phylogénique basée sur la corrélation de Pearson des données d'expression des gènes co-régulés a révélé un groupe restreint de gènes qui ont un lien avec la régulation du cycle cellulaire tels que CYCB1, CDKB2-2, la protéine MAD2, Kinésine-14 et Serine /Thréonine-protéine kinase Aurora-1.

En conclusion, nos données apportent une meilleure caractérisation des protéines RSS1-like, les considérants comme une nouvelle famille de protéines hautement désordonnées bien conservées parmi les Graminées. La forte conservation au niveau des séquences protéiques ainsi que la similitude des réseaux d'interactions suggèrent fortement une fonctionnalité similaire liée à la régulation du cycle cellulaire lors d'un stress.

Chapitre II

TdRL1, Caractérisation moléculaire et fonctionnelle

TdRL1, CARACTERISATION MOLECULAIRE ET FONCTIONNELLE

Introduction :

La réaction d'une plante face à un stress commence par sa perception puis la transduction des signaux via des messagers pour finir par l'activation des réponses physiologiques et métaboliques appropriées. Ces réponses sont essentielles au bon développement des plantes en période de stress. La protéine RSS1 et ses homologues régulent la croissance de la plante en conditions de stress salin en contrôlant le cycle cellulaire. En effet, la protéine RSS1 décrite chez le riz stimulerait sous l'effet de la salinité, la transition G1/S via l'inhibition putative d'une protéine phosphatase de type 1. Ainsi, en conditions salines, RSS1 protégerait les méristèmes des effets délétères du stress pour un retour rapide à la croissance une fois ce stress levé. RSS1 et l'homologue du blé dur, TdRL1, cloné au laboratoire, apparaissent donc comme étant des régulateurs positifs du cycle cellulaire en conditions de stress (Ogawa et al., 2011). Les études menées dans le chapitre 1 montrent la conservation des protéines homologues de RSS1 (RSS1-like proteins) chez les Poacées incluant le blé, l'orge et riz. Cette conservation concerne la séquence primaire, leur possible flexibilité structurale et s'étendrait aussi aux réseaux d'interactions qui montrent une relation avec le cycle cellulaire. Dans ce chapitre, nous nous intéressons à caractériser davantage TdRL1 en étudiant son expression chez le blé, la mobilité électrophorétique de la protéine, sa localisation subcellulaire, et l'effet de sa sur-expression chez la levure.

I- Etude d'expression de TdRL1 chez le blé :

Ogawa et ses collaborateurs en 2011 ont montré que **RSS1** est exprimé dans les tissus en divisions, les régions méristematiques et les primordia car son expression est maximale à la base de la plantule, là où se concentrent le méristème apical et les primodia foliaires. RSS1 est induit par le froid, tandis que les stress salin et osmotique n'ont aucun effet sur son expression. Afin de comprendre la régulation transcriptionnelle de **TdRL1**, nous avons

effectué des RT-PCR semi-quantitatives sur du blé soumis ou non à différents types de stress. Pour cela, de jeunes plantules de la variété de blé dur Oum Rabiaa (OR) âgées de dix jours ont été soumises pendant 6 et 24h à des stress salin (NaCl 150 mM), ionique (LiCl 100 mM), osmotique (PEG 15%) et au froid (4°C). Ces trois stress activent des voies de signalisation communes mais aussi des voies spécifiques (Mahajan et Tuteja, 2005).

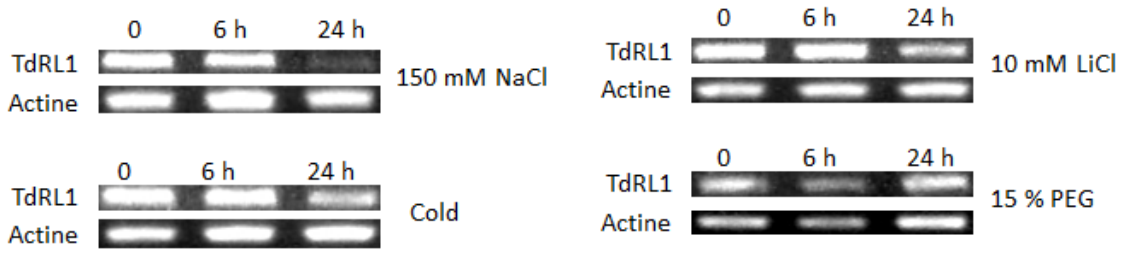


Figure 26 : RT-PCR semi-quantitatives sur de jeunes plantules de blé de 12 jours montrant l'expression de TdRL1 en présence de différents types de stress abiotiques : salin (150 mM NaCl), Froid (4°C), stress ionique (LiCl 10 mM) ou osmotique (PEG 15 %).

Les résultats présentés dans la figure 26 montrent que TdRL1 est exprimé dans les gaines en conditions normales. Aucune des contraintes appliquées n'induit une régulation positive du niveau de transcription de TdRL1 après 6 h de traitement en comparaison avec l'échantillon témoin (Figure 26). Plutôt, on observe dans le cas du stress salin, ionique et froid une légère régulation négative après 24 h de traitement mais pas après traitement avec le PEG. Ces résultats sont consistants avec l'expression connue de RSS1 qui n'est que très peu modulée par les stress salin et hydrique.

II- Etude physico-chimique et structurale de la protéine TdRL1 :

Dans le premier chapitre nous avons montré que TdRL1 possède toutes les caractéristiques de séquence primaire de RSS1 indiquant que TdRL1 et RSS1 sont orthologues. D'autre part, nous avons montré que TdRL1 comme RSS1 est constituée de larges régions sans structures caractéristiques des protéines intrinsèquement désordonnées (voir chapitre 1). Les IDP/IUP ont une structure ouverte, entrainant un retard de migration dans un gel SDS-PAGE comme décrit pour une déhydrine de blé (Drira et al., 2013). Pour tester si TdRL1 présente cette caractéristique, nous avons produit chez *Escherichia coli,*

TdRL1 sous forme recombinante associée du côté N-terminal à l'étiquette **GST.** La purification de **TdRL1** a été réalisée par **FPLC** suivie d'une chromatographie sur gel de filtration (**GF** : **Superdex 200 Hi-Load)**. La migration de la fusion GST::TdRL1 a été comparée à celle de la GST dans un gel SDS-PAGE à 12%.

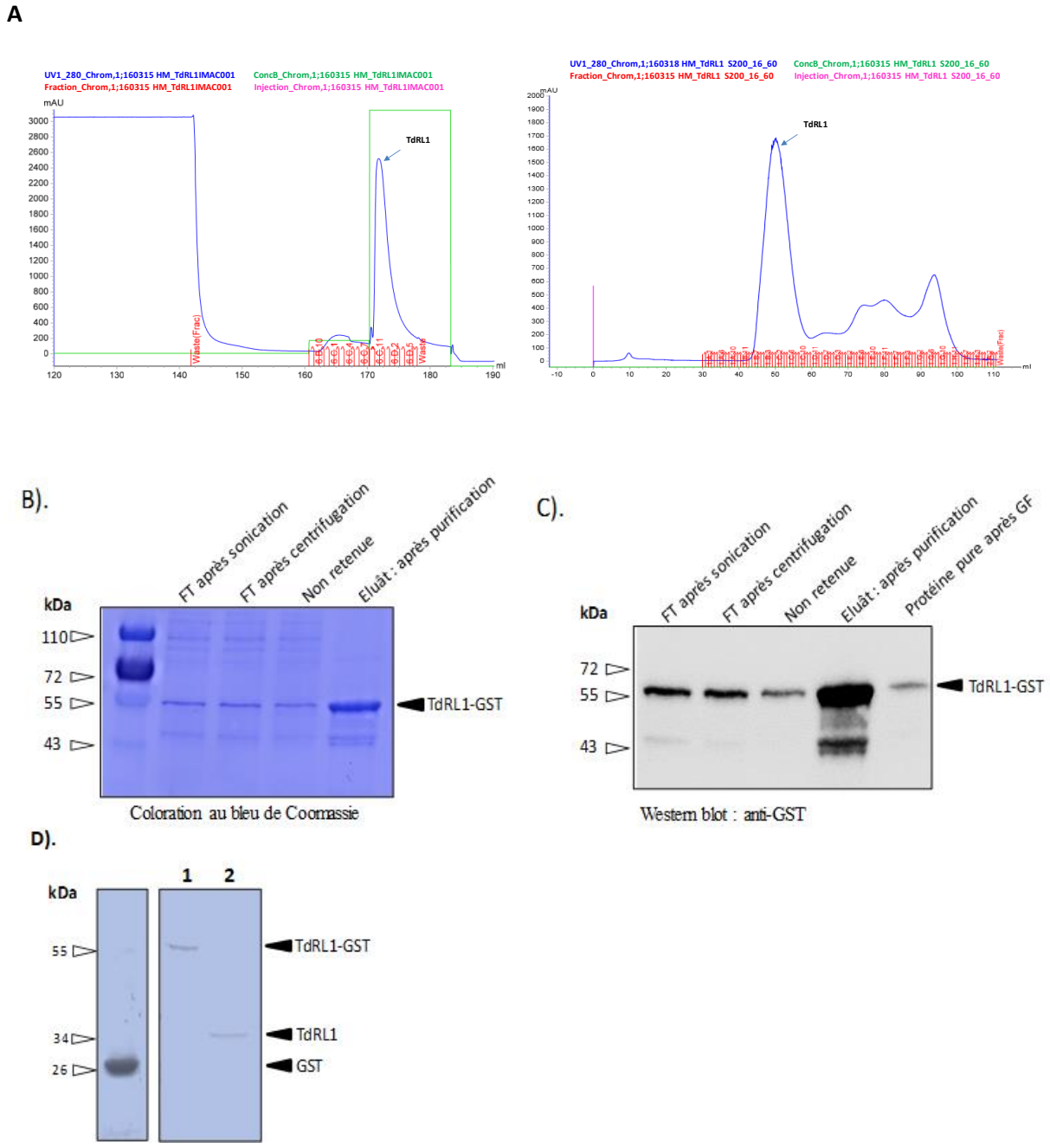


Figure 27 : Expression hétérologue de TdRL1 chez *E. coli*. A) Profil FPLC de purification de la protéine recombinante TdRL1-GST après filtration sur gel (Superdex S200) (chromatogramme 2) B). Profils SDS-PAGE après coloration au Bleu de Coomassie des fractions issues de la purification de TdRL1-GST, à savoir les fractions (FT) après sonication et après centrifugation, la fraction non retenue et l'éluat . C) Les mêmes fractions qu'en B ont été révélées par western blot avec un anti-GST. D) La protéine TdRL1-GST purifiée migre à la MM de 34 kDa (protéine seule)(piste2) et à 55 kDa pour la protéine de fusion avec la GST (piste1).

Les différentes fractions récupérées ont été analysées par **SDS-PAGE** à **12%** et par western blot avec un anticorps anti-GST. Comme indiqué sur la Figure 27, la protéine **GST** seule migre à la position attendue correspondant à sa taille calculée de **26** kDa. En revanche, la mobilité de GST::TdRL1 est plus lente que prévu car la protéine a migré vers une taille de **55** kDa au lieu de **52** kDa (poids moléculaire théorique de la protéine de fusion avec l'étiquette). Lorsque l'étiquette **GST** est coupée (avec la thrombine), nous avons observé à nouveau une mobilité aberrante de **TdRL1** (30 kDa au lieu de 26 kDa). Ce retard de migration suggère fortement que la protéine **TdRL1** se comporte comme une **IDP**.

III- TdRL1 améliore la tolérance au stress chez la levure :

Les levures et plus généralement *Saccharomyces cerevisiae* sont souvent présentées comme des champignons microscopiques vivant aussi bien en conditions aérobies qu'anaérobies. Elles se développent surtout en milieu acide : leur optimum de pH se situe entre 4,5 et 6,5 mais elles tolèrent des valeurs entre 2,5 et 8,0 (Barnett et al., 1990). Les levures sont mésophiles et peuvent tolérer une large gamme de température. Cependant, elles ne croissent généralement pas à des températures supérieures à 40°C et leur optimum se situe entre 25 et 30°C. Du fait de sa rapidité à se diviser en culture liquide et solide, *S. cerevisiae* est devenu un outil de choix en matière de manipulation génétique. Ainsi pour débuter la caractérisation fonctionnelle de TdRL1 *in vivo* nous avons tout d'abord choisi d'effectuer des tests de croissance chez des levures sur-exprimant TdRL1.

Par ailleurs, la protéine phosphatase de type 1, codée par ***GLC7*** chez *Saccharomyces cerevisiae*, est une sérine/thréonine phosphatase impliquée dans la régulation d'une large gamme de fonctions physiologiques. Vingt allèles mutants de ***GLC7*** ont été générés dans lesquels les codons qui codent pour des groupes de résidus chargés ont été modifiés en alanine. Ces mutants confèrent des phénotypes divers allant d'un arrêt du cycle cellulaire, la résistance au 2-désoxyglucose, des taux modifiés de glycogène, à une sensibilité à de fortes teneurs en sel, et des défauts de la sporulation (Baker et al. 1997). **RSS1** a été décrit comme un régulateur positif du cycle cellulaire pendant le stress, confirmant ainsi la tolérance au sel dans le riz à travers son inhibition potentielle d'une protéine phosphatase de type 1, **OsPP1a** (Ogawa et al., 2011). Pour étudier le rôle de **TdRL1** dans la tolérance au stress chez la levure, nous avons ainsi décidé d'explorer l'effet de sa surexpression dans des fonds génétiques

sauvage et mutants. Nous disposons au laboratoire de 2 mutants de levure dans le gène *glc7*. Le premier, *glc7-F256A* (**KT2210**) est touché dans le domaine régulateur de la phosphatase (motif RVxF). Cette mutation empêche la fixation de protéines régulatrices sur la phosphatase catalytique. Ce mutant est hypersensible au sel et montre un arrêt de croissance à 37°C. Le second, *glc7-127* (KT1623) possède deux mutations des lysines K110 et K112 en alanine et présente une hypersensibilité au sel et une croissance ralentie à 30°C (Wu et Tatchell, 2001 ; Williams et al., 2002).

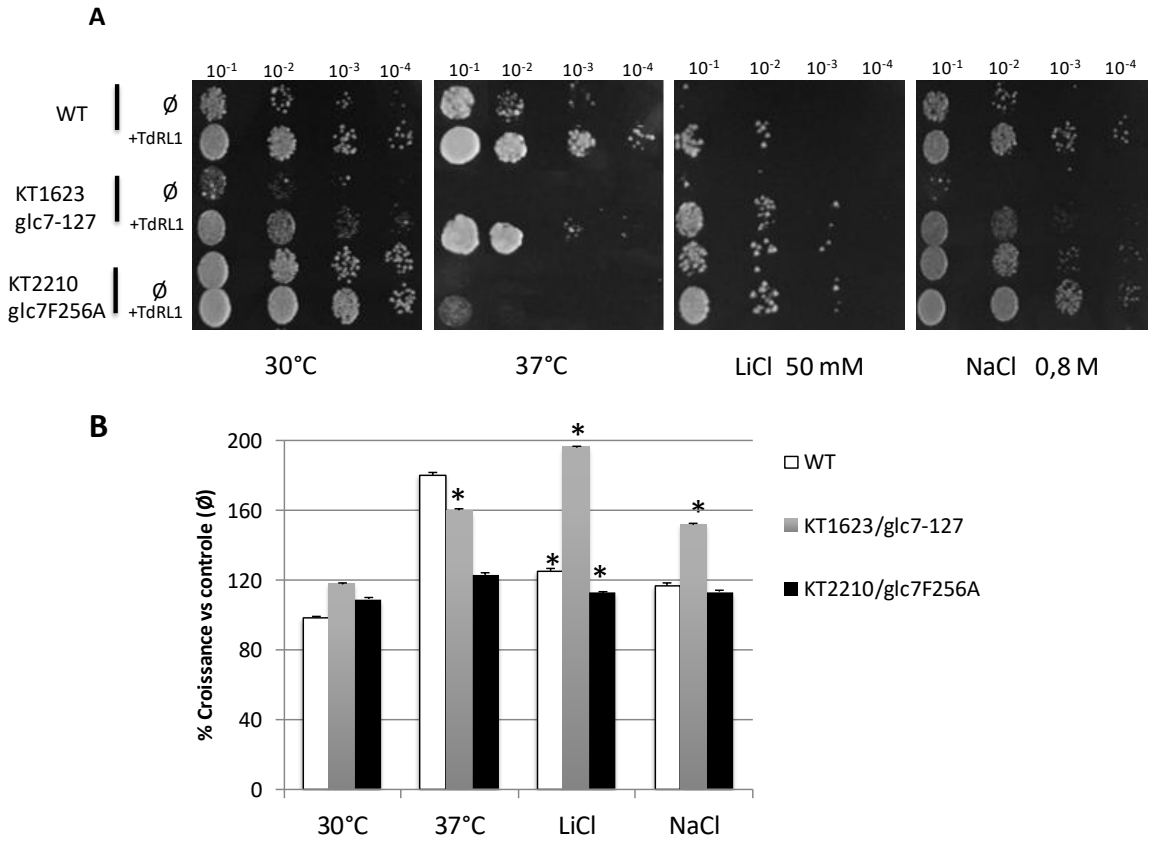


Figure 28 : L'expression de TdRL1 chez la levure (sauvage et mutants (*glc7*) améliore la tolérance aux stress abiotiques. A) Des souches de levure sauvage ou mutantes ont été transformées avec le vecteur vide (Ø) ou contenant TdRL1 (+TdRL1) puis cultivées pendant 2 jours en conditions normales (30°C), exposés à la chaleur (37°C), au stress ionique (LiCl, 50 mM) ou salin (NaCl 0.8 M) dans un milieu riche contenant du galactose. Les tests présentés sont représentatifs d'au moins 3 expériences indépendantes. B) Les mêmes souches ont été cultivées en milieu liquide pendant 24h. Les données sont présentées en pourcentage de croissance des levures transformées par TdRL1 par rapport aux souches contrôles. Les astérisques représentent les différences statistiquement significatives ($p<0.05$)

Pour mener l'expression hétérologue dans les différentes souches de levure, l'ORF de ***TdRL1*** a été clonée dans le vecteur d'expression pYES2 de levure en aval du promoteur *GAL1* inductible par le galactose puis transférée à la souche sauvage (KT1112) ainsi qu'aux deux mutants *glc7* (*glc7- 127* et *glc7-F256A*).

Après transformation, des tests de croissance sur milieux solides en présence de galactose et sous stress salin, ionique, et thermique ont été réalisés. Les mécanismes de tolérance aux différents sels passent par diverses voies de régulation expliquant ainsi les différences de phénotype des souches mutantes face à ces sels (Arino et al., 2010). Toutefois, les phénotypes publiés des différents mutants ont pu être confirmés. Dans des conditions de croissance standard (sur YPGalactose à 30°C), les souches de levure exprimant **TdRL1** améliore légèrement la croissance par rapport aux souches contrôles transformées avec le vecteur vide (Figure 28).

Cependant, à 37°C, les cellules de levure exprimant **TdRL1** présentent une nette amélioration de croissance par rapport aux souches transformées avec un vecteur vide. Cette amélioration est particulièrement prononcée chez le mutant *glc7-127* exprimant **TdRL1** dont la croissance à 37°C est similaire à celle observée à 30°C. Par contre, l'effet de la sur-expression de **TdRL1** est moins flagrant chez le mutant *glc7F256A* qui présente une amélioration de croissance modérée. En présence du stress salin (NaCl 0,8 M ou LiCl 50 mM), la surexpression de **TdRL1** améliore la croissance des souches *glc7-127* et *glc7F256A* et WT. Pour confirmer l'effet d'amélioration de la croissance associée à **TdRL1** de manière quantitative, nous avons réalisé des séries de tests en culture liquide. Dans des conditions standards, une très légère amélioration de la croissance est observée chez le sauvage et les mutants *glc7-127* et *glc7F256A* exprimant **TdRL1** en comparaison avec des souches transformées avec le vecteur vide. Cependant, l'amélioration de la croissance est observée de manière significative en conditions de stress où les croissances relatives sont nettement augmentées par rapport à celles observées en conditions standards. Ainsi, nous avons enregistré une augmentation de 2,3 et 1,5 fois de la croissance du mutant *glc7-127* exprimant TdRL1 sous stress LiCl et NaCl respectivement, comparé aux souches contrôles (transformées avec le vecteur vide). A 37°C, l'expression de TdRL1 a permis une amélioration de la croissance de 1,6 et 1,8 fois des souches *glc7-127* et WT respectivement. Ces données

montrent que TdRL1 est fonctionnelle chez la levure où elle participe à améliorer la tolérance aux stress thermique et salin.

IV- Etude de l'interaction entre TdRL1 et TdPP1 :

L'équipe japonais (Ogawa et al 2011, 2012) a montré que RSS1 interagit avec une protéine phosphatase de type 1 chez le riz. Ceci nous a incité à tester l'interaction entre **TdRL1** et **PP1**. En parallèle au laboratoire, TdPP1, une PP1 de blé dur très similaire à celle de riz interagissant avec **RSS1** a été décrite (Bradai et al. 2018). Nous avons ainsi effectué des essais de co-immunoprécipitation en utilisant d'une part la protéine purifiée **GST-TdRL1** et d'autre part la protéine His-TdPP1 traduite *in vitro* dans des réticulocytes de lapin et radiomarquée **(Met-S^{35}).** La protéine **GST-TdRL1** est fixée sur une résine de glutathion sépharose en parallèle à la GST seule qui est utilisée comme contrôle. La protéine TdPP1 radiomarquée est ajoutée. Après plusieurs lavages et élution, les différentes fractions immuno-précipitées ont été analysées sur un gel SDS-PAGE (Figure 29) puis les bandes radiomarquées sont révélées par autoradiographie.

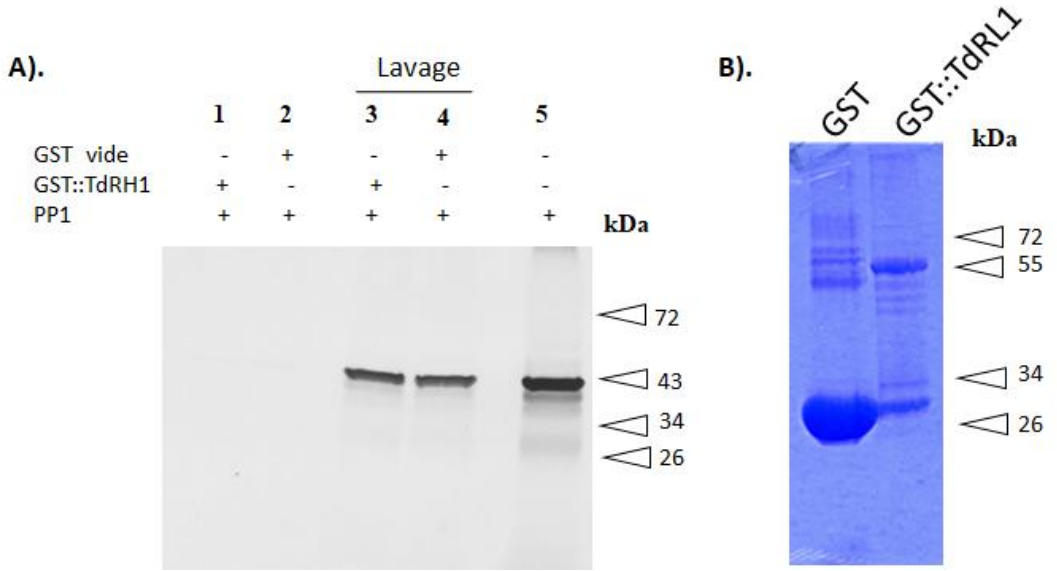


Figure 29 : Test d'interaction de TdRL1-TdPP1 par immunoprécipitation. TdRL1 fixée sur une résine est incubée avec His-TdPP1 radiomarquée.A). Après lavages et élution les fractions immunoprécipitées ont été analysées sur gel SDS 12%. B). Profil de migration de la protéine purifiée TdRL1-GST sur SDS-PAGE.

La figure 29, montre que la GST et GST::TdRL1 ont été produites en quantité suffisante comme TdPP1 (piste 5, Figure 29). Après migration électrophorétique, aucune bande correspondant à TdPP1 n'a pu être visualisée en présence de GST ::TdRL1 (piste 1, Figure 29) indiquant que, dans les conditions utilisées, il n'y a pas d'interaction entre TdRL1 et TdPP1. Toutefois, il a été décrit que les protéines interagissant avec les PP1 sont majoritairement phosphorylées et que cette phosphorylation est nécessaire à la fixation des PP1 (Bollen et al. 2010). Comme TdRL1 a été produite *chez E. coli et* ne serait pas phosphorylée, ceci pourrait ainsi empêcher l'interaction PP1-TdRL1. Des études d'interactions *in planta* sont envisagées pour répondre à cette question.

V- Transformation transitoire & effet du stress abiotique sur la localisation de TdRL1 :

1- Clonage & localisation transitoire de TdRL1:

Pour montrer la fonctionnalité de TdRL1 chez les plantes, la séquence codante de TdRL1 a été clonée dans le vecteur d'entrée pDONR-207 puis après vérification par séquençage, a été transférée par recombinaison dans différents vecteurs de destination (pK7FWG2 pour une fusion GFP C-terminale, pK7RWG2 pour une fusion RFP C-terminale). L'expression chez les plantes de TdRL1 à partir de ces constructions est sous le contrôle d'un promoteur fort (CaMV 35S).

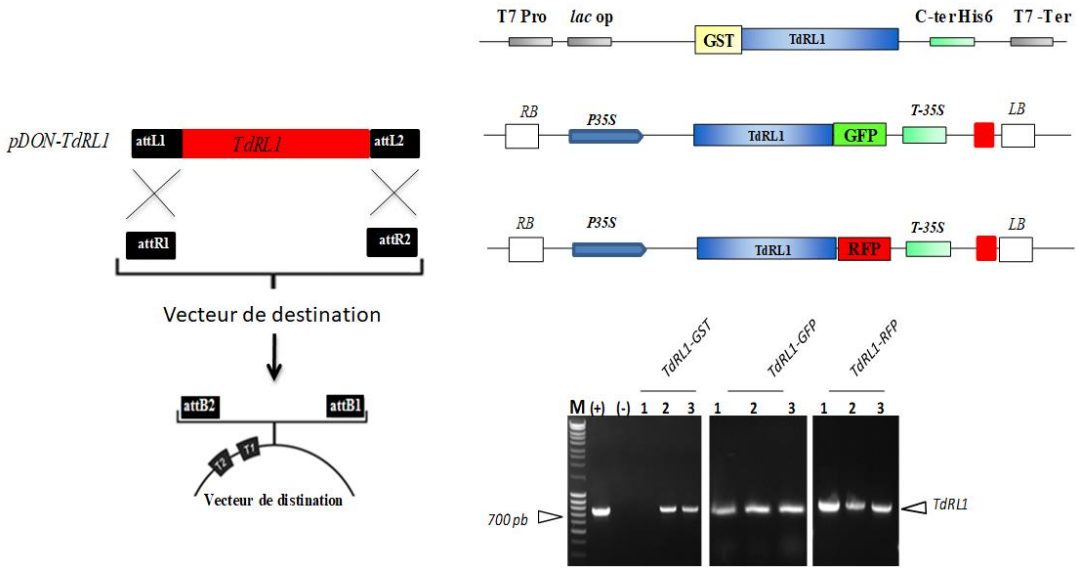


Figure 30 : Stratégie de Clonage Gateway® de TdRL1. La séquence codante de TdRL1 a été clonée dans un vecteur d'entrée pDONR-207 par recombinaison (Réaction BP). La construction générée a été utilisée pour faire la deuxième réaction (réaction LR) qui permet de générer différentes constructions (vecteurs binaire avec fusion GFP, RFP..) et sous le contrôle d'un promoteur fort (CaMV 35S) ou inductible par IPTG (construction TdRL1-GST) ; les différents étapes de clonage ont été vérifiées par séquençage et la présence de TdRL1 a été confirmée par PCR.

L'expression transitoire de TdRL1::GFP a été réalisée dans les feuilles de *Nicotiana Benthamiana* par agro-Infiltration. Quarante-huit heures après infiltration les feuilles sont observées au microscope confocal (LSM 700 Zeiss), avec une longueur d'onde d'excitation de **488** nm pour détecter la fusion TdRL1::GFP (Figure 31).

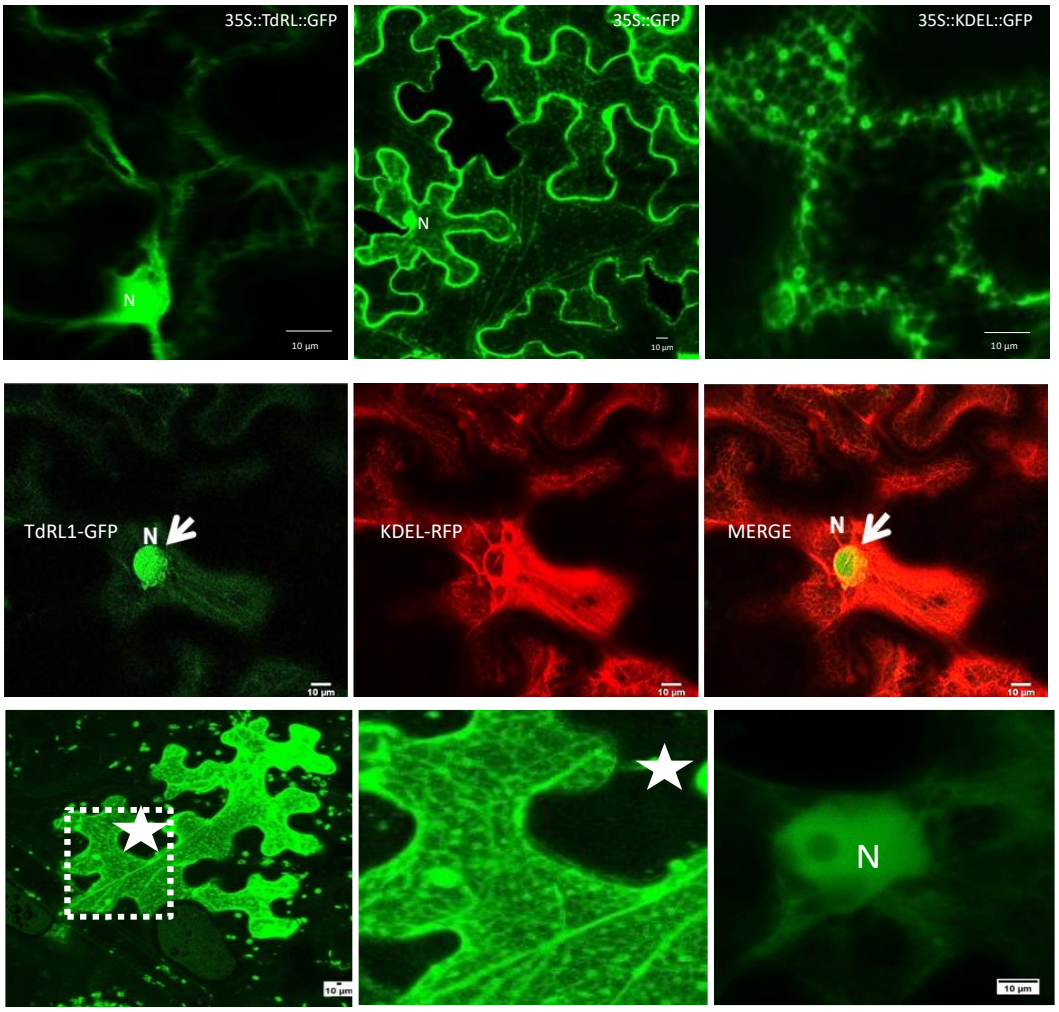


Figure 31 : Localisation transitoire de TdRL1-GFP dans les feuilles de *N. Benthamiana.* . La co-expression de TdRL1-GFP et du marqueur du réticulum endoplasmique KDEL-RFP (ne montre aucune co-localisation de TdRL1 avec le réticulum). Echelle 10 µM

Nos observations (Figure 31) montrent que TdRL1::GFP est localisée dans le noyau et dans le cytoplasme où on l'observe dans les travées cytoplasmiques. Ces travées cytoplasmiques ne correspondent pas au réseau du réticulum endoplasmique puisqu'en utilisant le marqueur du réticulum KDEL – RFP aucune co-localisation n'est observée.

De manière intéressante, en présence de stress abiotiques (NaCl, 37°C, 4°C), TdRL1-GFP s'accumule fortement dans le noyau avec la formation d'agrégats (Figure 32).

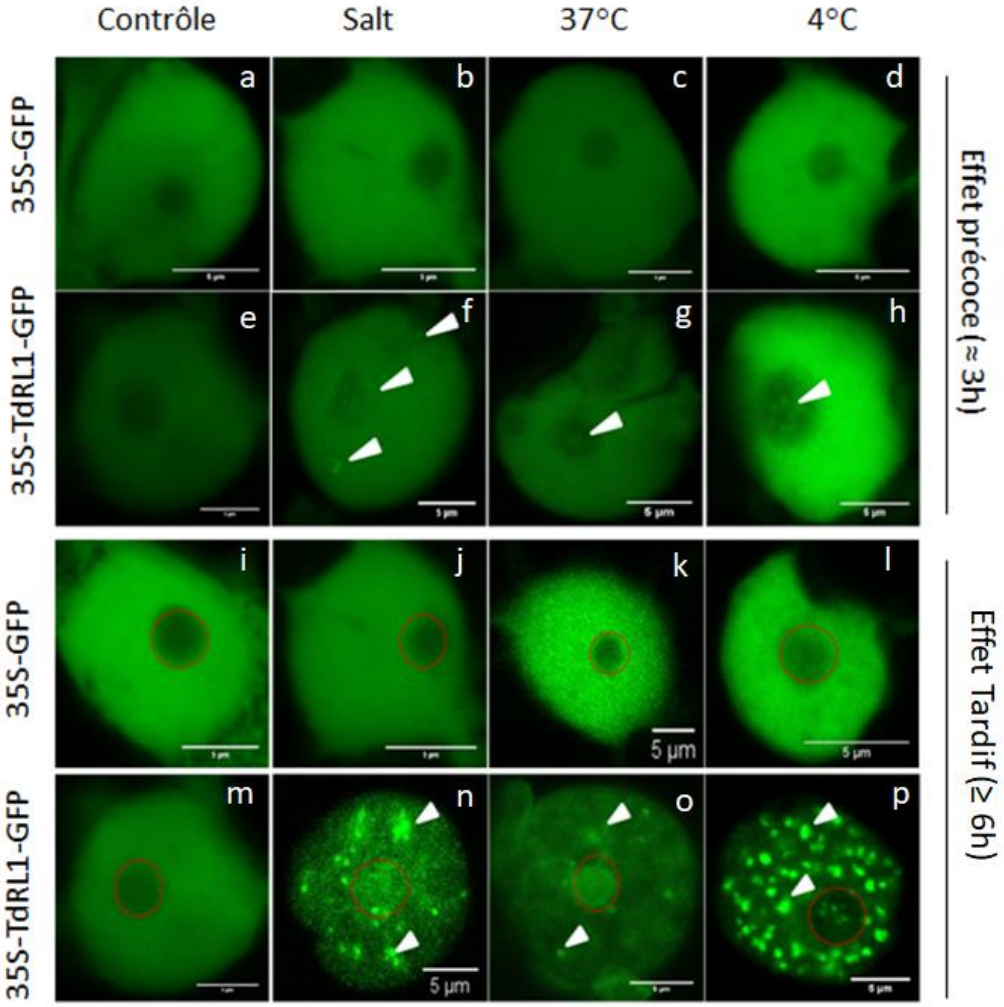


Figure 32: Effet des stress abiotiques sur la localisation de TdRL1-GFP dans les feuilles de *N. benthamiana*. TdRL1-GFP se localise dans des granules nucléolaires (f-g-h) et nucléocytoplasmiques (n-o-p) suite a un traitement salin (100 mM), chaleur (37°C) par le froid (4°C) pendant 3 et 6h. Echelle 5 µm

La forme et la taille des agrégats diffère d'un stress à l'autre, et avec la durée du traitement. Après 3 heures de traitement (par le sel ou le froid), TdRL1::GFP forme des petits foyers dans le nucléole mais après 6 heures, ces foyers forment de gros agrégats nucléaires de différentes tailles. Pour savoir à quoi correspondent ces agrégats, des expériences d'immuno-marquage devront être réalisées pour montrer s'il s'agit de cassures d'ADN double brin associées à TdRL1 (anticorps anti-gamma H2AX), ou des modifications

d’organisation de la chromatine (anticorps anti marques répressives ou activatrices) ou encore associés à des peroxysomes.

Discussion chapitre II :

Dans ce chapitre, nous avons montré que TdRL1 est bien une protéine désordonnée par sa migration aberrante en gel SDS-PAGE confirmant les données prédictives du chapitre 1. Par ailleurs, nous avons essayé de voir si comme RSS1, TdRL1 est capable d'interagir avec une protéine phosphatase de type 1 mais deux méthodes distinctes n'ont révélé aucune interaction. Malgré cet échec, une possible interaction TdRL1-TdPP1 n'est pas à exclure et des essais de co-immunoprécipitation in planta nous permettront de vérifier cette possibilité.

L'expression de RSS1 est induite par froid, mais ni par le stress salin, ni par le stress osmotique (Ogawa et al., 2011). La régulation de l'activité RSS1 est également fortement dépendante de l'ubiquitination post-traductionnelle via l'APC/C^{cdc20} en G2/M (Ogawa et al., 2011). Ici, nous montrons que dans le blé, l'expression de TdRL1 n'est induite par aucun des stress appliqués mais qu'il s'agit plutôt d'une légère régulation négative après 24 h de traitement avec le froid, le NaCl ou le LiCl. Si nous considérons que ce stress induit un arrêt du cycle cellulaire (Burssens et al., 2000; West et al. 2004) et que RSS1 est exprimé dans des cellules en prolifération, la légère régulation négative observée peut être une conséquence de la déplétion de ces cellules proliératives. De plus, nos données indiquent que **TdRL1** est exprimé dans cellules de la gaine chez blé, mais son expression n'est pas régulée de manière significative par le stress. Par conséquent, la régulation transcriptionnelle semble jouer un rôle mineur dans le contrôle des protéines RSS1 et c'est la dégradation des protéines via l'APC-Cyclosome qui serait cruciale pour le contrôle de sa fonction.

L'expression hétérologue de **TdRL1** a conféré la tolérance au stress à des levures sauvages et mutantes (*glc7-127* et *glc7F256A*). Nos données ont montré une amélioration de la croissance modérée du sauvage et des souches mutantes en l'absence de stress lorsque TdRL1 est sur-exprimé. Cependant, en conditions de stress, la promotion de la croissance due à l'expression de **TdRL1** est plus prononcée dans ces souches. Ces observations montrent que **TdRL1** est fonctionnel chez la levure et agit positivement dans la voie de la tolérance au stress. De plus, la protéine de blé est capable de trouver des partenaires dans le protéome de la levure pour aboutir à ce phénotype, ce qui est en faveur d'une conservation possible des voies de tolérance au stress entre les plantes et levures. La tolérance au stress

était encore plus faible dans le fond génétique *glc7F256A*. GLC7 code pour une protéine phosphatase de type 1 unique de type 1 phosphatase dont la délétion est létale (Baker et al., 1997). La mutation *F256A* affecte la liaison des sous-unités régulatrices (Wu et Tatchell 2001) impliquées dans diverses voies de signalisation. L'effet modéré de TdRL1 sur la tolérance au stress de cette souche mutante indique que TdRL1 peut fonctionner partiellement via *GLC7* ou que la liaison de TdRL1 à *glc7F256A* n'est que partiellement efficace. Enfin, nous ne pouvons pas exclure que TdRL1 pourrait avoir un effet positif sur la prolifération cellulaire en l'absence de stress, de manière à ce que les cellules de levure soient mieux préparées à la croissance dans des conditions de stress. Comprendre comment TdRL1 exerce sa fonction dans la levure et confère la tolérance au stress va certainement aider à mieux cerner le fonctionnement de TdRL1 dans la tolérance au stress chez le blé et trouver les liens moléculaires communs impliqués dans la tolérance au stress chez la levure et les plantes.

Enfin, lors de l'expression transitoire dans des feuilles de tabac nous avons pu montrer que TdRL1::GFP est localisée de manière ubiquitaire dans le cytoplasme et dans le noyau mais que les stress abiotiques entrainent son agrégation dans les noyaux des cellules épidermiques observées. Ces agrégats restent à ce jour inexpliqué (Ali et Reddy, 2008). La signification de ces agrégats est intéressante à explorer en détails afin de comprendre de comprendre le rôle de TdRL1 dans le noyau lors d'un stress. Le fait que TdRL1 s'agrège dans le noyau lors d'un stress indique que cette protéine est capable de fonctionner dans divers compartiments subcellulaires pour y exercer des fonctions bien définies.

En conclusion, nous fournissons les preuves que la protéine TdRL1 améliore la tolérance au stress abiotique chez la levure et semblerait trouver des partenaires chez la levure pour assurer leur fonction. De plus les données d'expression de TdRL1 chez le blé, son accumulation au noyau en présence de stress abiotiques montrent bien qu'il y a un lien entre la perception du stress et la protéine TdRL1. Il est intéressant de continuer l'étude moléculaire et physiologique et voir la fonctionnalité de TdRL1 dans la plante modèle *Arabidopsis*.

Chapitre III

Etude fonctionnelle de TdRL1 in planta

ETUDE FONCTIONNELLE DE TdRL1 IN PLANTA

Introduction :

RSS1 décrite initialement chez les monocotylédones stimule le cycle cellulaire lors d'un stress salin et intervient dans la maintenance des méristèmes en conditions de stress (Ogawa et al., 2011). Dans les chapitres précédents, j'ai pu montrer que **TdRL1** code pour l'homologue de **RSS1** et que sa surexpression chez la levure améliore la tolérance aux stress abiotiques.

Dans le chapitre 1, nous avons montré que PANS1 d'*Arabidopsis* possède une faible homologie de séquence avec RSS1/TdRL1 mais une forte homologie de structure tridimensionnelle. De plus, le mutant *pans1-1/cmr1-2* révèle une sensibilité au stress salin associée à une réduction du nombre de cellules dans l'apex racinaire suggérant un ralentissement du cycle cellulaire (Juraniec et al., 2014 ; Ogawa et al., 2011) similaire à celui observé dans le mutant *rss1* (Ogawa et al. 2011).

Ces données nous permettent de penser que TdRL1 puisse promouvoir la croissance des plantes d'Arabidopsis en conditions de stress abiotiques. A cette fin, nos efforts se concentrent ici sur l'étude de la fonction de TdRL1 chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana* par sa sur-expression dans différents fonds génétiques mais aussi par l'analyse de sa localisation tissulaire et subcellulaire.

I- Localisation cellulaire et tissulaire de TdRL1

1- Localisation cellulaire des RSS1-like dans les cellules BY-2 :

Pour montrer la fonctionnalité de PANS1 dans la réponse au stress salin et la comparer avec TdRL1, la séquence codante de *PANS1* a été obtenue grâce au Dr. Raphael Mercier (Institut Jean-Pierre Bourgin, Versailles INRA). La séquence codante de *PANS1* a ensuite été

transférée dans le vecteur pK7FWG2, pour une fusion GFP du côté C-terminal. Après vérification par séquençage, la construction a été transférée à *Agrobacterium tumefaciens* pour mener des essais d'expression transitoire chez le tabac (Figure 33).

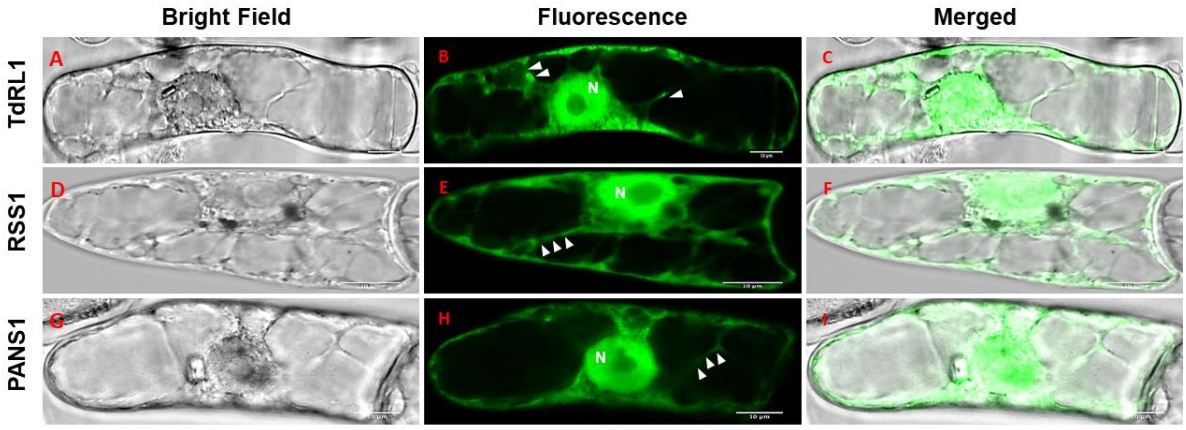


Figure 33 : Localisation cellulaire des protéines TdRL1-GFP, RSS1-GFP and PANS1-GFP dans les cellules de *tabac BY2*. Toutes les protéines de fusion sont cytoplasmiques et nucléaires, avec la présence des travées cytoplasmiques (flèches) (B–E-H). Images en « bright field » (BF), fluorescence eGFP (F). échelle = 10 µm.

L'expression transitoire de PANS1::GFP a été réalisée dans les feuilles de *Nicotiana Benthamiana* et dans des cellules *BY2*. Ces expériences montrent que PANS1::GFP est nucléaire et cytoplasmique. Une localisation identique a été observée avec TdRL1::GFP et RSS1::GFP.

2- <u>Localisation cellulaire et tissulaire de TdRL1 chez Arabidopsis</u>

Différentes lignées sur-exprimant TdRL1 en fusion GFP, RFP ou sans étiquette et sous le contrôle du promoteur fort (CaMV 35S) ont été obtenues par transformation d'un écotype hybride Col-0xWS utilisé au laboratoire. La sélection des transformants primaires est effectuée sur milieu MS additionné de Kanamycine (50 µg/ml). Les plantules résistantes sont suivies par l'analyse de leur ségrégation jusqu'à la troisième génération pour ne garder que les plantules ayant une seule insertion et étant homozygotes. Des analyses moléculaires ont ensuite été menées pour confirmer le niveau d'expression de **TdRL1** dans les différentes lignées générées. On remarque que les différentes lignées expriment TdRL1 à des taux variables, la lignée Cl6 ayant le taux d'expression le plus élevé alors que la lignée Cl1 le plus

faible (Figure 34). Ces plantes ont été utilisées par la suite pour mener une série d'analyses physiologiques.

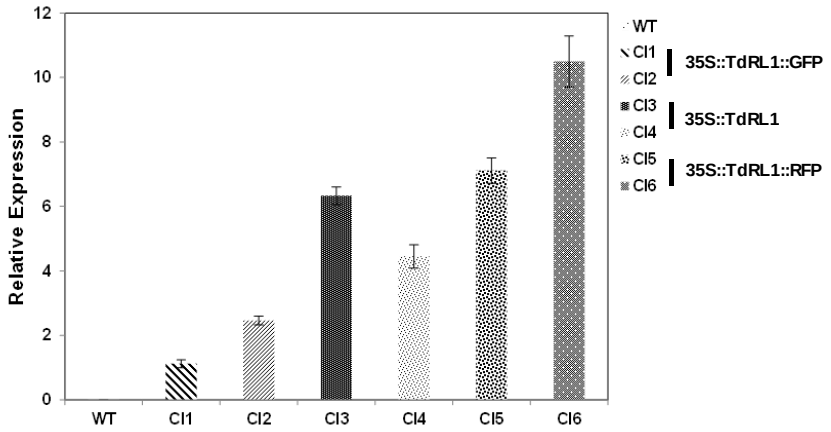


Figure 34 : Analyse de l'expression du gène TdRL1 chez *Arabidopsis*. Des échantillons d'ARNs totaux ont été préparés à partir des lignées surexprimant TdRL1 (et une plante sauvage) âgées de 9 jours. Les résultats de RT-qPCR sont présentés pour 3 échantillons biologiques par lignée et 3 répétitions techniques.

L'analyse par microscopie confocale des pointes racinaires des transformants exprimant TdRL1::GFP (Cl1 et Cl2) montre une localisation périnucléaire et cytoplasmique de la protéine et qui est restreinte aux cellules méristématiques de la racine (Figure 35-A, B), différente de la localisation nucléo-cytoplasmique observée dans les cellules BY-2 et dans les cellules épidermales de *Nicotiana Benthamiana* (chapitre 2, ci-dessus). Cette localisation a été confirmée par immunomarquage avec un anticorps anti-GFP et un contre-marquage des noyaux au DAPI (Figure 35-B).

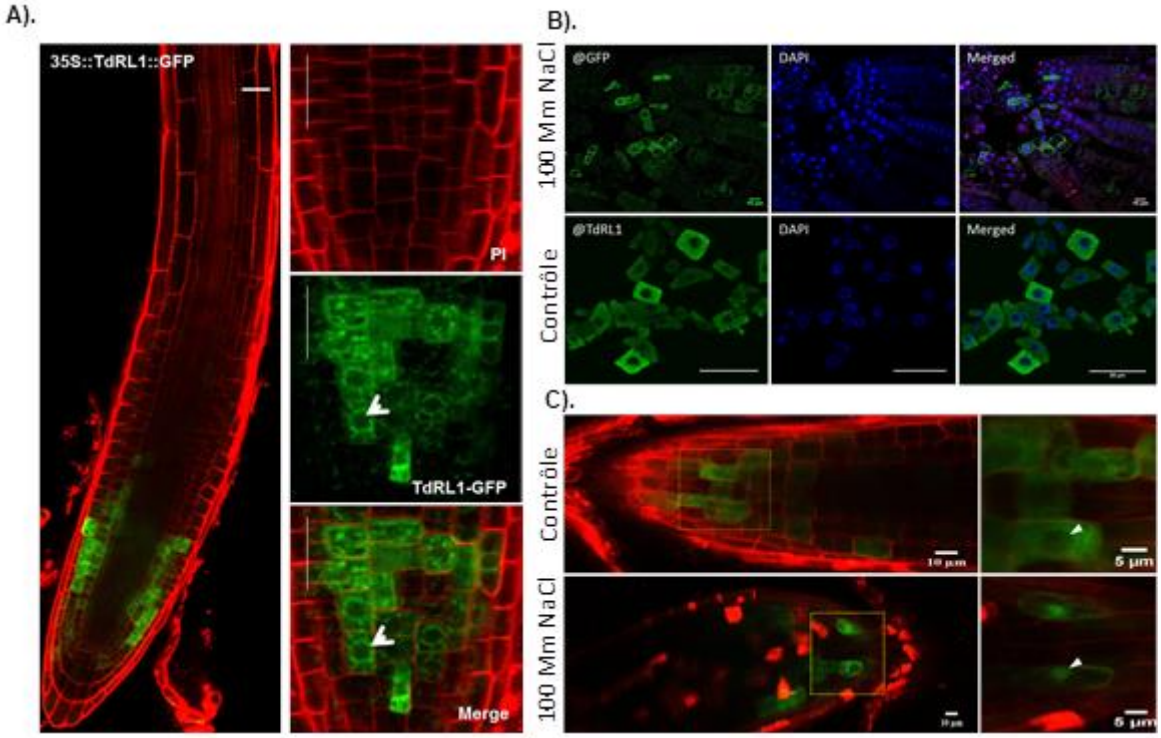


Figure 35 : Localisation subcellulaire de TdRL1 :: GFP. A). TdRL1-GFP est périnucléaire dans les cellules méristématiques ;barre d'échelle = 5 µm. B). Immunomarquage de TdRL1 avec un anti-GFP (vert) et anti-TdRL1 (vert), avec marquage du noyau au DAPI (Bleu). C). Translocation de **TdRL1** dans le noyau à la suite d'un stress salin (100 mM). Les parois des cellules sont visualisées grâce à un marquage à l'iodure de propidium.

Par ailleurs, les racines de ces lignées ont été observées suite au traitement d'une nuit avec 100 mM NaCl. On remarque sur la Figure 35-C, que le signal TdRL1::GFP est cytoplasmique mais aussi nucléaire montrant une relocalisation de TdRL1 ::GFP dans le noyau suite au stress appliqué. Cette observation indique une fonction nucléaire de TdRL1 lors d'un stress.

3- <u>Localisation microtubulaire de TdRL1-GFP dans les cellules en division chez Arabidopsis :</u>

Pour mieux comprendre le lien fonctionnel entre TdRL1 et les microtubules, les gènes liés à la mitose, des observations microscopiques des RAM des lignées surexprimant TdRL1 ont montré que TdRL1 :: GFP est seulement exprimée dans les cellules méristématiques et en particulier dans les couches externes des racines (Figure 35). De plus, TdRL1 est présent dans le cytoplasme et s'accumule sous forme de foci en périphérie nucléaire (Figure 36). Cette localisation a été confirmée avec des essais d'Immunomarquage effectuée sur les extrémités

racinaires des lignées TdRL1 :: GFP en utilisant un anticorps anti-GFP et un anti-α-tubuline où TdRL1 y est détectée dans le cytoplasme (Figure 36), en formant des foci en périphérie nucléaire dans les cellules interphasiques (Figure 36-a, flèches) et n'est pas exclu du fuseau MT mitotique en métaphase dans les cellules en division (Figure 36-b, ouvert pointe de flèche). TdRL1-GFP forme également des agrégats en fin de télophase dans des cellules en division (Figure 36).

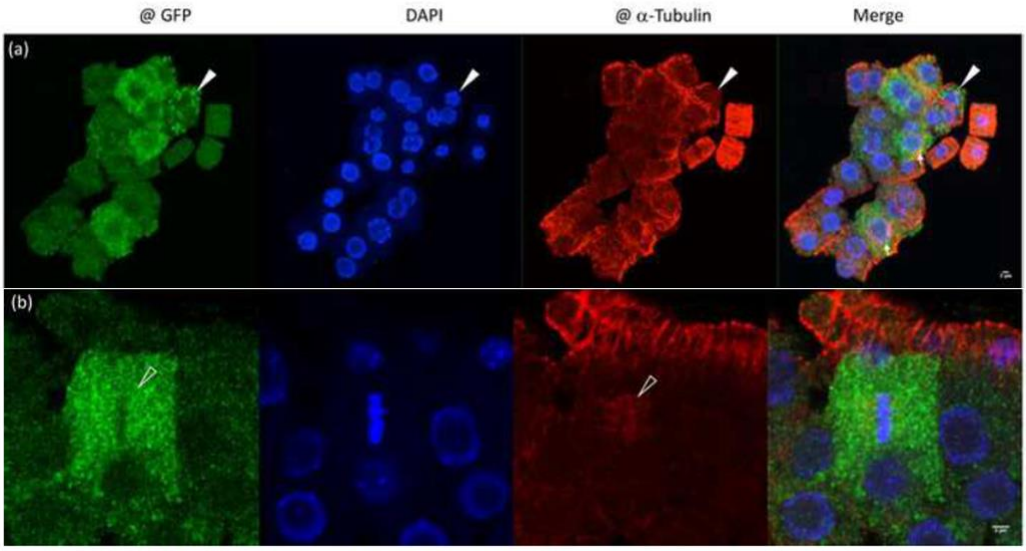


Figure 36 : Localisation subcellulaire de TdRL1 :: GFP dans des cellules en division. (a)TdRL1-GFP est localisé dans le cytoplasme et à la périphérie du noyau sous forme de foci, dans les cellules interphasiques et au niveau du cytoplasme et du fuseau mitotique dans des cellules en division (b) ; L'immunomarquage est fait sur les pointes des racines des lignées surexprimant TdRL1-GFP en utilisant un anticorps anti-GFP (Vert) et un anti-α-tubuline (rouge), les noyaux sont colorés en bleu (DAPI). Les flèches simples indiquent une télophase précoce où TdRL1 ::GFP est accumulée dans des foci au niveau du cytoplasme. Les flèches ouvertes montrent le fuseau mitotique. Barre d'échelle = 2 µm.

Ces observations confirment les analyses de co-expression suggèrant un lien entre TdRL1 et la régulation de la mitose, notamment avec le réseau microtubulaire et indiquent une nouvelle fonction possible de TdRL1 pendant la mitose.

4- <u>Stabilité de TdRL1 et effet du MG132 :</u>

La localisation de TdRL1-GFP restreinte aux cellules méristématiques de la racine, nous amène à penser qu'il y a une régulation post-traductionnelle de **TdRL1** affectant sa stabilité dans la cellule. Cette régulation se ferait à travers la présence des motifs **D**-box et **DEN**-Box

décrits comme des sites essentiels pour la dégradation des protéines RSS1-like *via* l'APC/C cyclosome (Ogawa D et al 2011). Afin de tester la stabilité de la protéine **TdRL1::GFP**, des plantules des lignées Cl1 et Cl2 ont été traitées avec l'inhibiteur de l'APC/C, MG132 pendant 6 heures. Les analyses par microscopie confocale ont révélé que **TdRL1::GFP** est détectée dans une région plus large de la pointe racinaire suggérant ainsi sa stabilisation dans cette zone (Figure 37-A).

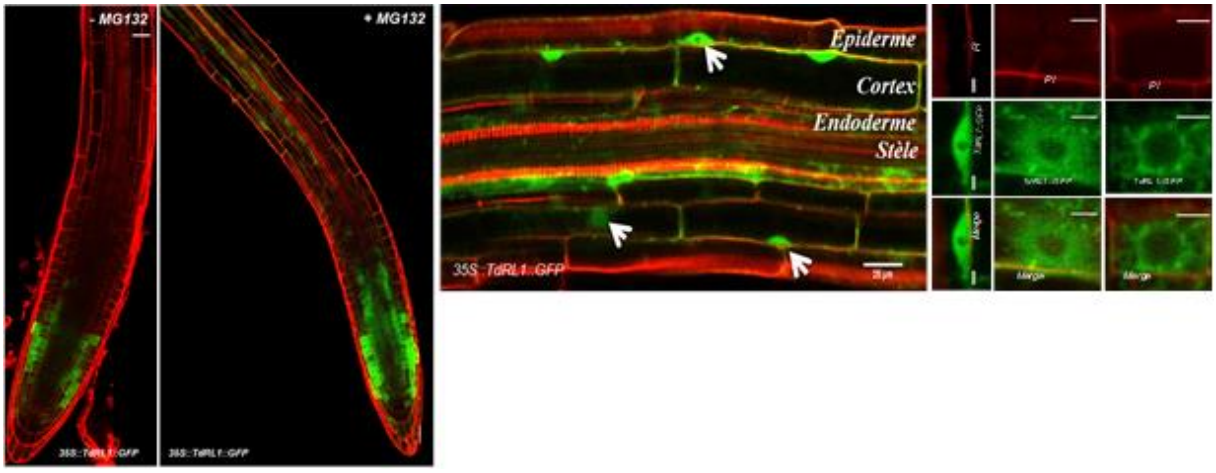


Figure 37 : Effet du MG132 sur la stabilité de TdRL1-GFP (6h, 100 µM MG132). La couleur rouge correspond à la coloration à l'iodure de propidium. La localisation de TdRL1-GFP est dépendante du type des cellules, TdRL1-GFP est cytoplasmique et périnucléaire dans les cellules méristématiques et nucléaire dans la zone de différenciation. Barres d'échelle : 5 µm.

II- Rôle de *TdRL1 in planta* dans la tolérance au stress salin

1- Effet de la sur-expression de TdRL1 chez Arabidopsis :

a- Effet sur la germination lors d'un stress salin et ionique :

Des études physiologiques menées sur les lignées transgéniques et sauvage ont montré que la surexpression de **TdRL1** chez *Arabidopsis* confère aux plantes une tolérance au stress salin (NaCl) et ionique (LiCl). En effet, cette tolérance est observée au stade germinatif en présence 150 mM NaCl et 20 mM LiCl. En effet, deux jours après la germination (2 DAG), les lignées sur-exprimant TdRL1 germent mieux (entre

80 et 90% sur LiCl et entre 18 et 50 % sur NaCl) que la lignée sauvage dont le taux de germination ne dépasse pas les 5% en présence de NaCl 150 mM et de 75% sur LiCl 20 mM (Figure 38). Ces résultats suggèrent que TdRL1 a un effet positif sur les premiers stades de développement des graines lorsque celles-ci sont cultivées en conditions adverses et leur confère ainsi une meilleure tolérance au stress salin mais aussi ionique.

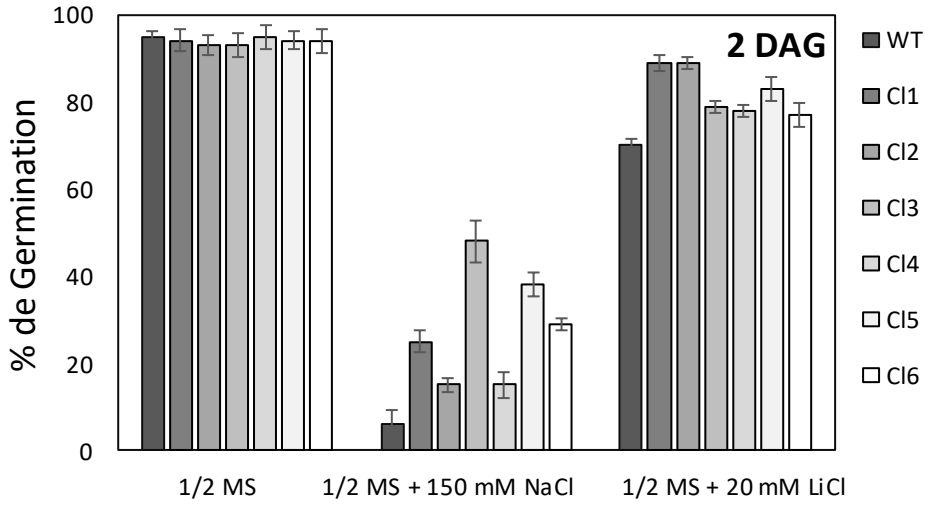


Figure 38 : Influence de la sur-expression de TdRL1 chez Arabidopsis sur le pouvoir germinatif des graines transgéniques. Le pourcentage de germination a été mesuré chez le WT et chez les surexpresseurs TdRL1 après une incubation sur milieu ½ MS, ½ MS + NaCl(150 mM) et LiCl (10 mM). Trois expériences indépendantes ont été réalisées.

b- Augmentation de la taille du méristème et de la masse fraiche en réponse au stress salin :

L'amélioration de la résistance au stress salin au stade précoce de développement est confirmée par l'étude de la taille des méristèmes racinaires des plantules transgéniques mais aussi de leur masse fraiche (Figure 39). Les données montrent que chez les plantes d'*Arabidopsis* exprimant **TdRL1,** les méristèmes sont plus grands par rapport au WT. Cette augmentation de la taille du méristème (1,35 fois par rapport au WT) résulte en une augmentation de la taille des plantes aux premiers

stades de développement, et donc de la masse fraiche des jeunes plantules (10jours ; 1,2 fois par rapport au sauvage).

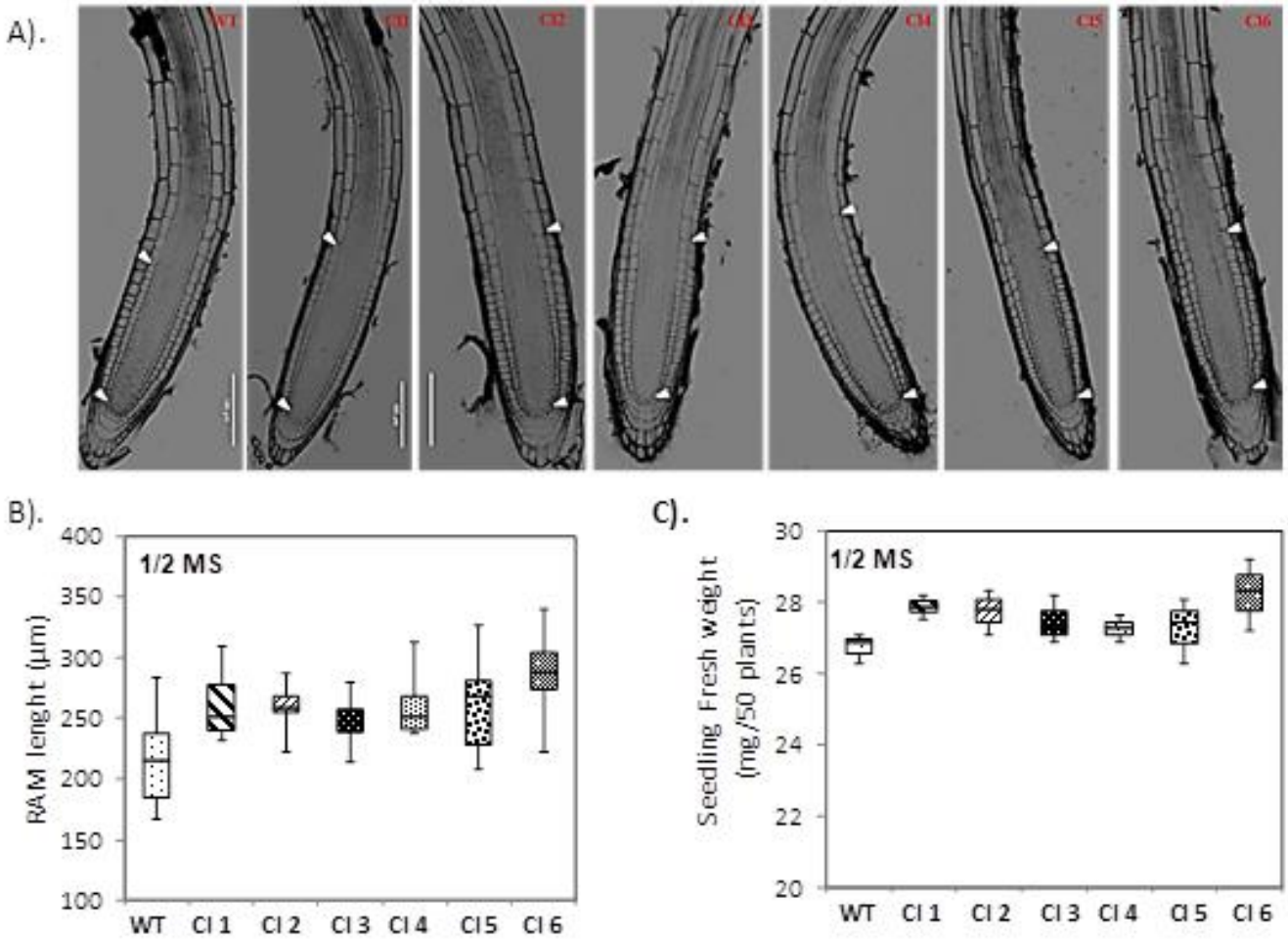


Figure 40 : Effet de la surexpression de TdRL1 sur la biomasse et la taille du méristème chez *Arabidopsis***.** (A) images des méristèmes racinaires des lignées sauvage et OE issues de plantules de 7 jours, Comparaison de la taille du méristème (B) et la masse fraiche (C) des plantules WT et les lignées exprimant TdRL1. La biomasse a été obtenue en pesant 50 plantules de chacune des lignées (exprimée en mg de poids frais). La longueur moyenne du méristème a été déterminée en micromètres (µm) pour 15 à 20 plantules par lignée. Les valeurs obtenues sont présentées à droite de l'histogramme. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard.

2- <u>TdRL1 et le stress oxydatif : détoxification des ROS :</u>

La réponse au stress salin est fortement liée à la mobilisation des **ROS** chez les plantes car il induit l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (**ROS**) qui induisent un stress oxydatif (Nxele et al 2017). Puisque, la surexpression de **TdRL1** améliore la tolérance au sel, nous nous sommes intéressés de suivre l'accumulation des ROS par la coloration des feuilles

au **nitrobluetetrazolium (NBT)**, et **3-diaminobenzidine (DAB)** pour détecter les espèces réactives (**O_2^-**) et (**H_2O_2**) respectivement après exposition des plantes à un stress salin (Figure 40).

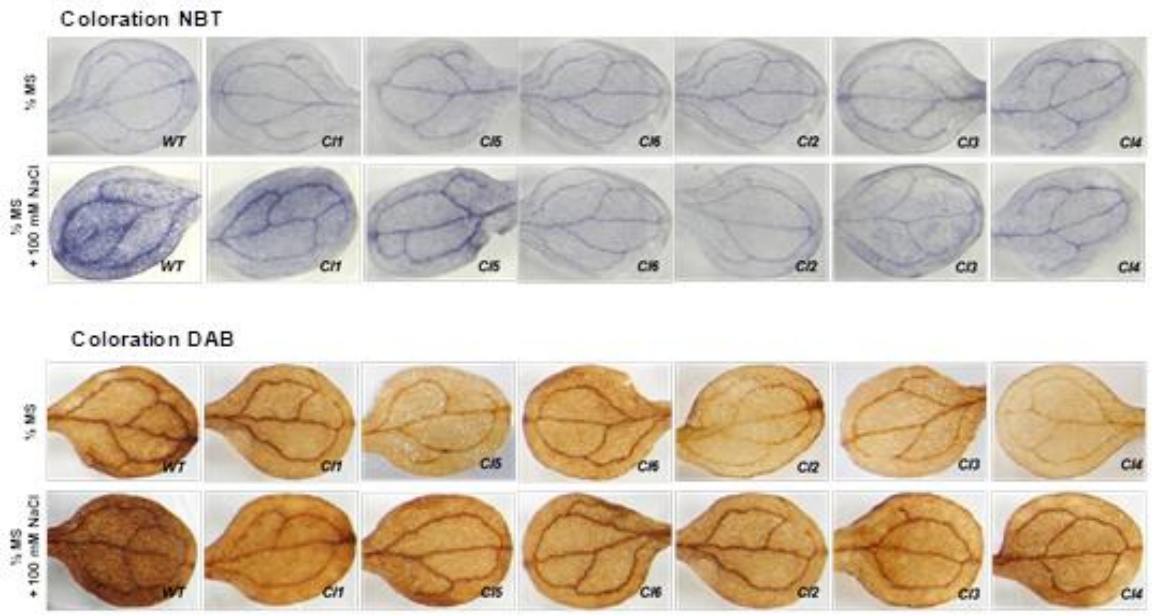


Figure 40 : Effet de la surexpression de TdRL1 chez *Arabidopsis* sur l'accumulation des ROS. Localisation *in situ* des radicaux peroxydes et de superoxydes par la coloration DAB (en bas) et NBT (en haut) dans les feuilles de plantules transgéniques et contrôle de 9 jours cultivées en conditions normales ou en présence de 100 mM NaCl.

En absence de stress, un faible signal est détecté par **NBT** et **DAB** sur les feuilles des sur-expresseurs et du WT. Par contre, en conditions de stress (NaCl 100 mM), une forte accumulation de **O_2^-** et **H_2O_2** est observée chez le sauvage par rapport aux lignées transgéniques. Ces résultats indiquent que **TdRL1** permettrait une diminution de l'accumulation des ROS chez *Arabidopsis* à la suite d'un stress salin.

Pour avoir des données quantitatives, nous avons mesuré le contenu en peroxyde d'hydrogène sur les différentes lignées en conditions normales et en conditions de stress (Figure 41-A). En conditions standards, les lignées transgéniques ont globalement des niveaux de H_2O_2 comparables à ceux observés chez le sauvage (Figure 41-A). Par contre sous stress salin, les lignées transgéniques ont un taux de peroxyde d'hydrogène environ 25 % inférieur à celui du sauvage. La mesure des activités de la Catalase (**CAT**) et de la Superoxyde Dismutase (**SOD**), impliquées dans l'élimination des **ROS,** a été déterminée dans des conditions normales et de stress. Les activités de **CAT** et **SOD** sont similaires et aucune

différence significative entre les lignées **TdRL1** et la lignée sauvage n'est observée en conditions normales. Au contraire, lors d'un stress salin, les activités **CAT** et **SOD** sont significativement augmentées (environ 1,7 fois et 1,3 fois respectivement) dans les lignées transgéniques par rapport aux plantes témoins.

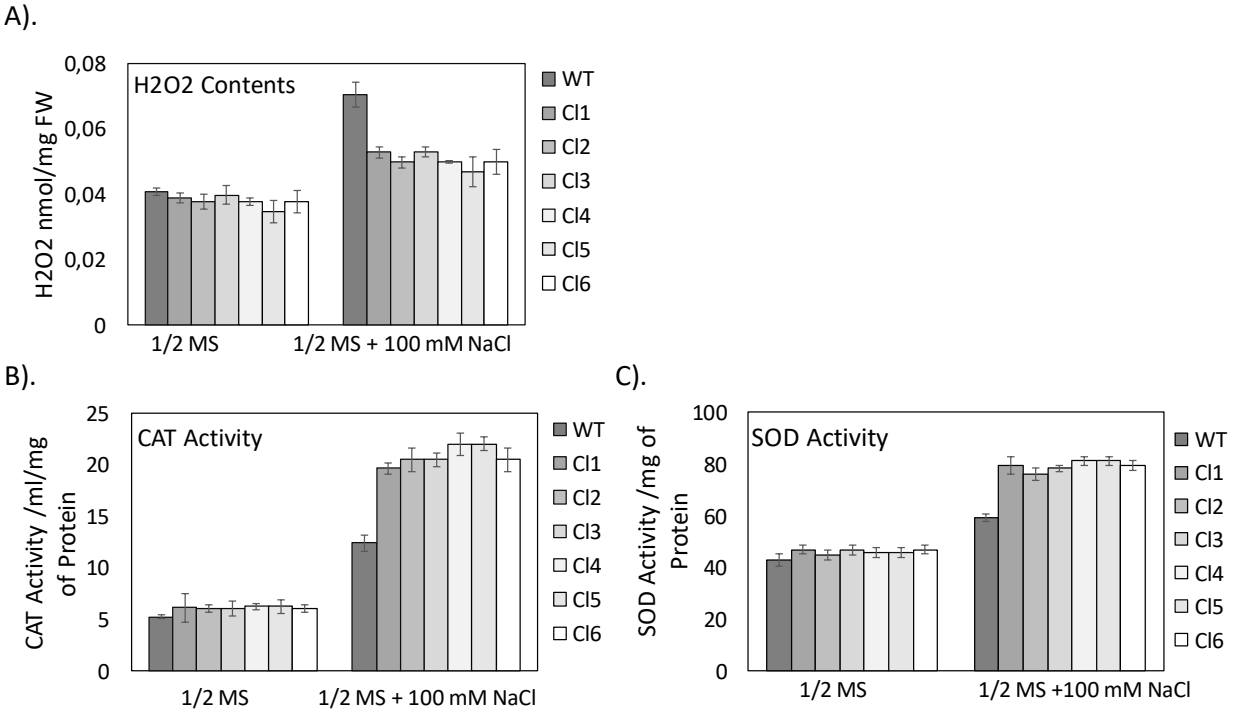


Figure 41 : Effet de la surexpression de TdRL1 chez *Arabidopsis*sur l'accumulation des ROS et sur les activités des enzymes anti-oxydantes.Mesure du contenu en **H_2O_2 (A)**, l'activité **SOD (B)** et **CAT** (C).

Les activités **SOD** et **CAT** permettent d'éliminer les espèces **$O_2^{\bullet -}$**et **H_2O_2** respectivement. Chez les plantes contrôle, on remarque une grande accumulation de **ROS** avec une plus faible activité des enzymes anti-oxydantes. Dans les lignées transgéniques, **TdRL1** semble diminuer les ROS générés par le stress salin en augmentant ces activités anti-oxydantes.

III- Essai de complémentation des mutants *pans1-1* et *rss1 :*

Le modèle *Triticum durum* est tétraploïde et son génome n'est pas encore entièrement annoté, ce qui augmente les difficultés d'analyse. De plus, la disponibilité de formes mutantes des gènes de blé est limitée. Ainsi, nous proposons de comprendre le rôle de **TdRL1** en systèmes hétérologues et via des essais de complémentation des mutants *pans1-1*

d'*Arabidopsis* et *rss1* du riz. La protéine **TdRL1** possède une faible homologie (24 %), avec la protéine **PANS1** (AT3G14190) *Arabiodopsis*, dont le mutant présente des phénotypes semblables de sensibilité au stress salin (NaCl).

1- <u>Complémentation du mutant rss1 :</u>

RSS1 joue un rôle important dans la tolérance au stress salin et le mutant *rss1* est hypersensible au stress salin (Ogawa et al., 2011). Nos études *in silico* montrent que TdRL1 est l'orthologue de RSS1. Il est ainsi intéressant de voir si TdRL1 peut complémenter la sensibilité au sel du mutant *rss1*. A cette fin, la séquence codante de TdRL1 a été clonée dans le vecteur pIJBP2 sous le contrôle du promoteur fort et constitutif spécifique au monocotylédone ZmUbi. La transformation a été réalisée par le Yutaka Tamari au sein de l'équipe de S. Takeda (Université de Nagoya, Japon).

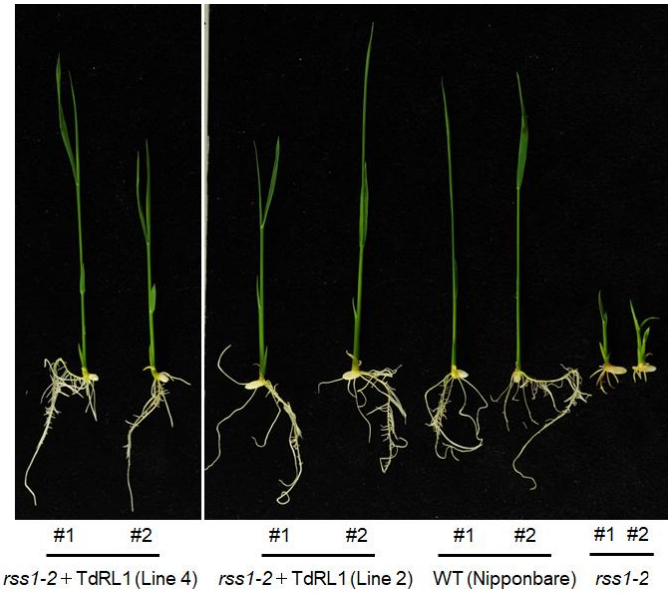


Figure 42 : TdRL1 complémente le phénotype nain de *rss1* en présence de NaCl**.** Des graines transgéniques *rss1-2* surexprimant TdRL1, le mutant *rss1-2* et WT (Nipponbare) ont germé (11 DAG) sur milieu MS en présence de 150 mM NaCl. Deux lignées indépendantes complémentées ont été utilisées (Lignées 2 et 4).

Deux lignées indépendantes T1 surexprimant TdRL1 ont été générées chez le mutant homozygote *rss1*. Des tests de sensibilité au sel ont été ensuite réalisés sur ces deux lignées, sur le mutant *rss1* ainsi que sur une lignée sauvage non transformée utilisée comme contrôles (Figure 42).

Les deux lignes exprimant TdRL1 possèdent une croissance similaire au WT en condition de stress salin. Par conséquent, TdRL1 est capable de compléter l'hypersensibilité au sel de *rss1* ce qui nous permet de suggérer que les deux protéines TdRL1et RSS1 sont deux homologues fonctionnels ayant des fonctions équivalentes dans la tolérance au stress salin.

2- Complémentation du mutant *pans1-1/cmr1-2* :

Le mutant *cmr1-2* a été identifié à la suite d'un criblage de collections de mutants EMS d'*Arabidopsis* hypersensibles au cuivre. Ce mutant présente une réduction de la croissance racinaire de 55 % (Juraniec et al. 2014) et est affecté dans le gène AT3G14190. De manière indépendante, *pans1-1* (un mutant d'insertion de T-DNA dans le gène AT3G14190), a été identifié lors d'un criblage de gènes impliqués dans la méiose (Cromer et al. 2013, Zamariola et al. 2014). Le mutant *cmr1-1* et *cmr1-2* sont alléliques car les phénotypes des deux mutants en présence de cuivre sont identiques à savoir un développement racinaire significativement ralenti (une diminution de 20 %) par rapport au WT (Juraniec et al. 2014). La complémentation fonctionnelle de *cmr1-2* avec la séquence génomique de **CMR1** a été effectuée pour confirmer que le locus AT3G14190 est responsable de la résistance au cuivre. De plus, le mutant *pans1-1/cmr1-2* montre une réduction du nombre de cellules de l'apex racinaire montrant que CMR1 est requise pour la croissance racinaire en conditions normales et en conditions de stress (Juraniec et al. 2014). La coloration des grains de pollen, montre que le mutant *pans1-1* possède une réduction de la viabilité du pollen, et l'étude de la partie femelle de la fleur montre 20 % de défauts de développement des gamétophytes (Cromer et al. 2013). La déficience gamétophytique résulte de défauts méiotiques : en métaphase II, des ségrégations aléatoires des chromatides ont été observées avec la formation de ponts. Ces observations montrent que PATRONUS est essentiel pour la cohésion centromérique pendant la méiose chez *Arabidopsis* (Cromer et al. 2013).

3- <u>Effet du sel sur le mutant pans1-1/cmr1-2 :</u>

Chez le mutant *pans1-1,* les cellules se divisent prématurément en présence de stress salin entrainant des défauts de ségrégation des chromosomes pendant la mitose, ce qui finalement affecte l'activité méristématique en ralentissant la croissance racinaire (Cromer et al. 2013 ; Juraniec et al. 2016). Ce phénotype a été confirmé par des immunomarquages effectués sur le mutant *pans1-1* en comparaison avec le sauvage en conditions normales et sous stress salin (NaCl 50 mM) (Figure 43).

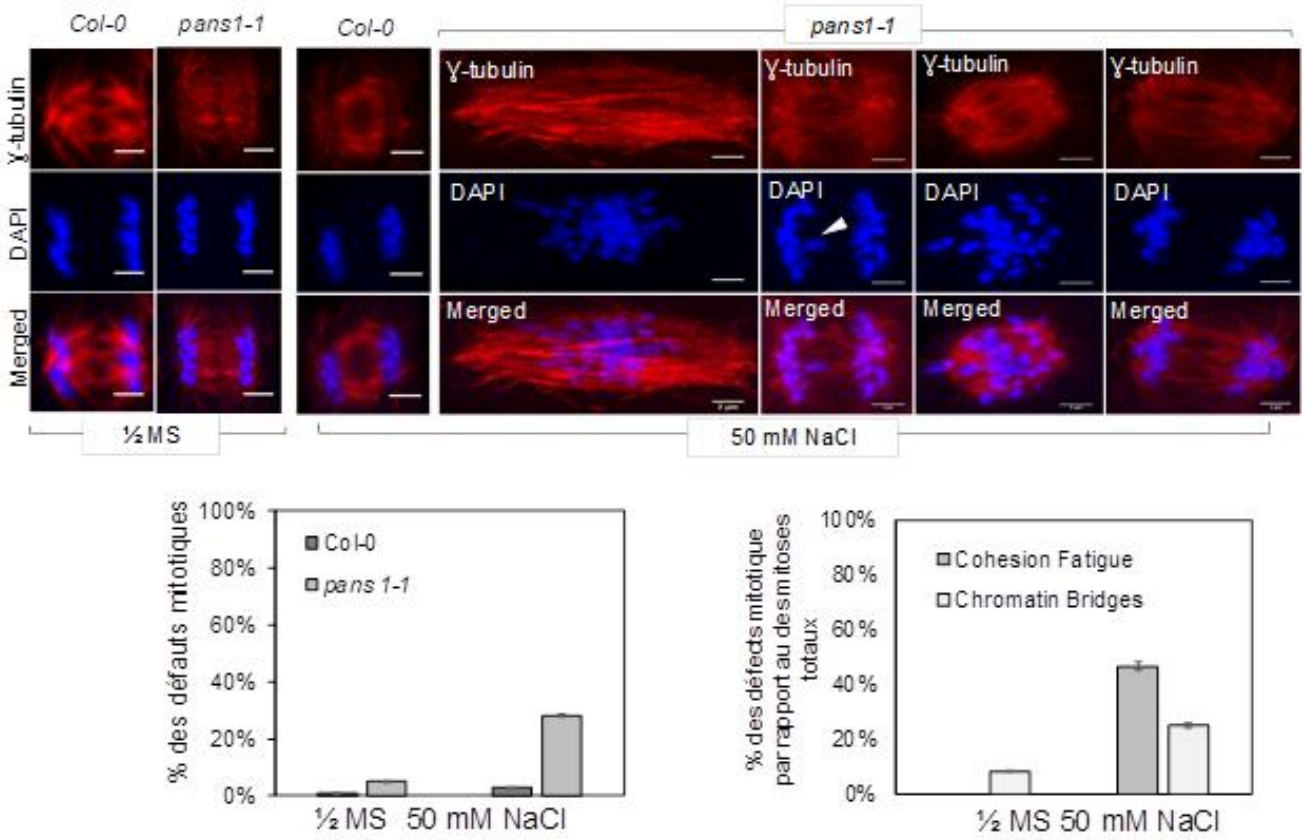


Figure 43: Immunomarquage détaillant des figures mitotiques illustrant le phénotype du mutant *pans1-1*. Les microtubules sont visualisés en rouge (anti α-tubuline) et l'ADN marqué au DAPI (bleu). Comparaison des anaphases entre le sauvage (WT) et *pans1-1* en condition contrôle et en présence de sel (NaCl 50 mM). La flèche indique la présence de défauts de séparation des chromatides sœurs avec la formation de ponts. Les graphes présentent les pourcentages des défauts mitotiques dans le mutants *pans1-1* (à gauche), et les types des défauts : défaut de cohésion de type fatigue ou défaut de ségrégation (formation des bridges) (à droite) par rapport au WT. Barres d'échelle : 5 µm.

Le mutant *pans 1-1* possède des défauts mitotiques en présence de stress salin. Un immuno-marquage avec un anticorps anti-tubuline ont permis de comparer l'organisation des microtubules en conditions normales et en présence de stress salin. En conditions contrôles, il n'y a pas de différence entre les figures mitotiques du sauvage et celles de *pans1-1*. En revanche, suite à un traitement avec 50 mM NaCl pendant une nuit, on remarque une déstabilisation des microtubules, avec une ségrégation chromosomique anormale chez le mutant *pans1.* Les défauts mitotiques incluent une organisation anormale du fuseau mitotique, formation de ponts mais aussi des défauts de cohésion centromérique. Une analyse quantitative par microscopie confocale montre que 27 % des cellules forment des ponts avec des fragments de chromosomes entre les lots de chromatides sœurs qui se séparent en présence de sel. La présence de ces défauts, nous a amené à tester si ces défauts sont causés par le stress salin ou si c'est le phénotype *pans1-1* en réalisant des immunomarquages avec des anticorps anti-gammaH2AX, permet de détecter les cassures de l'ADN double brin (figure 44).

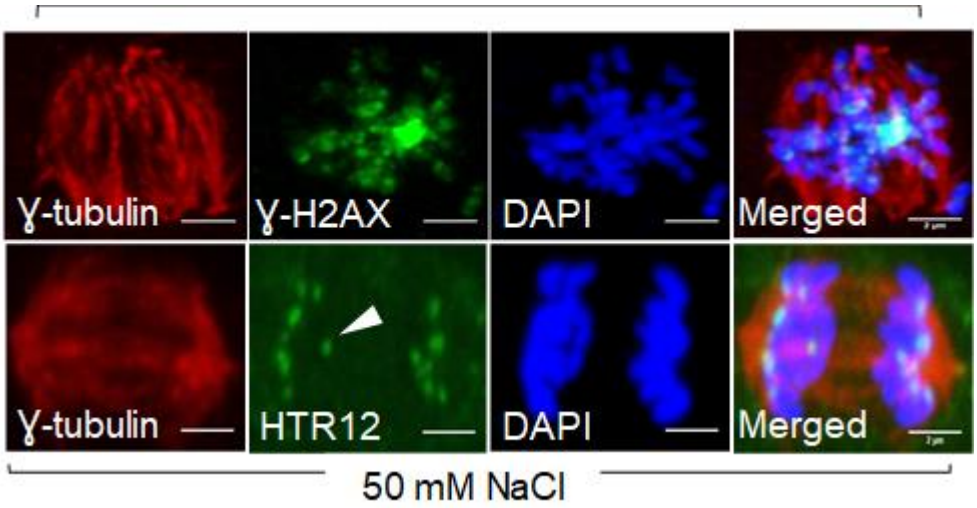


Figure 44 : Immunomarquage détaillant les figures mitotiques du mutant *pans1-1* en condition de stress salin. Les microtubules sont visualisés en rouge (anti α-tubuline), γH2AX et HTR12 sont visualisés en vert et l'ADN marqué au DAPI (bleu). Les défauts de ségrégation sont confirmés par une distribution anormale des signaux HTR12 (qui marque le centromère). L'instabilité génomique chez *pans1-1* est illustrée par des cassures de l'ADN détecté par l'anticorps anti-γH2AX. Barres d'échelle : **5 µm.**

Nos résultats montrent qu'en présence de sel, on observe davantage de signaux **γ-H2AX,** marqueur de cassure double brin (Figure 44). Par ailleurs, les défauts de ségrégation et la

cytocinèse anormale de *pans1-1* montrent bien qu'il y a une instabilité génomique. Les anomalies de ségrégation observées sont illustrées par une distribution anormale des signaux HTR-12/CENH3, variant d'histone H3 marquant les centromères. Ceci montre une instabilité génomique due aux réductions de la cohésion des chromatides sœurs pendant la mitose.

4- <u>Sur-expression de TdRL1 chez pans1-1 :</u>

Afin de tester l'homologie fonctionnelle entre **TdRL1** et **PANS1**, le gène ***TdRL1*** a été sur-exprimée en fusion GFP chez le mutant *pans1-1* d'*Arabidopsis.* Des résultats préliminaires montrent que la surexpression de **TdRL1** chez *pans1-1*, confère aux plantes une tolérance au stress salin par rapport au mutant hypersensible. Cette tolérance est observée au niveau de la germination, en présence de 100 mM NaCl mais est moindre après un stress ionique (20 mM LiCl). Cette tolérance est aussi observée dans les stades ultérieurs du développement puisque la présence de TdRL1 confère un meilleur développement de la racine déterminé par la mesure de la longueur racinaire des plantes *pans1-1* après un transfert sur un milieu ½ MS ou ½ MS + 100 mM NaCl, 5 jours après germination.

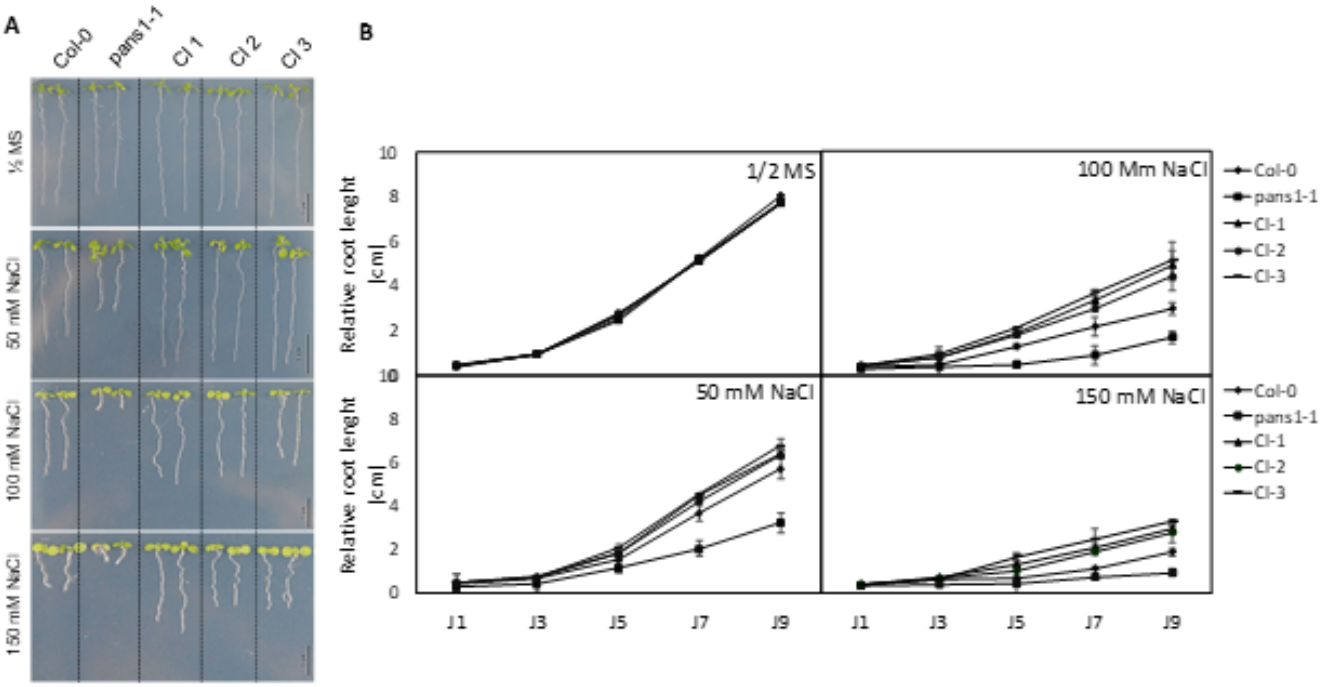


Figure 45 : TdRL1 complémente le mutant *pans1-1* en condition de stress salin. A). Photos présentant la complémentation de phénotype de *pans1-1* en condition de stress salin. Echelle = 1 cm ; B). Mesure des longueurs des racines des lignées complémentées par rapport au WT et *pans1-1*. Les plantes germent initialement sur milieu ½ MS puis sont transférées sur milieu contenant différentes concentrations de sel. Les mesures des racines sont réalisées à J1, J3, J5, J7 et J9 après transfert sur ½ MS, ½ MS+ 50, 100 ou 150 mM NaCl.

Ces résultats préliminaires suggèrent que TdRL1 est capable de complémenter la sensibilité aux sels du mutant *pans1-1* et serait ainsi l'homologue fonctionnel de **PANS1**. Toutefois ces résultats sont à confirmer puisqu'ils ont été obtenus uniquement sur une lignée homozygote pour *pans1-1* et pour **TdRL1**. D'autres lignées indépendantes sont en cours de caractérisation pour pourvoir confirmer ces résultats.

.

Discussion chapitre III

Les protéines de type RSS1 sont connues pour favoriser la tolérance aux stress chez les plantes et aussi dans la levure (Ogawa et al., 2011; Mahjoubi et al., 2015). Les tests de complémentation présentés ici, indiquent que TdRL1 peut compenser la perte de fonction de *rss1* et putativement celle de *pans1* et contribuer à la tolérance. Ces données montrent que RSS1 et TdRL1 sont de véritables homologues fonctionnels qui agissent en favorisant la croissance sous stress salin. Lorsqu'elle est exprimée de manière ectopique chez Arabidopsis, TdRL1 confère également une tolérance accrue au stress salin, en particulier aux premiers stades du développement ie. la germination des graines et les premiers stades de développement des plantules. Or, l'amélioration du pouvoir germinatif des graines en conditions de stress est une qualité recherchée en agronomie puisque le taux de germination des graines détermine la densité de plantation par zone affectant le rendement des cultures. De plus la salinité, impacte négativement la germination des graines par leur détérioration, empêche l'établissement des jeunes plantules et inhibe le développement racinaire (Bailly et al. 2004). Le développement des plantes surexprimant TdRL1 n'est pas arrêté à la suite d'un stress salin, il y a donc un maintien de l'activité méristématique. Ce résultat est confirmé par l'augmentation de la taille des méristèmes dans les racines des plantes sur-exprimant TdRL1.

Par ailleurs, la surexpression de TdRL1 a entraîné une diminution des teneurs en H_2O_2 et des dommages oxydatifs associés au stress salin, probablement en augmentant les activités enzymatiques antioxydantes (SOD et CAT). Le mécanisme par lequel les protéines RSS1 activent les activités anti-oxydantes est encore inconnu mais chez le mutant *rss1* cultivé dans des conditions standard, plusieurs enzymes antioxydantes sont réprimées suggérant une implication possible de RSS1 dans l'activation transcriptionnelle de ces enzymes (Ogawa et al. 2011). Par ailleurs, le stress salin induit une désorganisation des microtubules et l'accumulation des ROS (Livanos et al., 2014). Les protéines GIP/MZT1 (GIP1, GIP2) caractérisées chez Arabidopsis participent à la stabilisation de l'ancrage des complexes de nucléation des microtubules (Janski et al. 2012) et le mutant de perte de fonction *gip1gip2* possède une forte accumulation d'espèces d'oxygènes réactives (ROS) (communication personnelle ME Chabouté) suggèrant que ces protéines soient également impliquées dans la

réponse aux stress. Il serait ainsi intéressant d'étudier un éventuel lien entre GIP, TdRL1 et les ROS lors d'un stress salin.

Malgré le fait que l'expression de TdRL1 soit sous le contrôle du promoteur CaMV fort et constitutif, TdRL1::GFP n'a été détecté que dans un nombre limité de cellules RAM. Sa régulation post-traductionnelle par le protéasome par l'intermédiaires des motifs D et DEN peut expliquer cette localisation. En utilisant l'inhibiteur du protéasome MG132, la région exprimant TdRL1 ::GFP est étendue. Ceci indique également que la fonction TdRL1 n'est pas nécessaire dans les cellules différenciées. Il est plausible que dans ces dernières, la dégradation de TdRL1 via le protéasome est accrue. L'expression stabilisée de TdRL1 dans les cellules corticales et de l'endoderme pourrait expliquer un rôle particulier dans ces lignées cellulaires en raison de leur fonction protectrice comme les barrières mécaniques et ioniques (Sanchez-Calderon et al., 2013). RSS1 est également exprimé dans les cellules en division seulement, modérément régulé au niveau transcriptionnel et la protéine est dégradée via sa liaison à CDC20, un coactivateur du cyclosome APC/C (Ogawa et al., 2011).

Dans la cellule, la localisation de TdRL1 est modulée par le stress car en présence de NaCl la protéine tend à s'accumuler dans le noyau. La petite taille de la protéine de fusion TdRL1-GFP environ (55 kDa) lui permet d'entrer dans le noyau par diffusion passive. Cette translocation semble être stress-dépendante et permet à TdRL1 d'exercer une fonction particulière dans le noyau. La localisation nucléaire de TdRL1/RSS1 a également été observée pendant la transformation transitoire de BY2 dans les essais d'agro-infiltration de feuilles de *N.Benthamiana.* Cette localisation peut être expliquée par le fait que l'agro-infiltration constitue en soi un stress qui causerait l'entrée de TdRL1 dans le noyau.

Au cours de la mitose, TdRL1 a été détectée dans le fuseau mitotique suggérant un rôle de TdRL1 au cours du processus mitotique. Ces observations corroborent les données collectées à partir des réseaux de co-expression de TdRL1 et RSS1 (voir chapitre 1) mais suggèrent également une autre fonction spécifique possible des protéines de type RSS1 dans les cellules mitotiques qui n'a pas encore été décrite. Cette nouvelle fonction possible de TdRL1 est renforcée par les observations faites sur PANS1/CMR1 qui empêche la mauvaise ségrégation des chromosomes lors de la méiose et la mitose. L'oryzaline, inhibiteur de l'assemblage des MT, arrête la croissance des racines du mutant *pans1/cmr1* indiquant un

rôle de PANS1/CMR1 dans la régulation des réseaux MT durant la division cellulaire (Juraniec et al., 2016).

En outre, l'agrégation de TdRL1 dans les cellules en division suggère un nouveau rôle des protéines de type RSS1 au cours de la mitose. RSS1 a cependant été décrit en tant que régulateur positif de la transition G1/S avec un pic d'expression en M/G1 (Ogawa et al., 2011). Par contre, Arabidopsis PANS1/CMR1 est essentiel pour la ségrégation des chromosomes pendant la mitose et la méiose mais aucune fonction en G1/S n'a été décrite à ce jour (Cromer et al., 2013, Zamariola et al., 2014 et Juraniec et al., 2016). Cependant, la régulation de l'expression de PANS1 atteint un maximum en M et début G1 (Cromer et al 2013, cyclebase.org) comme décrit pour RSS1 (Ogawa et al., 2011). Nos résultats suggèrent que les RSS1-like sont des protéines multifonctionnelles impliquées à la fois dans la tolérance au stress et dans la régulation du cycle cellulaire.

En conclusion, nous montrons ici que TdRL1 et RSS1 sont des homologues fonctionnels qui participent tous deux à la tolérance au stress chez les végétaux. La surexpression de TdRL1 chez Arabidopsis nous a permis de faire la lumière sur de nouvelles fonctions des protéines de type RSS1 dans la régulation de la mitose, mais aussi dans le contrôle de la balance oxydant/anti-oxydant.

.

Chapitre IV

Isolement de TdGIP1 (Triticum durum GCP3 interacting Protein 1)

ISOLEMENT DE **TdGIP1** (**T**RITICUM **D**URUM **G**CP3-**I**NTERACTING **P**ROTEIN **1**)

Introduction :

Le stress abiotique induit une désorganisation des réseaux microtubulaires dans le cytoplasme (Livanos et al., 2014) et une augmentation des espèces d'oxygène réactives (ROS) affectant l'intégrité du génome en induisant des cassures d'ADN (Castells et al., 2011). Les protéines **GIP** (GIP1/GIP2) (**G**CP3 **I**nteracting **P**roteins) caractérisées chez *Arabidopsis*, participent à l'organisation du méristème, à la stabilisation de l'ancrage des complexes de nucléation des microtubules (Janski et al., 2012) et à la maintenance de l'architecture nucléaire via une signalisation passant par l'enveloppe nucléaire.

Les protéines GIPs (codées par deux gènes chez *Arabidopsis*), sont conservées chez les eucaryotes comme la levure et l'Homme (où l'homologue est appelé **MOZART**/**MZT** (**MOZART = M**itotic-Spindle**O**rganizingProtein**A**ssociated with a **R**ing of γ-**T**ubulin**1**), ou **MZT**= **M**itoticspindleorgani**Z**ingpro**T**ein 1 (Hutchins et al., 2010). Chez *Arabidopsis*, GIP1 et GIP2 se localisent au niveau des réseaux microtubulaires assemblés dans les cellules végétales, en interphase et en mitose, et au niveau de l'enveloppe nucléaire et le nucléoplasme (Janski et al., 2012). En effet, une interaction des protéines GIP avec GCP3, protéine constitutive du complexe γ-TuSC (gamma-**Tu**bulin **S**mall **C**omplex), a été démontrée en système Y2H et *in vitro* par GST pull-down (Janski et al., 2012).

Elles interviennent dans le recrutement des complexes de nucléation au niveau des différents réseaux mitotiques, le maintien de la stabilité fusoriale et la ségrégation correcte des chromosomes (Nakamura et al 2012).

Une interaction entre les GIP et une ascorbate peroxydase (APX1) (Thèse M. Batzenschlager) et l'accumulation de ROS (ME Chabouté, communication personnelle) dans les mutants *gip1gip2* suggèrent que ces protéines soient également impliquées dans la

transduction de signaux vers le noyau à la suite d'un stress. Les mutants *rss1* et *gip* montrent une réduction du nombre des cellules dans le méristème racinaire suggérant un ralentissement du cycle cellulaire. D'un point de vue moléculaire, les protéines RSS1-like et GIP s'expriment dans les cellules en division et la stabilité des RSS1-like est régulée par la voie de dégradation de l'APC/Cyclosome par la liaison au motif D-box. De plus, les mutants *rss1* et *gip1gip2* présentent une sensibilité au stress salin (résultats non publiés). L'étude fonctionnelle de la protéine TdRL1 chez *Arabidopsis*, montre que TdRL1-GFP. La ressemblance phénotypique et fonctionnelle partagée entre TdRL1/RSS1 et *gip1gip2*, nous a incité à nous intéresser à l'homologue de blé dur de GIP afin d'investiguer s'il existe un mécanisme conservé de contrôle la réponse aux stress chez les céréales impliquant les protéines GIP et RSS1-like.

I- Clonage du gène GIP de blé dur :

L'isolement de GIP de blé dur s'est basé sur les séquences de blé tendre disponibles dans les bases de données. La recherche des GIP chez les monocoylédones a été effectuée en utilisant AtGIP1 d'*Arabidopsis* comme appât. Des analyses de séquences en utilisant AtGIP1 montrent qu'une seule copie de GIP1 est présente chez les céréales (blé et Orge Figure 47).

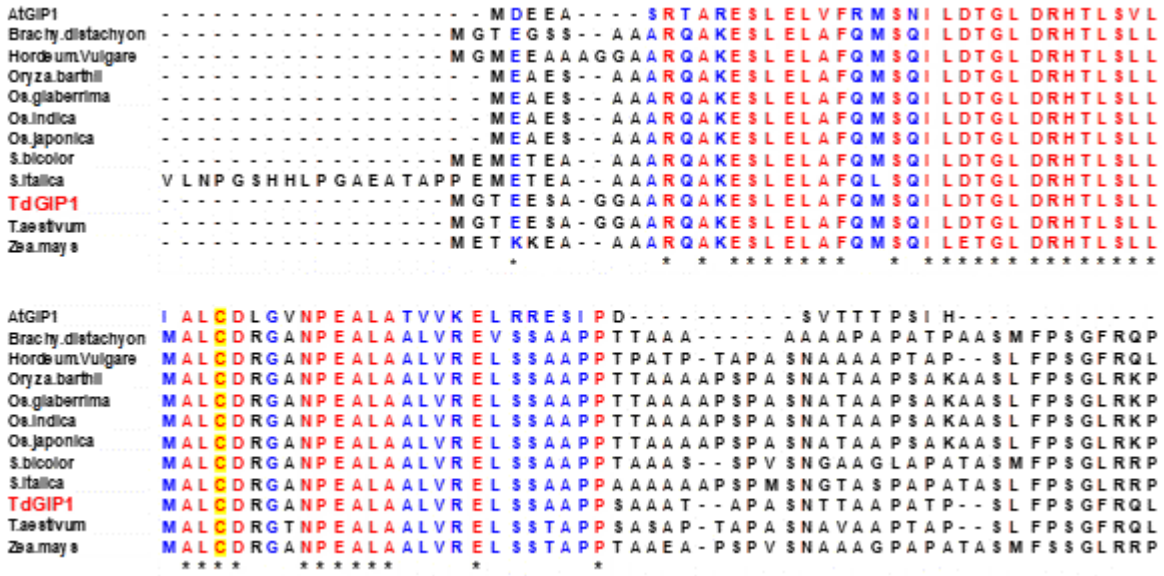


Figure 46 : Alignement des séquences des protéines de la famille GIP1 identifiées chez les monocotylédones. Les séquences protéiques sont téléchargées à partir de UniProt (http://www.uniprot.org/) et alignées avec **MEGA6**. Les acides aminés conservées sont colorés en rouge et présentent le domaine GIP/MZT.

Ces données nous ont permis d'isoler l'homologue de GIP1 chez le blé dur nommé *TdGIP1* (*Triticum durum GCP3-interacting Protein 1*), à partir de la variété tunisienne « Oum Rabiaa ».

La comparaison des séquences protéiques lors d'alignements multiples a révélé que la protéine de blé dur possède une forte homologie avec celle de blé tendre *Triticum aestivum* (98 %) où trois copies du gène TdGIP1 ont été identifié (5AL:35576-35755 ; 5BL:41789-41968 ; 5DL:70142-70321). Une homologie de 74.5 % existe entre TdGIP1 et GIP1 et GIP2 d'*Arabidopsis* . De manière intéressante, l'homologie est surtout observée au niveau de la conservation de l'unique cystéine (Figure 46), dont le rôle est en cours d'étude dans l'équipe Chabouté-Schmit. La forte homologie partagée par les protéines GIP chez les différentes espèces végétales suggère une éventuelle conservation de leur fonction.

Proteins	Identity with TdGIP1
AtGIP1	74.5
AtGIP2	74.5
Brachypodium distachyon	91.1
Hordeum vulgare	96.5
Oryza barthii	92.9
Oryza glaberrima	92.9
Oryza sativa Indica	92.9
Oryza sativa Japonica	92.9
Setaria italica	91.1
Sorghum bicolor	92.9
Triticum aestivum	98.3
Zea mays	91.1

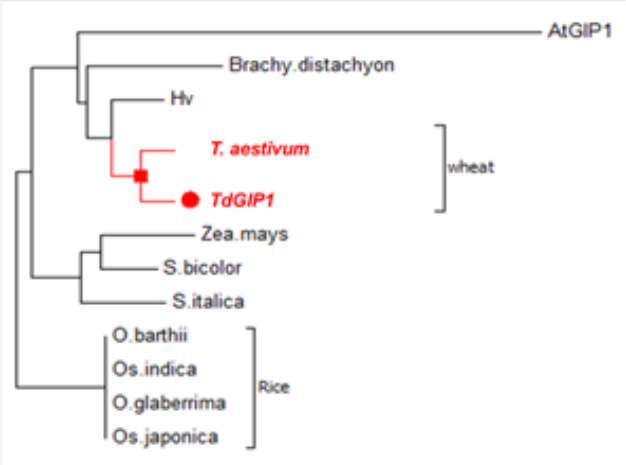


Figure 47 : Analyse phylogénétique des GIP d'*Arabidopsis* et de monocotylédones. (A) Pourcentages d'identité entre les protéines GIP etTdGIP1 (B) Arbre phylogénétique représentant les membres de la famille des GIPs identifiées par homologie de séquence (arbre réalisé avec le logiciel MEGA6).

Afin de comparer la localisation de TdGIP1 avec celle d'AtGIP1, l'expression transitoire de *TdGIP1::GFP* a d'abord été réalisée dans les feuilles de *Nicotiana Benthamiana* après clonage de TdGIP1 dans un vecteur binaire en fusion C-terminale avec la GFP. La figure 48 montre que TdRL1::GFP est localisée dans toute la cellule y compris dans le noyau avec la présence des filaments cytoplasmiques suivant les réseaux microtubulaires. Quelques localisations

ponctuées sont observées dans le cytoplasme (voir cercle). Ces résultats rappellent les observations décrits par Natacha Janski pour AtGIP1 (thèse de doctorat, Unistra 2007).

La protéine MAP65 est impliquée dans la formation de faisceaux de stabilisation des MT et souvent utilisée comme marqueur des MT. Des études de co-expression de TdGIP1 avec MAP65-RFP ont été réalisées dans des feuilles de *N. Benthamiana*.

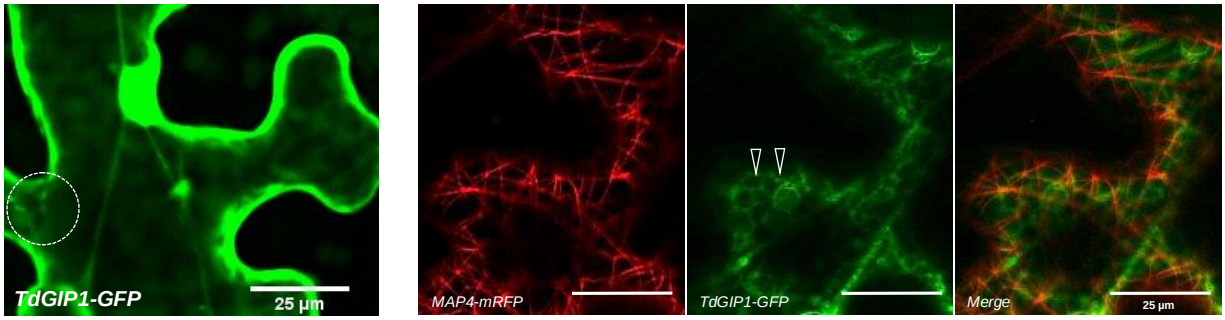


Figure 48 : Analyse par microscopie confocale de la localisation cellulaire de la protéine TdGIP1::GFP montrant que celle-ci est ubiquitaire, peu de colocalisation de TdGIP1 et MAP4 à l'intersection des microtubules corticaux marqués par MAP4-RFP, voir flèches (rouge). Barre d'échelle = 25 µm.

La figure 48 montre qu'il y a peu de colocalisation entre TdGIP1 ::GFP et MAP4-RFP contrairement à AtGIP1 qui est présent au niveau des intersections des microtubules corticaux, aux sites de nucléation des MT mais lorsque l'expression de la fusion GFP est sous le contrôle du promoteur endogène (Nakamura et al 2010 ; Pitzalis Nicolas, M2, Unistra 2015).

Pour montrer la fonctionnalité de TdGIP1 chez les plantes, la transformation stable d'*Arabidopsis* via *Agrobacterium tumefaciens* a été réalisée. TdGIP1 ::GFP a été observée au niveau des racines des jeunes plantules avec une localisation homogène tout au long de la racine qui ressemble fortement aux localisations d'AtGIPs en interphase et pendant la mitose (Janski et al 2012). A l'interphase TdGIP ::GFP est périnucléaire et au cours de la mitose, les protéines TdGIP1 se localise au niveau des réseaux MT mitotique (Figure 49).

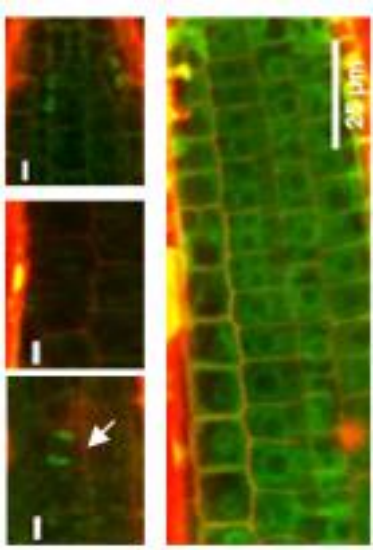


Figure 49 : Localisation cellulaire de TdGIP1::GFP dans les racines d'*Arabidopsis*. TdGIP1 ::GFP est périnucléaire en interphase (panneau droit). TdGIP1-GFP est localisé au niveau des MT en mitose et sur la photo, essentiellement aux MT Kinétochoriens en anaphase (flèche blanche). Les parois cellulaires sont marquées à l'iodure de propidium. Barres d'échelles = 25 µm.

Les protéines GIPs appartiennent aux complexes de nucléation des MT et interagissent avec GCP3 notamment via sa partie N-terminale (200 aa) (Janski et al., 2012). L'homologie de séquences et la conservation de la co-localisation aves les réseaux microtubulaires, nous amène à tester l'interaction TdGIP1-GCP3. Des essais de double hybride montrent que comme dans le cas d'AtGIP1 et MZT1, la protéine TdGIP1 interagit avec AtGCP3 (Figure 50).

Les résultats confirment la conservation des fonctions de GIPs chez les monocotylédones et permettent de dire que TdGIP1 interviendrait dans le recrutement des complexes de nucléation. Le lien de TdGIP1 avec le stress abiotique chez le blé n'a jamais été décrit. Les résultats obtenus ouvrent des perspectives très intéressantes sur la caractérisation de TdGIP1 et son rôle dans le contrôle du cycle cellulaire en conditions de stress.

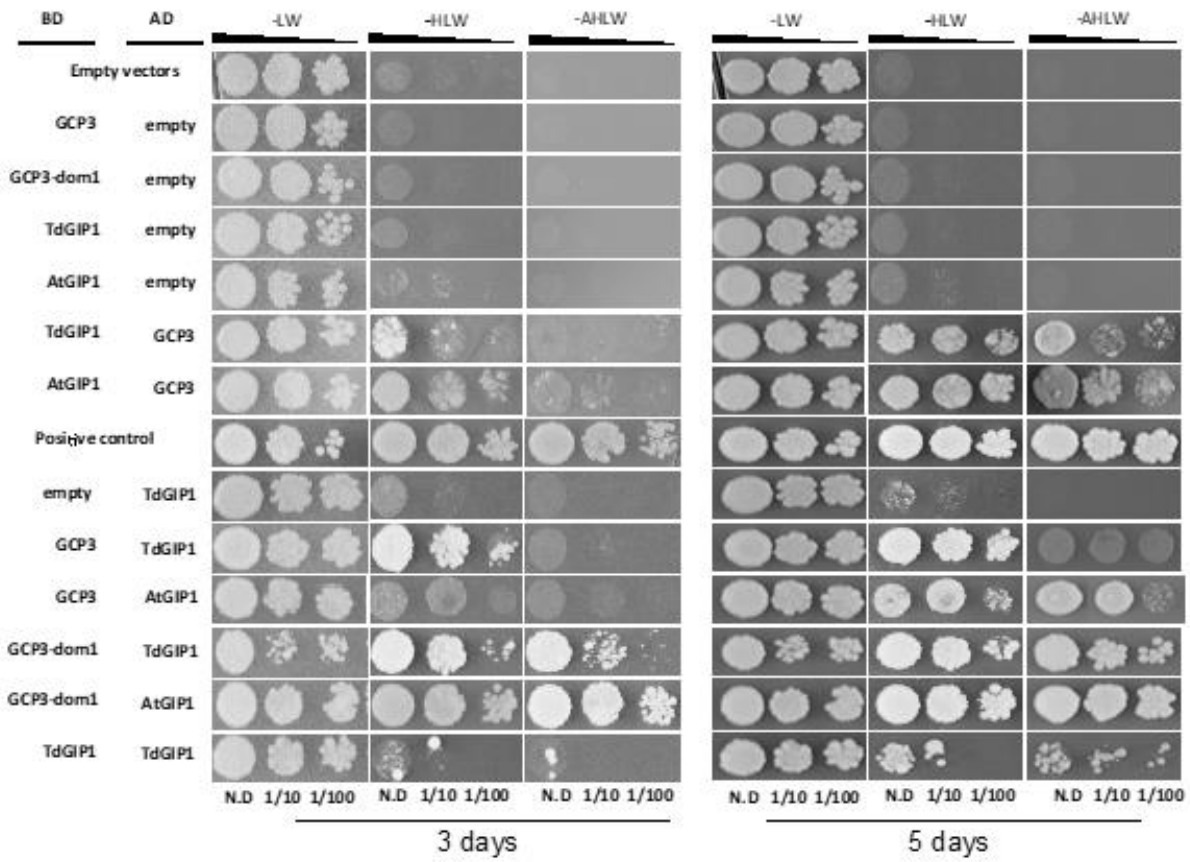


Figure 50 : TdGIP1 est un partenaire de GCP3.Les levures AH109 transformées avec les différents vecteurs ont été déposées en gouttes sur des milieux contrôle ou sélectifs. Les résultats de croissance sont présentés après 3 jours (gauche) et 5 jours (droite) d'incubation à 30°C. Seul le domaine C-terminal est essentiel pour l'interaction TdGIP1 et GCP en Y2H. Le contrôle positif est l'interaction pGW-RepA/pGAD-Rb1 où RepA est la protéine de réplication du géminivirus « wheatdwarf» et Rb1 : protéine RBR de Maïs.

Discussion chapitre VI

Dans la cellule végétale, la communication entre les différents compartiments est liée au cytosquelette qui permet notamment le trafic de macromolécules et intervient dans le maintien de la forme générale de la cellule, le positionnement des organites (Guharoy et al., 2013), et la ségrégation chromosomique pendant la mitose et la méiose (Chang & Goldman, R. D, 2004). Ces différentes fonctions pourraient être liées aux protéines GIPs identifiées chez *Arabidopsis* (Janski et al., 2008). L'analyse des séquences protéiques de TdGIP1 montre bien la conservation de GIPs chez les monocotylédones et en particulier chez le blé.

Au niveau cellulaire, TdGIP1 comme les GIP d'Arabidopsis est localisée au niveau de l'enveloppe nucléaire et dans le cytoplasme mais aussi en association avec les réseaux microtubulaires en interphase (notamment à l'enveloppe nucléaire, site de nucléation des MT) et en mitose (Janski et al 2012 ; Batzenschlager et al 2013). Il reste à démontrer si chez les monocotylédones TdGIP1 contrôle la cohésion centromérique comme cela a été montré chez Arabidopsis (Batzenschlager et al., 2015). Les microtubules (**MT**) sont très dynamiques et interviennent dans différentes activités cellulaires, incluant la transduction des signaux et la réponse au stress salin (Wang et al. 2011). Le stress salin induit la dépolymérisation, la désorganisation et la réorientation des MT (Wang et al 2011 ; Blancaflor et al. 1997). En condition de stress salin, les MT subissent une dépolymérisation suivie d'une polymérisation, une modification de l'orientation (chez *Zea mays),* ou une désorganisation des MT corticaux chez *Arabidopsis*. Vue l'interaction des GIP avec les réseaux microtubulaires et la sensibilité aux stress abiotiques des mutants *gip*, il a été proposé que les GIP régulent l'organisation des MT et participent à la régulation de la signalisation nucléo-cyoplasmique en réponse aux stress.

Le clonage et la caractérisation de TdGIP1 présentent un vrai potentiel pour l'étude de l'organisation du cytosquelette microtubulaire chez une plante d'intérêt agronomique comme le blé mais aussi pour son rôle éventuel dans la signalisation nucléo-cytoplasmique et la progression du cycle cellulaire lors de contraintes environnementales. Afin de compléter ces analyses, la transformation des mutants de perte-de-fonction *gip1gip2* d'*Arabidopsis* par TdGIP1 a été faite pour investiguer ultérieurement une éventuelle

homologie fonctionnelle et suivre notamment la dynamique de formation des réseaux microtubulaires.

Discussion générale

DISCUSSION GENERALE

La protéine RSS1 a été décrite comme une protéine spécifique des monocotylédones jouant un rôle clé dans la tolérance au stress chez le riz par le maintien de la prolifération cellulaire en conditions de stress salin (Ogawa et al., 2011). Notre étude a montré que la protéine TdRL1 issue du blé est homologue à RSS1 et améliore la tolérance au stress salin chez la levure (Mahjoubi et al. 2015) et chez Arabidopsis. En effet, nous montrons que la protéine de blé complémente la perte de fonction du mutant *rss1* hypersensible au sel et que TdRL1 contribue à améliorer la tolérance au stress salin chez *Arabidopsis.* En effet, cette tolérance est visible lors des premiers stades de développement de la plante au niveau de la germination des graines et l'établissement des jeunes plantules. De plus, TdRL1 intervient positivement lors d'un stress salin, dans la régulation de la balance oxydant/anti-oxydant. Enfin, le fait que TdRL1 semble complémenter le mutant *pans1*/*cmr1* d'Arabidopsis montre que les protéines RSS1-like interviennent aussi chez les dicotylédones dans la tolérance au stress salin.

La perte de fonction de la protéine RSS1 provoque un arrêt de la division cellulaire en G1/S. Ainsi, RSS1 serait un régulateur positif du cycle cellulaire en conditions de stress abiotique à travers son interaction la protéine phosphatase de type 1, OsPP1. Les PP1 permettent la déphosphorylation de divers substrats et en particulier de la protéine RBR pendant la mitose et la phase G1 du cycle (Durfee et al., 1993). La phosphorylation de RBR permet la libération des facteurs de transcription de type E2F, et donc l'enchainement de cycle cellulaire et l'entrée en phase S. Ogawa et al. (2011) a donc proposé que RSS1 maintienne l'activité méristématique en condition de stress salin en inhibant PP1. RBR est alors hyperphosphorylé activant le passage à la phase S et donc la division. La fonction de RSS1 est donc de promouvoir la transition G1/S en condition de stress pour maintenir l'activité méristématique. La surexpression de TdRL1 améliore la tolérance aux stress, et entraine une légère augmentation de la taille des méristèmes indiquant ainsi une fonction

similaire à RSS1. La surexpression de TdRL1 chez *Arabidopsis* montre que TdRL1 est exclue du noyau dans les cellules interphasiques, mais est capable de s'accumuler partiellement dans le noyau lorsque la plante est exposée à un stress salin. Cette translocation est en concordance avec le rôle proposé de RSS1 reliant la perception du stress aux mécanismes de réponses au stress (Ogawa et al., 2011; Ebel et Hanin, 2016).

Toutefois, le fait que TdRL1 soit trouvé en association avec le fuseau mitotique indique un rôle nouveau, au-delà de celui de réguler la transition G1/S, dans la régulation de la division mitotique et la progression de la division. Ces résultats corroborent les données collectées à partir des études *in silico* et ceci est renforcé par le fait que PANS1/CMR1 d'*Arabidopsis* a été décrite comme une protéine essentielle à la transition G2/M par la protection de cohésion centromérique et la bonne ségrégation des chromosomes pendant la mitose et la méiose (Juraniec et al., 2016). Bien qu'aucune implication de PANS1 dans la transition G1/S n'a été décrite à ce jour (Cromer et al., 2013; Zamariola et al. 2014; Juraniec et al. 2016), la possible complémentation de *pans1*/*cmr1* par TdRL1 suggère la multifonctionnalité des protéines de type RSS1-like.

Les protéines GIPs d'Arabidopsis participent à la nucléation des MT, sont fortement associés au fuseau mitotique, interviennent dans la ségrégation des chromatides pendant la mitose et joue un rôle dans la signalisation nucléo-cytoplasmique suite à un stress. Il est intéressant ici d'essayer de relier la fonction de TdRL1 avec celles des GIPs d'autant plus que les phénotypes des mutants *pans1* et *gip1gip2* montrent des défauts de développement de la pointe racinaire, un lien avec les ROS et les stress abiotiques.

La conservation des sites de phosphorylation pour l'Aurora1-2 kinase dans les séquences protéiques de RSS1, PANS1 et TdRL1 suggère le rôle important de ces protéines dans la mitose. L'Aurora Kinase est en effet, essentielle pour la régulation du cycle cellulaire en G2/M par le contrôle de l'assemblage des fuseaux mitotiques, la cohésion centromérique et l'entrée en mitose. RSS1 interagit avec PP1 et la rendrait inactive pendant la transition G1/S. Or, PP1 peut également déphosphoryler l'Aurora kinase (Weimer et al. 2015). La protéine TPX2, protéine essentielle à l'assemblage du fuseau pendant la mitose, permet de localiser Aurora kinase aux microtubules. Aurora est activée par la liaison avec TPX2, et TPX2 est phosphorylée par Aurora (Vos et al. 2008). La localisation de la protéine TdRL1 au niveau des

microtubules suggère la présence d'une éventuelle relation avec Aurora kinase dans le contrôle de la division cellulaire pendant la mitose.

D'autre part, nous avons constaté que chez lignées transgéniques d'Arabidopsis, TdRL1-GFP n'est détectée que dans un nombre limité de cellules du méristème racinaire malgré son expression contrôlée par un promoteur fort et constitutif. L'expression de TdRL1 dans les cellules corticales et endodermiques pourrait suggérer un rôle spécifique de TdRL1 dans ces cellules en raison de leur fonction protectrice (Sánchez-Calderón et al., 2013). Cette localisation restreinte est due à une régulation post-traductionnelle par l'APC/C via la présence de la D-Box de TdRL1 puisqu'en présence de MG132, l'inhibiteur du protéasome, l'expression de TdRL1-GFP est étendue dans d'autres cellules méristématiques de la racine. *RSS1* est également exprimé dans les cellules cyclantes et modérément régulé au niveau transcriptionnel. La protéine est dégradée via sa liaison au CDC20, un coactivateur de l'APC cyclosome en G2/M (Ogawa et al., 2011). L'expression de PANS1/CMR1 est limitée aux cellules méristématiques (Juraniec et al. 2016) et PANS1/CMR interagit avec CDC20 et HBT (Cromer et al. 2013). Cependant, l'interaction avec CDC20 permettrait à PANS1/CMR1 d'inhiber l'APC/C pendant la mitose et la méiose et non pas sa dégradation (Juraniec et al. 2016, Singh et al. 2015). La très forte conservation des D et DEN-Box entre les trois protéines montrent que ce motif est essentiel au fonctionnement de la protéine. Il serait ainsi intéressant d'étudier l'effet de la sur-expression d'une version tronquée de TdRL1 dépourvue de D-Box dans le mutant *pans1*/*cmr1* ou dans le sauvage.

De manière intéressante, la surexpression de TdRL1 a entraîné une diminution des teneurs en H_2O_2 avec une augmentation des activités des enzymes anti-oxydants (SOD et CAT). Le mécanisme par lequel les protéines RSS1-like modifient les activités antioxydantes est encore inconnu mais dans le mutant *rss1* cultivé dans des conditions standard, plusieurs enzymes anti-oxydantes sont réprimées suggérant une implication possible de RSS1 dans l'activation transcriptionnelle de ces enzymes (Ogawa et al. 2011). Par ailleurs, la sur-expression de OsPP1a, impliquée dans la voie de signalisation de RSS1, entraine une diminution des ROS par l'augmentation d'activité des enzymes APX et SOD en conditions de stress (Liao et al., 2016). Ces observations laissent à penser que les RSS1-like participent à la tolérance au stress via une diminution du stress oxydant.

Enfin, même si RSS1 et TdRL1 sont très conservées, PANS1/CMR1 est plus divergente. Pourtant les trois protéines appartiennent aux IDP/IUP, qui sont connues comme souvent impliquées dans la signalisation du stress et le contrôle du cycle cellulaire (Pazos et al., 2013; Pietrosemoli et al. 2013). Ces protéines n'ont pas de particularité structurales quand elles sont libres mais se replient en fonction de leurs ligands (Tompa 2005). Elles peuvent donc s'engager dans plusieurs interactions de manière simultanée ou séquentielle. Ainsi elles sont souvent au centre de réseaux d'interaction et peuvent avoir de multiples capacités de liaison grace à leur flexibilité structurelle. Les différentes fonctions décrites et *a priori* divergentes de RSS1, TdRL1 et PANS1/CMR1, associé à la conservation du désordre indiquent que ces protéines sont des homologues fonctionnels pléiotropes. Cet exemple illustre bien comment certaines fonctions critiques sont maintenues entre organismes éloignés malgré la faible conservation des séquences protéiques. La conservation de la flexibilité structurelle reliée à la conservation de la fonction modère le paradigme classique reliant la séquence primaire à la fonction.

En conclusion, les données présentées ici suggèrent que les RSS1-like sont des protéines multifonctionnelles impliquées dans la tolérance au stress à la fois pendant l'interphase et la mitose.

Conclusion Générale

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Mon travail de thèse porte sur l'étude des protéines de la famille RSS1-like en particulier TdRL1 de blé, et son rôle dans les mécanismes de tolérance au stress salin chez les plantes.

Du point de vue fonctionnel TdRL1 améliore la croissance de levure en condition de stress ionique et salin. Nos résultats montrent aussi que la protéine TdRL1 est impliquée dans la tolérance au stress salin chez *Arabidopsis* en améliorant la germination des graines et par l'intermédiaire des activités des enzymes CAT et SOD, en détoxifiant les ROS. Pour comprendre comment TdRL1 régule les activités anti-oxydantes, nous pensons à utiliser des sondes qui permettent de suivre la génération et l'accumulation des ROS au cours du temps selon le compartiment cellulaire. Pour cela nous utiliserons les racines des lignées d'Arabidopsis sur-exprimant la fusion TdRL1 ::GFP. Ceci nous permettra de suivre directement l'accumulation de ROS et la comparer avec l'expression et la localisation subcellulaire de la protéine de fusion.

Chez *Arabidopsis*, la localisation de TdRL1 est périnucléaire dans les cellules méristématiques et TdRL1 est capable de se relocaliser dans le noyau lors d'un stress. TdRL1 est aussi associée aux microtubules en mitose. Ces résultats montrent que TdRL1 est capable d'agir aussi bien en interphase que durant la mitose pour contrôler différents stades du cycle cellulaire lorsque la plante est soumise à un stress. D'une part ces résultats indiquent un rôle des protéines RSS1-like dans la dynamique des microtubules pendant la mitose et peut-être la ségrégation des chromosomes vue la possible complémentation du mutant *pans1-1*. D'autre part, TdRL1 est capable d'assurer une fonction dans le noyau des cellules interphasiques soumises à un stress montrant que TdRL1 est pluripotente. Il semblerait également que TdRL1 joue un rôle de médiateur entre le cytoplasme et le noyau lorsque la cellule est stressée. Des études complémentaires sont nécessaires pour comprendre et dissocier ces deux fonctions. Nous nous proposons ainsi d'identifier les partenaires

potentiels en utilisant des approches protéomiques (IP-MS/MS) sur des lignées TdRL1 ::GFP dans le background *pans1-1*.

Le rôle de TdRL1 dans les mécanismes de tolérance des céréales à la sécheresse et à la salinité a pu être montré grâce à la complémentation du mutant *rss1* de riz. Ceci confirme que TdRL1 est l'homologue fonctionnel de RSS1. Nos résultats préliminaires sur l'expression de TdRL1 dans le mutant *pans1-1* d'Arabidopsis montrent que TdRL1 peut complémenter également la déficience de PANS1. Nos efforts vont se poursuivre afin de montrer que TdRL1 complémente l'hypersensibilité aux sels du mutant *pans1-1* mais aussi voir si les défauts de ségrégation chromosomique sont abolis. Les fonctions communes ou spécifiques des 3 homologues RSS1/TdRL1/PANS1 permettront de mieux comprendre comment se fait la régulation du cycle cellulaire en condition de stress. La conservation des motifs D et DEN-Box dans les séquences protéiques de TdRL1/PANS1/RSS1 est un atout mais leur rôle dans la régulation post-traductionnelle des RSS1-like ou dans le contrôle de l'activité de l'APC/C reste à déterminer. Nous envisageons de générer des formes tronquées de TdRL1 dépourvues de D-Box (ΔD-Box), afin de mettre en évidence le rôle de ce motif dans la stabilité de TdRL1, la régulation de l'activité de l'APC/C et la réponse au stress salin.

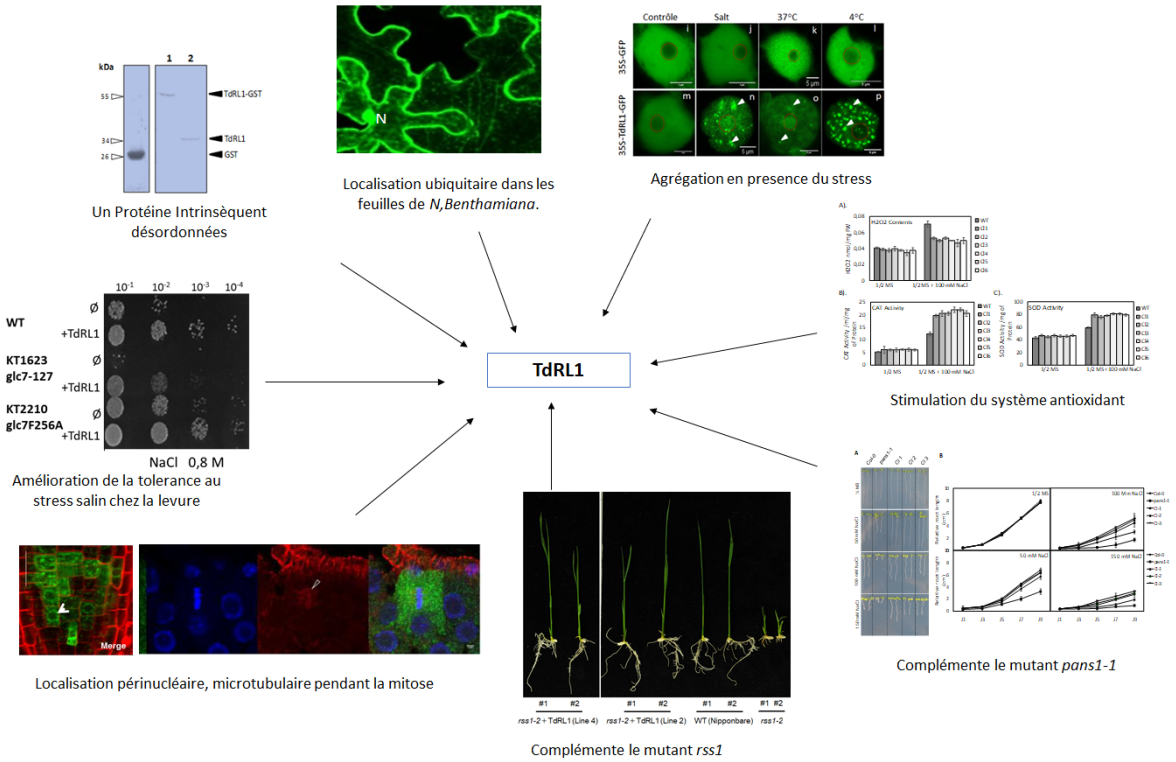


Figure 51 : Les résultats obtenus pendant la thèse montrent la multifonctionnalité de la protéine TdRL1. IDP isolée à partir de blé dur, TdRL1 est localisée dans les cellules méristématiques, participe à l'amélioration de la tolérance au stress salin chez la levure et chez *Arabidopsis* et complémente les mutants *pans1-1* et *rss1*.

L'isolement de TdGIP1, est un vrai potentiel pour comprendre la signalisation nucléo-cytoplasmique en réponse au stress. Nous nous envisageons de compléter l'étude avec des expériences de co-IP entre TdRL1 et GIP de sur-expression de TdRL1 dans les mutants *gip1gip2* d'*Arabidopsis.* Ces expériences nous permettront d'étudier le rôle de TdGIP1 et TdRL1 et leur possible inter-relation dans la progression du cycle cellulaire lors de contraintes environnementales.

Matériels & Méthodes

A- **Matériels :**

I- Matériel végétal :

Lors de ce travail la variété de blé dur **Oum Rabiaa 3** a été utilisée. Les graines ont été fournies par le Laboratoire de Physiologie Végétale de l'**I**nstitut **N**ational de **R**echerche **A**gronomique de **T**unis (**INRAT**).

Graines *d'Arabidopsis thaliana:* Des plantes sauvage d'écotype Columbia (**Col-0**), Col-0 x WS et le mutant d'ADN-T du gène *PANS1* (**AT3G14190)** de collection *SALK* (salk_035661) ont été fournies par Dr. Laurence Cromer (**INRA Versailles-France**).

- Des plantes de tabac *Nicotiana benthamiana (IBMP)* utilisées pour des expériences d'expression transitoire sur des plantes de 6 semaines.

- Cellules de tabac *Nicotiana tabacum cv. **B**right **Y**ellow-**2*** (**BY2**): Les cellules ***BY-2*** (Nagata et al., 1992) sont cultivées à l'obscurité à 25°C sous agitation (175 rpm) et repiquées tous les 7 jours à raison de 2 ml dans 80 ml de milieu frais.

II- Souches microbiennes et milieux de culture :

1- <u>Souches bactériennes :</u>

- **Top10:** F-*mcr*A Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 deoRn nupG recA1 araD139Δ(ara-leu) 7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 λ.*
- **DH5α***: F– Φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK–, mK+) phoA supE44 λ– thi-1 gyrA96 relA1*

Les deux souches sont utilisées pour les clonages et l'amplification de l'ADN et portent des mutations dans les gènes codant la recombinase (*recA*) et l'endonucléase (endA1), permettant la préservation de l'ADN plasmidique.

- **GV3101**: Utilisée pour les agroinfiltrations et les transformations d'*Arabidopsis* par « floral dip ». Résistante à la rifampicine (résistance chromosomique), elle porte le plasmide Ti désarmé pMP90 (résistance gentamycine) portant les gènes *Vir* nécessaires au transfert de l'ADN-T dans le génome végétal.

– Souche **LBA4404** d'*Agrobacterium tumefaciens* (Hoekema *et al.*, 1983), sélectionnée sur rifampicine (résistance chromosomique), possède un plasmide Ti désarmé (pAL4404) (résistance à la streptomycine). Cette souche est utilisée pour les agro-transformations.

– **BL21 DE3** *: F^- ompT hsdS$_B$($R_B^-m_B^-$) gal dcm* λ (DE3)[*lacI lacUV5-T7 gene1 ind1sam1 nin1*]) *pLysSRARE (Cam^R)*, dérivée d'*Escherchia coli.*

La souche **BL21 DE3** est utilisée pour l'expression hétérologue d'un gène d'intérêt sous le contrôle d'un promoteur inductible par l'isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (**IPTG**).

2- Souches de levure :

Durant ce travail six souches ont été utilisées dont les génotypes sont indiqués dans le tableau suivant :

Tableau 5 : Liste des souches de levure utilisé

Souches	Génotype
KT 1112 (WT)	*MAT a his3 leu2 ura3-52*
KT 1935 *(glc7-109)*	*MAT a his3 leu2 trp1 ura3-52 glc7-109 K259A, R260A*
KT 1623 *(glc7-127)*	*MAT a his3 leu2 trp1 ura3-52 glc7-127 K110A, K112A*
KT 2210 *(glc7- F256A)*	*MAT a his3 leu2 trp1 ura3-52 glc7-F256A*
AH109	*MATα, ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-90,* *leu2-3, 112, gal4Δ, met–, gal80Δ, URA3 : : GAL1UAS-GAL1TATA-lacZ*

3- Plasmides :

- Vecteurs de clonage: ce sont des vecteurs de petite taille qui sont utilisés pour le clonage et l'amplification des séquences d'ADN.

- Vecteurs d'expression bactérien: ce sont des vecteurs permettant d'exprimer des protéines en fusion avec des étiquettes (GST, HA, MBP, His) afin de facilite leur détection et purification.

-Vecteurs binaires

Tableau 6 : Liste des principaux vecteurs utilisés. R = résistance. Amp = Ampicilline. Genta : Gentamycine. Hygro = Hygromycine. Kan : Kanamycine. Leu : Leucine. Spec = Spectinomycine. Trp : Tryptophane.

Plasmide	Caractéristiques	Utilisation	Référence
PGEMTeasy	Amp^R	Clonage	Promega
pCAMBIA 1302	Kan^R, Hyg^R	Expression, plante	Marker gene Technology
pCR®2.1-TOPO	Amp^R, Kan^R	Clonage	Thermofisher
pYES 2	Amp^R	Expression, levure	Thermofisher
pET -28a(+)	Amp^R	Expression bactéries	Novagen
PGEX4T.1	Amp	Expression bactéries	GE Healthcare
pHMGW2	Amp	Expression bactéries	Busso et al., 2005
pGADT7	Amp^R, LEU2	Expression levure	Clontech
pGBKT7	Kan^R, TRP1	Expression levure	Clontech
pDONR207	$Spect^R$	Clonage	Invitrogen (life Technology)
pK7FWG2	$Spect^R$, Kan^R	Expression plante	Karimi et al., 2002
pB7FWG2	$Spect^R$, $BASTA^R$	Expression plante	Karimi et al., 2002

4- Milieux de culture & antibiotiques :

a- Milieux:

- Milieu de culture des plantes :

  * Milieu **M**urashige et **S**koog (**MS**) : Pour la culture des plantes (Duchefa biochemie M0255 ;Sigma Life Science): 2,2 g/l ; MES 0,5 g/l ; saccharose : 10 g/l ; pH= 5,8. Pour le milieu solide on ajoute de l'agar (0,8 % pour la culture horizontale et 1,2 % pour la culture verticale; Sigma life science) .

- Milieux de culture bactérienne :

*Milieu **L**ysogeny **B**roth (**LB**): Pour les cultures bactériennes, il est composé de : Bacto-tryptone : 10 g/l ; extrait de levure : 5 g/l ; NaCl : 0,5 g/l. Pour le milieu solide, on ajoute 1,5 g/l d'agar (Sigma life science).

*Milieu **Y**east extra-**P**eptone-**D**extrose (**YPD**): Milieu de culture complet des levures (Takara, Clontech)

*Milieu Minimal **S**ynthetic **D**efined (**SD**): Milieu de culture des levures (Takara, Clontech): milieu minimal nécessitant l'addition de différents mélanges d'acide aminés pour la sélection des transformants.

Tous les milieux de culture sont stérilisés par autoclavage 20 min à 120°C.

b- Antibiotiques :

Antibiotiques	Organismes	Concentration
Ampicilline	*E.coli*	100 µg/l
Kanamycine	*E.coli, Arabidopsis*	50 µg/l
Spectinomycine	*E.coli*	100 µg/l
Gentamycine	*A.tumefaciens (GV3101)*	100 µg/l
Hygromycine	*Arabidopsis*	15 µg/l
Rifampycine	*A.tumefaciens (GV3101)*	50 µg/l
Tétracycline	*A.tumefaciens (GV3101)*	5 µg/l
Céfotaxime	*Arabidopsis*	250 µg/l
Phosphinotricine	*Arabidopsis*	10 µg/l
Chloramphénicol	*E.coli (Rosetta)*	34 µg/l

5- Oligonucléotides :

Les oligonucléotides de synthèse sont fournis par diverses sociétés. La température de fusion est estimée par la formule suivante :

Tm (°C) = 2 x (A+T) + 4 x (C+G) si l'oligo est de taille ≤ 20 nucléotides

Tm (°C) = [2 x (A+T) + 4 x (C+G)] x 20/nombre des bases de l'oligo si la taille est supérieure à 20 nucléotides

Gene	**Séquences**
G-TdRL1	**Fw** : GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGCTTTCCCAGCTCCAGCTGCTG
	Rv : GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTGTTCACTGACTCCAGGCTCCATGG
TdRL1	**Fw** : ATGGCTTTCCCAGCTCCAGCTGCTG
	Rv : GTTCACTGACTCCAGGCTCCATGG
509MD	**Fw** : GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGC
	Rv : GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT
509attB	**Fw** : ACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT
	Rv : ACCCAGCTTTCTTGTACAAAGTGGT
Actine	**Fw** : CTTGCACCAAGCAGCATGAA
	Rv : CCGATCCAGACACTGTACTTCCTT
GAPDH	**Fw** : TTGGTGACAACAGGTCAAGCA
	Rv : AAACTTGTCGCTCAATGCAATC
TIP4-Like	**Fw** : GTGAAAACTGTTGGAGAGAAGCAA
	Rv : TCAACTGGATACCCTTTCGCA
pans1-1	**LP** : TGTTCTTCTTGCGATTGTTTG
	RP : CATGGAGTCGAGTTCTTCAGC
LBb1.3	ATTTTGCCGATTTCGGAAC
GFP-Rv	Fw : ATGGTGAGCAAGGGCGAG
	Rv : GCCACAAGTTCAGCGTGTC
RSS1	**Fw** : ATGGCTGCCCCAACTGCAA
	Rv : GTTCATTCCAGGCTCCAGGA
RSS1-Gat	**Fw :** GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGCTGCCCCAACTGCAA
	Rv : GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTGTTCATTCCAGGCTCCAGGA

6- Microscopes :

Les microscopes utilisés pour le matériel fluorescent sont des microscopes confocaux Zeiss **LSM** 700 et 780 (**L**aser **S**canning **M**icroscope), de la plateforme de Microscopie et d'Imagerie de l'**IBMP** (Plateforme **RIO** d'imagerie cellulaire, Strasbourg Esplanade). Les microscopes sont utilisés en mode « multitracking » ce qui permet d'exciter séparément les fluorochromes. Les longueurs d'ondes d'excitation des lasers sont 405, 488 et 555 nm pour le **DAPI** et les protéines fluorescentes **GFP** et **RFP** respectivement. Les images prises par le logiciel **ZEN** (version 2012) sont enregistrées en format (.lsm) ont été traitées par le logiciel **ImageJ** (Schneider et al., 2012). Les observations en mode « **D**ifferentiel **I**nterface **C**ontrast » (**DIC**) ont réalisées par **Zeiss AXIO Imager Z1**. Les prises d'images se font par le logiciel Axiovision Release 4.8.2 (version 2010) et sont traitées par ImageJ.

7- Anticorps:

Nom	**Nature**	**Utilisation & dilution**	**Référence**
		Anticorps primaires	
Anti-GFP 2757	Polyclonal, Anti IgG lapin	Western blot (1/10000)	G. Duval - IGBMC
Anti-tubulin	Monoclonal, anti IgG souris	Immunomarquage (1/5000)	Sigma-Aldrich
Anti-TdRL1	Polyclonal, Anti IgG lapin	Western blot (1/10000)	G. Duval - IGBMC
		Anticorps secondaire	
GAR	**G**oat **A**nti-**R**abbit	Western blot (1/10000)	Life Technology
GAM	**G**oat **A**nti-**M**ouse	Western blot (1/10000)	Life Technology
GAR	Alexa Fluor ® 488 ou 568	Immunomarquage (1/300)	Invitrogen
GAM	Alexa Fluor ® 488 ou 568	Immunomarquage (1/300)	Invitrogen

A- Méthodes :

I- Culture des Plantes

1- *Arabidopsis thaliana* :

- Stérilisations des graines : les graines sont incubées dans une solution (70 % d'éthanol + 0,01% Triton X-100) pendant 10 min sous agitation douce puis lavées pendant 5 min dans de l'éthanol absolu avant d'être mises à sécher avant semis.
- Semis et culture *in vitro* : Après stérilisation, les graines sont semées dans des boites de Pétri contenant du milieu ½ MS. Pour la sélection les antibiotiques sont additionnés au milieu à une concentration appropriée. Les boites de semis sont transférées après 2 jours de vernalisation à 4°C, dans des logettes (jour : 14 heures, à 21°C, éclairage LED ; nuit : 10 heures à 17°C).
- Culture en terre : les plantules d'Arabidopsis de deux semaines sont repiquées en terre puis placées en logettes dédiées (jour 12 heures, nuit : 8 heures) jusqu'à la montée des graines.

2- Nicotiana benthamiana :

Les plantes *Nicotiana benthamiana* sont semées directement sur la terre, puis cultivées dans les serres à une température de 22°C (jour : 16h ; nuit : 8h). Des plantules de 6 semaines sont utilisées pour des expériences d'agroinfiltration.

3- Triticum turgidum var. durum :

Les plantes de blé sont stérilisées pendant 10 min dans une solution d'éthanol 96% additionnée de chlore (6,5 mg/ml) sous agitation douce puis lavées 3 fois avec de l'eau stérile pendant 10 min. Les graines sont germées sur des papiers filtre imbibés d'eau stérile. Des plantes de 12 jours sont utilisées pour les études d'expression.

II- Méthodes relatives à l'isolement, la manipulation et aux modifications des acides nucléiques :

1- Techniques relatives à l'ADN :

a- Extraction de l'ADN plasmidique (méthode de lyse alcaline ; Birnboim & Doly, 1979) :

A partir d'une culture d'une nuit de bactéries, on prélève 1.5 ml dans un tube Eppendorf qui est centrifugé à 8000 rpm pendant 10 min. Après élimination du surnageant, le culot est resuspendu dans 200 µl de Solution I (Glucose 50 mM, Tris-HCl 25 mM, EDTA Na_2 10 mM). Deux microlitres de RNase (20 µg/ml) sont ajoutés puis l'ensemble est incubé 5 min à température ambiante. Puis 400 µl de la solution II (Na OH 0,2 N ; SDS 1%) sont ajoutés. Après mélange par plusieurs inversions on laisse incuber 5 min sur la glace. Cette étape est suivie de l'ajout de 200 µl de solution III (acétate de sodium 5M, acide acétique glacial absolu 1M) avec une incubation de 5 min dans la glace. Après centrifugation de 10 min à 10000 rpm, le surnageant est récupéré et additionné de 0.6 volume d'isopropanol. Après une incubation de 10 min dans la glace l'ADN est précipité par centrifugation à 12000 rpm pendant 15 min à 4°C. L'ADN est repris 20 µl d'eau bidistillée stérile.

Alternativement les mini préparations d'ADN plasmidique sont réalisées à partir de 2 ml de culture, à l'aide des kits Nucleospin® Plasmid QuickPure ou (Macherey-Nagel) en suivant les recommandations du fabricant.

b- Extraction ADN à partir de levure (méthode à la Zymolyase) (Johnston JR. 1988) :

A partir d'une culture d'une nuit, un volume de 1.5 ml est centrifugé à une vitesse de 10 000 rpm pendant 5 min, le culot obtenu est resuspendu dans 1 ml de solution A (1 M Sorbitol, 50 mM d'acide citrique, 150 mM K_2HPO_4) avec 10 mM EDTA, 0.1% β-mercapto-éthanol et 1U Zymolyase) et incubé pendant 1h à 37°C. Après une centrifugation de 15 min à 12000 rpm, le culot est repris dans 450 µl de la solution B (150 mM NaCl 5M, 10 mM Tris pH= 7.5, 1 % Sarkosine) puis ajouté d'un volume de phénol. La phase aqueuse est récupérée après une centrifugation de 15 min à 12 000 rpm puis additionnée d'un volume de chloroforme. Après 5 min de centrifugation, l'ADN est récupéré dans la phase supérieure puis précipité par l'ajout de 0.1 V d'acétate de sodium et 2.5 V d'éthanol 100 %. Enfin le culot obtenu après centrifugation est lavé à l'éthanol 70 %, séché puis repris dans 20 µl d'eau stérile. Cinq microlitres sont utilisés pour transformer des cellules compétentes d'*E. coli*.

c- Extraction de l'ADN génomique : méthode CTAB (Doyle & Doyle, 1987) :

L'extraction de l'ADNg à partir de feuilles d'*Arabidopsis* est réalisée par la méthode CTAB (**C**etyl**T**rimethyl **A**mmonium **B**romide; Doyle & Doyle, 1987). Les feuilles sont broyées en présence de 300 µl de tampon d'extraction (**CTAB** (H6269, Sigma) : 2% (p/v) ; **PVP**

(**P**oly**V**inyl**P**yrrolidone ; **PVP40**, Sigma) : 1% (p/v) ; Tris HCl 100 mM pH 8,0 ; EDTA 20 mM ; NaCl 1,4 mM), et de billes de verre (1,7 - 2,0 mm) avec l'appareil Precellys 24 (Bertin Technologies) pendant 15 sec. Après avoir ajouté un volume de chloroforme au lysat, celui-ci est ensuite incubé à 60°C pendant 30 min. Après une centrifugation de 10 min à 14 000 g, on récupère la phase aqueuse qui est transférée dans un nouveau tube et aditionnée d'un volume d'isopropanol. Après mélange par inversion, l'ADN est laissé à précipiter à -20°C pendant 10 min. L'ADN précipité est récupéré par une centrifugation à 14 000 g pendant 10 min. Le culot contenant l'ADN obtenu est lavé avec 1 ml d'éthanol 70% puis resuspendu dans 50 µl d'eau Milli-Q et conservé à -20°C.

d- Quantification des acides nucléiques :

Pour doser une solution d'acides nucléiques tout en s'assurant de l'absence de contamination protéique, nous utilisons une méthode spectrophotométrique. L'absorbance de la solution est mesurée à 260 nm et 280 nm (A260 et A280) pour un trajet optique de 1 cm. Le rapport A260/A280 nous renseigne sur la pureté de la solution (un bon rapport est compris entre 1.7 et 2.0). Pour l'évaluation de la concentration en acides nucléiques, on utilise les correspondances suivantes :

1 A260 équivaut à 50 µg/mL d'ADN double brin

1 A260 équivaut à 33 µg/mL d'ADN simple brin

1 A260 équivaut à 40 µg/mL d'ARN

e- Transformation bactérienne par choc thermique :

- <u>Préparations des cellules compétentes et transformation bactérienne :</u>

Une colonie bactérienne est mise en suspension dans 2 ml de LB est incubée à 37°C toute la nuit sous agitation. Une culture de 50 ml de LB est inoculée avec 0,5 ml de la pré-culture d'*E.coli* (phase stationnaire). Cette culture est maintenue sous agitation à 37°C jusqu'à une densité optique à 600 nm entre 0,3 et 0,6. Ensuite, la culture est centrifugée à 4°C pendant 5 min à 4000 rpm, le surnageant est éliminé et le culot est remis en suspension dans 15 ml de $CaCl_2$ (0,1 M) froid afin de fragiliser la paroi des cellules. Ainsi la suspension est placée dans la glace pendant 30 min. Puis, elle est centrifugée dans les mêmes conditions. Enfin, on reprend le culot dans 2 ml de $CaCl_2$ (0,1 M) froid et après au moins 45 min dans la glace, les bactéries sont prêtes pour la transformation.

- Transformation :

On transfère à 200 µl de cellules préparées avec le produit de ligation, on mélange doucement et on incube durant 30 min dans la glace. Ensuite, on applique un choc thermique à 42°C pendant 90 s. Les cellules sont rapidement placées dans la glace pendant 2 min avant d'y ajouter 0.8 ml de LB. Après une incubation d'une heure à 37 °C sous agitation (200 rpm), on étale sur boîte de Pétri contenant l'antibiotique approprié. Enfin les boîtes sont incubées à l'étuve à 37°C pendant toute la nuit.

f- Digestion enzymatique :

ADN (1 µg)	5 µl
Tampon de l'enzyme 10 X	2 µl
Endonucléase de restriction : **Fermentas, Invitrogen** (10 U/µl)	1 µl
H_2O qsp	20 µl

On incube le mélange pendant 1 à 3 h à la température appropriée.

g- Déphosphorylation des vecteurs :

Les extrémités libres du vecteur sont déphosphorylées sous l'action de la phosphatase alcaline afin d'éviter son autoligation. Le mélange réactionnel contient :

ADN	10 µl
Tp de l'enzyme (10x)	5 µl
Shrimp Phosphatase alkaline (**Promega**) (1 U/µl)	5 µl
H_2O qsp	50 µl

Ensuite, le mélange est incubé 15 min à 37°C. L'enzyme est enfin inactivée à 65°C pendant 15 min.

h- Ligation vecteur-insert :

La quantité d'ADN de l'insert et du vecteur est estimée sur gel d'agarose en référence au marqueur de poids moléculaire. Les proportions d'insert et de vecteur sont mélangées afin d'avoir un rapport molaire insert/vecteur d'au moins 3.

Le mélange réactionnel est la suivant :

Vecteur	X µl
Insert purifié	Y µl
Tp de ligation (10X)	2 µl
T_4 DNA ligase **Promega** (1U/µl)	1 µl
H_2O qsp	20 µl

Ce mélange est incubé pendant 2 heures à température ambiante ou une nuit à 16°C.

i- Electrophorèse :

Dans le but de visualiser les acides nucléiques sous UV, on prépare un gel d'agarose de 0.8-1% en présence de Bromure d'éthidium (1 µg /ml). L'acide nucléique à analyser doit être additionné de tampon de dépôt concentré 6X (0.25 % bleu de bromophénol ; 40 % saccharose) avant d'être chargé dans un puits du gel. Un marqueur de taille (λ/PstI) est déposé dans un autre puits afin d'être utilisé comme référence de taille. L'électrophorèse s'effectue en présence du tampon de migration TAE 1X avec un voltage de 100 V. L'ADN est visualisé par la suite sous lampe UV émettant à 254 nm.

j- Purification des fragments d'ADN à partir du gel d'Agarose :

Après la migration de l'ADN à purifier dans un gel d'agarose, la bande d'intérêt est excisée du gel à l'aide d'une lame et placée dans un microtube. Ensuite les morceaux d'ADN sont purifiés du gel d'agarose en utilisant le Kit « **FavorPrep™Gel / PCR Purification Kit, Favorgen »**.

k- Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) :

Les réactions de PCR ont été réalisées à l'aide d'un appareil PCR « Gene Amp PCR system 2700, Applied Biosystems », en utilisant des paires d'oligonucléotides spécifiques. Les

réactions PCR sont effectuées dans un volume de 25 µl où sont inclus les ingrédients suivants :

ADN (50 ng / µl)	1	µl
Amorce 1 (10 µM)	1	µl
Amorce 2 (10 µM)	1	µl
Tampon Taq ADN polymérase 10X	4	µl
dNTP (2 mM)	0,5	µl
Taq ADN polymérase (GoTaq) (5U/µl)	0.1	µl
H_2O qsp	20	µl

L'amplification se fait comme suit :

- 5 minutes à 94°C pour la dénaturation initiale
- 30-40 cycles dont chacun est composé de :
  - Dénaturation de 30 secs à 94°C.
  - Hybridation pendant 30 secs. (Tm-5°C)
  - Polymérisation à 72°C (1 min par kb)
- 10 min à 72°C (élongation finale) pour compléter la synthèse et ajouter les extensions en 3'.

Le produit de l'amplification est analysé par électrophorèse sur gel d'agarose à 1 %.

l- PCR sur colonies :

Cette méthode nous permet de cribler de nombreux transformants bactériens ou de levure sans passer par l'étape d'extraction d'ADN plasmidique. A l'aide d'un cône jaune stérile, la colonie est prélevée et déposée dans le fond du tube PCR. Ensuite les réactifs de la PCR sont ajoutés au tube et le cycle de PCR est réalisé. Les produits PCR issus de chaque colonie sont séparés sur gel d'agarose à 1%.

Cependant dans le cas de colonies de levure, car leur paroi est très épaisse, elles sont d'abord lysées dans 3 µl de NaOH 0.02N en chauffant pendant 10 min à 99°C avant de le placer directement sur la glace et de procéder à l'ajout des différents ingrédients de la PCR.

m- Système de clonage Gateway® :

C'est une méthode de clonage rapide de l'ADN basé sur la recombinaison site spécifique. La séquence d'intérêt est flanquée de deux sites attB qui permet son insertion par recombinaison avec les deux sites attP du vecteur d'entrée « pDONR » grâce à une BP clonase. Une fois la séquence d'intérêt dans le vecteur donneur, le fragment d'intérêt sera transféré par recombinaison avec une LR clonase dans un vecteur de destination (exemples). Les réactions se fait avec le kit selon les recommandations de fabricant (**Invitrogen**) avec des concentrations de 100-150 ng pour le vecteur et l'insert respectivement.

n- Séquençage :

Le séquençage se fait à la plateforme de séquençage et d'expression génique de l'**IBMP** (**Applied Biosystems PRISM 3130**).

2- Techniques relatives à l'ARN :

a- Extractions des ARN Totaux :

Le matériel végétal (100 mg) est broyé avec de l'azote liquide avant d'ajouter 1 ml de Trizol (**Invitrogen®**). Après incubation pendant 5 min à température ambiante, on ajoute 200 µl de chloroforme et on laisse 2 à 3 min à température ambiante. Ensuite après une centrifugation de 15 min à 12000 rpm et à 4°C on récupère la phase supérieure contenant l'ARN dans un nouveau tube et on ajoute 1V d'isopropanol. Après 10 min à température ambiante une centrifugation de 10 min à 12 000 rpm à 4°C permet de récupérer l'ARN sous forme de culot qui sera enfin lavé à l'éthanol 70 % et repris dans un volume approprié d'eau traitée au DEPC. L'ARN est stocké à -80°C.

b- Traitement de l'ARN par la DNase - RNase free :

Après extraction, les ARN obtenus sont traités à la DNase. Le milieu réactionnel contenant les acides nucléiques, le tampon DNase 10X et la DNase (1U/µl) dans un volume final de 10 µl est incubé 15 min à 37°C. Après traitement, l'enzyme est inactivée par l'ajout de 1 µl d' EDTA 25 mM suivi d'une incubation de 10 min à 65°C.

c- RT-PCR :

Après avoir éliminé tout l'ADN génomique, la réaction de transcription inverse est réalisée après une étape de dénaturation de l'ARN à 80°C pendant 10 min. L'ARN dénaturé est placé sur la glace puis sont ajoutés les ingrédients suivants : 4 µl tampon de transcription

inverse 5X, 1 µl dNTPs 10 mM, 1 µl d'inhibiteur de RNase, 1 µl de MMLV (**Invitrogen®**), 1 µl d'oligodT, 1 µl DTT 10 mM). Le tout est incubé à une température de 37°C pendant 1h. Enfin l'enzyme est inactivée à 65°C pendant 15 min.

Le cDNA est ensuite amplifié par PCR en utilisant les oligonucléotides adéquats en respectant le programme suivant :

- 1 cycle de 3 minutes à 94°C pour la dénaturation initiale
- 35 cycles dont chacun est composé de :
  - Dénaturation : 30 s à 94°C
  - Hybridation : 30 s (Tm-5°C).
  - Polymérisation : à 72°C 1 min par kb
- 1 cycle d'élongation de 10 min à 72°C

Le produit de l'amplification est analysé par électrophorèse sur gel d'agarose à 2 %.

d- RT-PCR en temps réel (qRT-PCR) :

La RT-PCR en temps réel (qPCR) est basée sur la mesure du niveau de fluorescence au cours des cycle de PCR en présence d'un agent intercalant SYBR Green. La réaction se fait dans 10 µl et contient 5 µl SYBR Green Master Mix (SYBR Green 1 Dye 2x, AmpliTaq Gold DNA Polymerase, dNTPs avec dUTP), 1 µL d'ADNc et 0,25 µM de chaque amorce. Les réactions PCR sont réalisées en triplicat à l'aide d'un thermocycleur **Light Cycler 480 II** (Roche). Les données de fluorescence sont collectées à chaque cycle de PCR et représentent la quantité d'ADN double brin présent. La quantification des ADNc est réalisée avec la méthode de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (quantification relative normalisée par un calibrateur) (Livak and Schmittgen, 2001). Les données sont normalisées par rapport au niveau de transcrits de gènes de référence (GADPH, TIP4-LIKE et EXPRESSED) et calibrées par rapport aux quantités présentes dans l'écotype sauvage tout en tenant compte de l'efficacité d'amplification ([1+E]–ΔΔCt ; Udvardi et al., 2008).

III- Méthodes relatives à la production de protéine recombinante chez les procaryotes :

1- Production de la protéine recombinante :

On prélève 200 µl d'une pré-culture, et on les inocule dans 100 ml de LB liquide. La culture est incubée à 37°C jusqu'à atteindre un DO entre 0,5 et 0,6. A la valeur de DO

attendue, 1 ml de la culture est prélevé servant comme contrôle 'non induit'. Ensuite, on ajoute à cette culture de l'IPTG (inducteur du promoteur contrôlant l'expression du gène d'intérêt) à une concentration finale de 1 mM. Après 3h d'induction à 37°C, on prélève 1 ml. Ces prélèvements sont centrifugés 3 min à 6000 rpm, mélangés avec le tampon de charge (0.08M Tris HCl pH=6,8 ; 0.1M DTT ; 4M urée ; SDS 2% ; glycérol 10% ; bleu de bromophénol) et placé à -20°C.

2- Séparation et révélation des protéines :

Les protéines sont séparées selon leur poids moléculaire par électrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du SDS (SDS-PAGE, Laemmli 1970).

La séparation des protéines est réalisée sur un gel discontinu monodimensionnel de polyacrylamide composé d'un gel de concentration à 5% (acrylamide/bisacrylamide ; 1 M Tris-HCl pH=6,8 ; SDS 10% ; APS ; TEMED) et d'un gel de séparation à 8% (acrylamide/bisacrylamide, 1M Tris-HCl pH 8,8 ; SDS 10% ; APS ; TEMED). Le peigne est déposé sur le gel de concentration (5 %) avec précaution et en éliminant les bulles d'air pouvant se former entre ces deux surfaces. L'ensemble des gels polymérisés est installé dans une cuve dans laquelle on ajoute un tampon de migration (Tris-HCl 25 mM ; glycine 200 mM ; SDS 0,1%). Avant le dépôt, les échantillons protéiques sont dénaturés à 100°C pendant 5 min. La migration est réalisée sous un premier ampérage constant 85 V (18 mA) pour le gel de concentration et pour le gel de séparation on applique un ampérage constant de 120 V (28 mA). Après migration, le gel est démoulé. Les protéines sont révélées après coloration (bleu de Coomassie R250 ; éthanol 50% ; acide acétique 7%) ; et par l'action de la solution décolorante (acide acétique 7% ; éthanol 30% ; H2O).

IV- Méthodes relatives à la surexpression de gène chez la levure :

1- Transformation de levures :

À partir d'une pré-culture d'une nuit à 30°C, une culture de DO_{600nm} de 0.2 est lancée dans 50 ml de milieu **YPD** à 30°C pendant 2 heures. Lorsque la DO atteint 1, la culture est transférée dans un tube de 50 ml et centrifugée 5 min à 3000 rpm à température ambiante. Le culot obtenu est lavé avec 10 ml d'eau stérile. Après une seconde centrifugation le culot

est resuspendu dans 5 ml de LiOAc/TE, centrifugé pendant 5 min à 3000 rpm, puis 250 µl de LiOAc/TE sont ajoutés au culot et les cellules sont prêtes pour la transformation.

On mélange ensuite 50 µl de cellules, 10 µl d'ADN plasmidique, 5 µl d'ADN de sperme de saumon, 70 µl de DMSO et 300 µl de PEG 40%/LiOAc 0.1 M/TE 1 mM. Le tout est mélangé doucement puis incubé 30 min à 30°C. Un choc thermique à 42°C pendant 15 min est essentiel pour la pénétration de l'ADN dans les cellules. Enfin, on ajoute 700 µl d'eau stérile et on centrifuge pendant 1 min à 3000 rpm, le culot est étalé par la suite sur le milieu approprié.

2- Tests phénotypiques de croissance de levure :

Le but de ces tests est de déterminer la capacité de croissance des souches testées sur différents milieux sélectifs par des tests en gouttes. Les colonies sont mises en culture en milieu liquide riche jusqu'à une DO_{600nm} de 0.5. Ensuite des séries de dilution sont réalisées (10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}). Une goutte de chaque dilution (3 µl) est alors déposée sur différents milieux sélectifs. Les boites sont mises à l'étuve à 30°C pendant 2 à 3 jours.

3- Double hybride :

Après transformation, la sélections des transformant se fait par des tests de croissance pour activer les gènes rapporteurs. Seuls les clones positifs pour l'activation des deux gènes de sélection LEU2 et TRP1 sont choisis, c'est-à-dire les colonies capables de croître sur un milieu sans leucine ni tryptophane, comportant nos 2 construction. Les colonies sont ensuite sélectionnées sur des boîtes de milieu sélectif -H/-T/-A/-L-/glucose par la technique de réplique sur velours pour vérifier l'activation des deux gènes rapporteurs. Les clones ayant passé ce test contiennent donc un ADNc codant pour une protéine interagissant avec notre appât..

V- Transformation des plantes :

1- Transformation transitoire des feuilles de *Nicotiana benthamiana* (Sparkes et al., 2006) :

La transformation transitoire de feuilles de *N. benthamiana* par agroInfiltration est utilisée pour étudier la localisation de protéines d'intérêt. Des cultures de 10 ml d'Agrobacterium (***GV3101***) transformées par un vecteur binaire contenant la construction d'intérêt et une autre contient une construction permettant l'expression de la protéine p19 (Voinnet et al., 2003 ;suppresseur de l'extinction des gènes (fournie par l'équipe dirigée par le Dr. Achard, IBMP).

Les cultures sont laissées toute la nuit sous agitation 200 rpm à 28°C jusqu'à une DO_{600nm} de 0,80. Après une centrifugation à 2500 g pendant 15 min les culots bactériens sont repris dans la solution d'agro-infiltration (MgCl2 10 mM ; acétosyringone 200 µM) afin d'obtenir une DO_{600nm} de 0,5 par construction. Après blessure avec la pointe d'une aiguille de la face inférieure du limbe des feuilles (les deux premières feuilles suivants les cotylédons) la suspension bactérienne est infiltrée dans l'apoplasme de la feuille à l'aide d'une seringue en plastique. Les plants agro-infiltrés sont placés en logette pendant 48h, avant le prélèvement des feuilles et l'observation des protéines fluorescentes à l'aide du microscope confocal.

2- Transformation d'Arabidopsis par floral dip (Clough et Bent, 1998) :

Pour accomplir la transformation des plantes d'*Arabidopsis*, il est nécessaire de s'arranger pour obtenir le jour même un matériel végétal apte à la transformation et une culture de la souche d'*Agrobacterium* ayant atteint la DO désirée.

Les plantes d'*Arabidopsis* destinées à la transformation, ont été cultivées en terreau pendant 1 mois jusqu'à l'obtention d'hampes florales. Quelques jours avant la transformation, les hampes florales des plantes d'*Arabidopsis* sauvages sont coupées pour favoriser la pousse de nombreuses hampes secondaires. Les fleurs doivent être fermées.

a- Préparation et transformation des cellules compétentes *d'Agrobacterium tumefaciens* :

Les bactéries sont mises en culture à 30°C dans un milieu LB liquide additionné de rifampicine, en agitation, jusqu'à une DO à 600nm de l'ordre de 0.6. Les bactéries sont ensuite centrifugées à 4000 rpm pendant 5 min. Le culot obtenu est resuspendu dans du $CaCl_2$ (10 mM) après lavage à l'eau stérile. Une fois préparées, les cellules compétentes sont

aliquotées dans des tubes et mises sur la glace pendant 20 min. Pour la transformation, 1 µg de vecteur portant la construction d'intérêt est ajoutée aux 200 µl de suspension de cellules compétentes puis le tout est incubé pendant 30 min dans la glace. Les tubes sont ensuite transférés quelques secondes dans l'azote liquide, puis pendant 5 min à 37°C. Huit cents microlitres de LB liquide sont alors ajoutés et les cellules sont incubées pendant 2-3 heures sous agitation à 30°C. Enfin, la suspension est étalée sur des boites de Pétri contenant le milieu LB solide additionné de l'antibiotique adéquat (50 µg/ml de kanamycine et 30 µg/ml de rifampicine) et mises en incubation pendant 2 jours à 30°C.

b- Transformation des plantes :

Une préculture des bactéries transformées sert à ensemencer une culture finale de 500 ml de LB, contenant les mêmes antibiotiques (Kanamycine et Rifampycine), jusqu'à ce que la DO à 600 nm atteigne 0.8. Les bactéries sont ensuite collectées par centrifugation 5 min à 5000 rpm à température ambiante et reprises dans une solution de « Dip » (Saccharose 5%, ½MS, 500 µl de SILWET L-77, 200 µM acétosyringone). Les boutons floraux sont ensuite trempés dans la suspension pendant 90 secondes. Ensuite les plantes sont placées 24 heures dans une mini-serre à l'obscurité avant de les remettre à la lumière. Après floraison, l'arrosage des plantes est supprimé et les graines matures sont récoltées pour la sélection.

VI- Techniques de Cytologie :

1- Coloration du matériel végétal à l'iodure de Propidium :

L'iodure de propidium (molécule qui s'accumule dans la paroi pecto-cellulosique des cellules vivantes), est utilisé en solution aqueuse (3 µg/ml), pour colorer les parois des cellules en microscopie confocale (excitation 555 nm/émission > 560nm), L'iodure de propidium permet de distinguer les cellules vivantes (seulement les membranes sont colorées) des cellules mortes qui se colorent intégralement en rouge.

2- Immunomarquage :

L'immunomarquage sur des plantules d'*Arabidopsis* de 7 jours est réalisé par une fixation des tissus dans le tampon **MTBS** (PIPES 50 mM, $MgSO_4$ 5 mM, EGTA 5 mM, pH 6,9) pendant

30 min à température ambiante si l'on veut analyser le cytosquelette de microtubules, ou 15 min à température ambiante et 15 min sur la glace pour pouvoir analyser la chromatine et les microtubules) en présence de 4% de paraformaldéhyde. Les plantules sont lavées 3 fois dans du MTBS. Après une digestion enzymatique de la paroi [caylase 0,3%, macérozyme 0,1% et pectolyase 0,2% dilué dans un tampon de digestion (MES 25 mM, $CaCl_2$ 8 mM, mannitol 600 mM, pH 5,5], les plantules sont alignées sur une lame poly-L-lysinée (montage dit 'whole mount'), et écrasées entre lame et lamelle et congelées rapidement dans l'azote liquide. Après décongélation de l'échantillon préservé sur la lame, la saturation des sites aspécifiques est faite avec de la BSA (8% en présence de Triton 0,1%) dans du tampon MTBS. Ensuite les lames sont incubées avec l'anticorps primaire dilué dans une solution de MTBS (BSA 1%) i pendant 12 h à 4°C. Après 3 lavages de 5 min dans du MTBS, les lames sont incubées à température ambiante pendant 1 heure avec les anticorps secondaires couplés au fluorochromes Alexa^{488} ou Alexa^{568} (**Invitrogen®**) dilués dans du MTBS, BSA 1%. A la fin, les lames sont montées dans 8 µL de **Vectashield®** en présence de DAPI à 2 µg/ml.

VII- Outils bio-informatiques :

1- Bases de données & outils d'analyses :

Voici une liste non exhaustive des URLs les plus couramment utilisées :

- **GenBank** : http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
- **ExPASy**: http://www.expasy.ch/
- **ABIM**: http://www.up.univ-mrs.fr/wabim/english/logligne.html
- **TAIR**: The « *Arabidopsis* Information Ressource »: http://www.arabidopsis.org/
- **SoftBerry:** http:// linux1 .softberry.com/berry.phtml
- EnsemblPlant : https://plants.ensembl.org/index.html
- **Wheat Exp :** https://wheat.pw.usda.gov/WheatExp/
- **e-Plant** : http://bar.utoronto.ca/eplant/
- **Phytozome** : https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html
- **GENEVESTIGATOR®** : https://genevestigator.com/gv/
- **The R Project for Statistical Computing:** https://www.r-project.org/
- **AgriGO** : Tian et al. 2017; http://bioinfo.cau.edu.cn/agriGO/
- **Venny 2.1** : http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/

2- Phylogénie :

Les analyses phylogénétiques ont été faites en analysant les similarités protéiques. L'ensemble des séquences sont alignées à l'aide de MultAlin et les résultats des alignements ont été traités avec le logiciel **MEGA** version 5 (Tamura, 2011).

Les séquences peptidiques ont été analysées en utilisant différents programmes accessibles depuis le site **EXPASY** (http://www.expasy.org/) et le site **SoftBerry** (http:// linux1 .softberry.com/berry.phtml) avec notamment, des sites de traduction d'une séquence nucléotidique en séquence peptidique (http://www.expasy.org/tools /dna), des sites permettant l'analyse des paramètres physicochimiques d'une structure protéique primaire donnée (http://www.expasy.org/tools/protparam.html).

3- Prédictions informatiques :

Il existe plusieurs sites Internet qui permettent de prédire les sites putatifs de phosphorylation, glycosylation, ou ceux permettant de prédire une localisation subcellulaire d'une protéine.

- **PSORT** (http://www.psort.org/),
- **ProtComp9.0**http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=protcomppl&group= programs &subgroup=proloc).
- **TargetP** (http:// www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/)
- **STRING 9.05** (http://string-db.org/).
- **FoldIndex©** (http://bip.weizmann.ac.il/fldbin/findex)
- **KinasePhos** (http://kinasephos.mbc.nctu.edu.tw).
- **SMART** (http://smart.embl-heidelberg.de/)
- **Pfam** (http://pfam.sanger.ac.uk/search/sequence)
- **Pole Bioinformatique lyonnais** GORIV(http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat. pl? page=npsa_sspred.html)
- **SCRATCH Protein Predictor** (http://scratch.proteomics.ics.uci.edu/)
- **Deepview-Swiss-Pdbviewer** (http://spdbv.vital-it.ch/)

4- Analyses statistiques :

Les analyses statistiques en utilisant le T-test sont faite par microsoft Excel, seulement la différence avec p-values < 0.05 a été considéré. Heat map & Scatter plot a été faite par le logiciel R (version 3.3.1) (https://www.r-project.org/) et ggplot2 R (version 2.2.1) & Lattice (version 0.20-35 de 25 mars 2017).

Bibliographie

Abe, H., Urao, T., Ito, T., Seki, M., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2003). Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *The Plant Cell*, *15*(1), 63-78.

Abogadallah, G. M. (2010). Insights into the significance of antioxidative defense under salt stress. *Plant signaling & behavior*, *5*(4), 369-374.

Achard, P., Cheng, H., De Grauwe, L., Decat, J., Schoutteten, H., Moritz, T., & Harberd, N. P. (2006). Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals. *Science*, *311*(5757), 91-94.

Achard, P., Gong, F., Cheminant, S., Alioua, M., Hedden, P., & Genschik, P. (2008). The cold-inducible CBF1 factor–dependent signaling pathway modulates the accumulation of the growth-repressing DELLA proteins via its effect on gibberellin metabolism. *The Plant Cell*, *20*(8), 2117-2129.

Achard, P., Gusti, A., Cheminant, S., Alioua, M., Dhondt, S., Coppens, F., & Genschik, P. (2009). Gibberellin signaling controls cell proliferation rate in Arabidopsis. *Current biology*, *19*(14), 1188-1193.

Alexander, M. R., Tyers, M., Perret, M., Craig, B. M., Fang, K. S., & Gustin, M. C. (2001). Regulation of cell cycle progression by Swe1p and Hog1p following hypertonic stress. *Molecular Biology of the Cell*, *12*(1), 53-62.

Ali, G. S., & Reddy, A. S. N. (2008). Regulation of alternative splicing of pre-mRNAs by stresses. In *Nuclear pre-mRNA Processing in Plants* (pp. 257-275). Springer Berlin Heidelberg.

Allen, R. D. (1995). Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. *Plant physiology*, *107*(4), 1049.

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, *215*(3), 403-410.

Amirjani, M. R. (2011). Effect of salinity stress on growth, sugar content, pigments and enzyme activity of rice. *International Journal of Botany*, *7*(1), 73-81.

Anders, A., & Sawin, K. E. (2011). Microtubule stabilization in vivo by nucleation-incompetent γ-tubulin complex. *J Cell Sci*, *124*(8), 1207-1213.

Ariño, J., Ramos, J., & Sychrová, H. (2010). Alkali metal cation transport and homeostasis in yeasts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *74*(1), 95-120.

Bailly, C. (2004). Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Science Research*, *14*(2), 93-107.

Bailey, T. L., & Elkan, C. (1995, July). The value of prior knowledge in discovering motifs with MEME. *In Ismb* (Vol. 3, pp. 21-29).

Baker, S. H., Frederick, D. L., Bloecher, A., & Tatchell, K. (1997). Alanine-scanning mutagenesis of protein phosphatase type 1 in the yeast Saccharomyces cerevisiae. *Genetics*, *145*(3), 615-626.

Barnett J A, Payne R W, Yarrow, D. 1990. Yeasts: Characteristics and Identification, 2nd edn. Cambridge : Cambridge University Press.

Barragán, V., Leidi, E. O., Andrés, Z., Rubio, L., De Luca, A., Fernández, J. A., & Pardo, J. M. (2012). Ion exchangers NHX1 and NHX2 mediate active potassium uptake into vacuoles to regulate cell turgor and stomatal function in Arabidopsis. *The Plant Cell*, *24*(3), 1127-1142.

Batzenschlager, M., Lermontova, I., Schubert, V., Fuchs, J., Berr, A., Koini, M. A., & Fransz, P. (2015). Arabidopsis MZT1 homologs GIP1 and GIP2 are essential for centromere architecture. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(28), 8656-8660.

Batzenschlager, M., Masoud, K., Janski, N., Houlné, G., Herzog, E., Evrard, J. L., & Schmit, A. C. (2013). The GIP gamma-tubulin complex-associated proteins are involved in nuclear architecture in Arabidopsis thaliana. *Frontiers in plant science*, *4*, 480.

Baxter, A., Mittler, R., & Suzuki, N. (2013). ROS as key players in plant stress signalling. *Journal of experimental botany*, *65*(5), 1229-1240.

Binarová, P., Cenklová, V., Sulimenko, V., Drykova, D., Volc, J., & Dráber, P. (2003). Distribution of γ-tubulin in cellular compartments of higher plant cells. *Cell biology international*, *27*(3), 167-169.

Blancaflor, E. B., & Hasenstein, K. H. (1997). The organization of the actin cytoskeleton in vertical and graviresponding primary roots of maize. *Plant Physiology*, *113*(4), 1447-1455.

Bleu, P. (2008). Changement climatique et énergie en méditerranée. *Sophia Antipolis*.

Blumwald, E., Grover, A., & Good, A. G. (2004, September). Breeding for abiotic stress resistance: challenges and opportunities. In *New directions for a diverse planet". Proceedings of the 4th International Crop Science Congress, Brisbane, Australia*.

Bollen, M., Peti, W., Ragusa, M. J., & Beullens, M. (2010). The extended PP1 toolkit: designed to create specificity. *Trends in biochemical sciences*, *35*(8), 450-458.

Boruc, J., Weimer, A., Stoppin-Mellet, V., Mylle, E., Kosetsu, K., Cedeño, C., ... & Gonzalez, N. (2016). Phosphorylation of MAP65-1 by Arabidopsis Aurora kinases is required for efficient cell cycle progression. *Plant physiology*, pp-01602.

Bot, A., Nachtergaele, F., & Young, A. (2000). *Land resource potential and constraints at regional and country levels* (No. 90). Food & Agriculture Org.

Boudolf, V., Vlieghe, K., Beemster, G. T., Magyar, Z., Acosta, J. A. T., Maes, S., ... & De Veylder, L. (2004). The plant-specific cyclin-dependent kinase CDKB1; 1 and transcription factor E2Fa-DPa control the balance of mitotically dividing and endoreduplicating cells in Arabidopsis. *The Plant Cell*, *16*(10), 2683-2692.

Bradai, M., Mahjoubi, H., Chini, A., Chabouté, M. E., Hanin, M., & Ebel, C. (2018). Genome wide identification of wheat and Brachypodium type one protein phosphatases and functional characterization of durum wheat TdPP1a. *PloS one*, *13*(1), e0191272.

Bray, E. A. (2000). Response to abiotic stress. *Biochemistry and molecular biology of plants*, 1158-1203.

Burssens, S., de Almeida Engler, J., Beeckman, T., Richard, C., Shaul, O., Ferreira, P., ... & Inzé, D. (2000). Developmental expression of the Arabidopsis thaliana CycA2; 1 gene. *Planta*, *211*(5), 623-631.

Cabot, C., Sibole, J. V., Barceló, J., & Poschenrieder, C. (2009). Abscisic acid decreases leaf Na+ exclusion in salt-treated Phaseolus vulgaris L. *Journal of plant growth regulation*, *28*(2), 187-192.

Canaday, J., Brochot, A. L., Seltzer, V., Herzog, E., Evrard, J. L., & Schmit, A. C. (2004). Microtubule assembly in higher plants. *Recent research developments in molecular biology*, *2*, 103-119.

Canaday, J., Stoppin-Mellet, V., Mutterer, J., Lambert, A. M., & Schmit, A. C. (2000). Higher plant cells: gamma-tubulin and microtubule nucleation in the absence of centrosomes. Microscopy research and technique, 49(5), 487-495.

Cao, Y., Song, F., Goodman, R. M., & Zheng, Z. (2006). Molecular characterization of four rice genes encoding ethylene-responsive transcriptional factors and their expressions in response to biotic and abiotic stress. *Journal of plant physiology*, *163*(11), 1167-1178.

Carmena, M., & Earnshaw, W. C. (2003). The cellular geography of aurora kinases. *Nature reviews Molecular cell biology*, *4*(11), 842.

Castells, E., Molinier, J., Benvenuto, G., Bourbousse, C., Zabulon, G., Zalc, A., ... & Bowler, C. (2011). The conserved factor DE-ETIOLATED 1 cooperates with CUL4–DDB1DDB2 to maintain genome integrity upon UV stress. *The EMBO journal*, *30*(6), 1162-1172.

Chandler, J. W. (2009). Auxin as compère in plant hormone crosstalk. *Planta*, *231*(1), 1-12.

Chang, L., & Goldman, R. D. (2004). Intermediate filaments mediate cytoskeletal crosstalk. *Nature reviews Molecular cell biology*, *5*(8), 601.

Chan, J., Calder, G. M., Doonan, J. H., & Lloyd, C. W. (2003). EB1 reveals mobile microtubule nucleation sites in Arabidopsis. Nature cell biology, 5(11), 967.

Chen, F., Tholl, D., Bohlmann, J., & Pichersky, E. (2011). The family of terpene synthases in plants: a mid-size family of genes for specialized metabolism that is highly diversified throughout the kingdom. *The Plant Journal*, *66*(1), 212-229.

Cheng, M. C., Liao, P. M., Kuo, W. W., & Lin, T. P. (2013). The Arabidopsis ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 regulates abiotic stress-responsive gene expression by binding to different cis-acting

elements in response to different stress signals. *Plant Physiology*, *162*(3), 1566-1582.

Chini, A., Fonseca, S., Fernandez, G., Adie, B., Chico, J. M., Lorenzo, O., ... & Micol, J. L. (2007). The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature*, *448*(7154), 666.
Chinnusamy, V., Jagendorf, A., & Zhu, J. K. (2005). Understanding and improving salt tolerance in plants. *Crop Science*, *45*(2), 437-448.

Clough, S. J., & Bent, A. F. (1998). Floral dip: a simplified method forAgrobacterium-mediated transformation ofArabidopsis thaliana. *The plant journal*, *16*(6), 735-743.

Cook, G. S., Grønlund, A. L., Siciliano, I., Spadafora, N., Amini, M., Herbert, R. J., ... & Rogers, H. J. (2013). Plant WEE1 kinase is cell cycle regulated and removed at mitosis via the 26S proteasome machinery. *Journal of experimental botany*, *64*(7), 2093-2106.

Cromer, L., Jolivet, S., Horlow, C., Chelysheva, L., Heyman, J., De Jaeger, G., ... & Mercier, R. (2013). Centromeric cohesion is protected twice at meiosis, by SHUGOSHINs at anaphase I and by PATRONUS at interkinesis. *Current Biology*, *23*(21), 2090-2099.

Cuin, T. A., & Shabala, S. (2007). Compatible solutes reduce ROS-induced potassium efflux in Arabidopsis roots. *Plant, cell & environment*, *30*(7), 875-885.

Das, K., & Roychoudhury, A. (2014). Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in Environmental Science*, *2*, 53.

Davière, J. M., & Achard, P. (2013). Gibberellin signaling in plants. *Development*, *140*(6), 1147-1151.

De Castro, E., Sigrist, C. J., Gattiker, A., Bulliard, V., Langendijk-Genevaux, P. S., Gasteiger, E., ... & Hulo, N. (2006). ScanProsite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins. *Nucleic acids research*, *34*(suppl_2), W362-W365.

De Jager, S. M., Menges, M., Bauer, U. M., & Murray, J. A. H. (2001). Arabidopsis E2F1 binds a sequence present in the promoter of S-phase-regulated gene AtCDC6 and is a member of a multigene family with differential activities. *Plant molecular biology*, *47*(4), 555-568.

Debaeke, P., Puech, J., Casals, M. L., & Petibon, P. (1996). Élaboration du rendement du blé d'hiver en conditions de déficit hydrique. I. Étude en lysimètres. *Agronomie*, *16*(1), 3-23.

Del Pozo, J. C., Lopez-Matas, M. A., Ramirez-Parra, E., & Gutierrez, C. (2005). Hormonal control of the plant cell cycle. *Physiologia Plantarum*, 123(2), 173-183.

Demidchik, V. (2015). Mechanisms of oxidative stress in plants: from classical chemistry to cell biology. *Environmental and Experimental Botany*, *109*, 212-228.

Demidov, D., Van Damme, D., Geelen, D., Blattner, F. R., & Houben, A. (2005). Identification and dynamics of two classes of aurora-like kinases in Arabidopsis and other plants. *The Plant*

Cell, *17*(3), 836-848.

De Veylder, L., Beeckman, T., & Inzé, D. (2007). The ins and outs of the plant cell cycle. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(8), 655.

Doyle, J. J. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull Bot Soc Am*, *19*, 11-15.

Drira, M., Saibi, W., Brini, F., Gargouri, A., Masmoudi, K., & Hanin, M. (2013). The K-segments of the wheat dehydrin DHN-5 are essential for the protection of lactate dehydrogenase and β-glucosidase activities in vitro. *Molecular biotechnology*, *54*(2), 643-650.

Dudits, D., Ábrahám, E., Miskolczi, P., Ayaydin, F., Bilgin, M., & Horváth, G. V. (2011). Cell-cycle control as a target for calcium, hormonal and developmental signals: the role of phosphorylation in the retinoblastoma-centred pathway. *Annals of botany*, *107*(7), 1193-1202.

Durfee, T., Becherer, K., Chen, P. L., Yeh, S. H., Yang, Y., Kilburn, A. E., ... & Elledge, S. J. (1993). The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit. *Genes & development*, *7*(4), 555-569.

Dyson, N. (1998). The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes & development*, *12*(15), 2245-2262.

Ebel, C., & Hanin, M. (2016). Maintenance of meristem activity under stress: is there an interplay of RSS1-like proteins with the RBR pathway?. *Plant Biology*, *18*(2), 167-170.

El Felah, M., Gharbi, M. S., Ben Ghanem, H., & Elloumi, M. (2015). Les céréales en Tunisie entre mythe et réalité. *Annales de l'INRAT, 2ème Numéro Spécial Centenaire*, *88*, 1-17.

Eloy, N. B., Gonzalez, N., Van Leene, J., Maleux, K., Vanhaeren, H., De Milde, L., ... & Cromer, L. (2012). SAMBA, a plant-specific anaphase-promoting complex/cyclosome regulator is involved in early development and A-type cyclin stabilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(34), 13853-13858.

Eraslan, F., Inal, A., Gunes, A., & Alpaslan, M. (2007). Impact of exogenous salicylic acid on the growth, antioxidant activity and physiology of carrot plants subjected to combined salinity and boron toxicity. *Scientia horticulturae*, *113*(2), 120-128.

Erhardt, M., Stoppin-Mellet, V., Campagne, S., Canaday, J., Mutterer, J., Fabian, T., ... & Schmit, A. C. (2002). The plant Spc98p homologue colocalizes with γ-tubulin at microtubule nucleation sites and is required for microtubule nucleation. *J Cell Sci*, *115*(11), 2423-2431.

Feldman, M., Lupton, F.G.H., and Miller, T.E. (1995). Wheats. In Evolution of Crop Plants, 2nd ed, J. Smartt and N.W. Simmonds, eds (London: Longman Scientific), pp. 184–192.

Finn, R. D., Bateman, A., Clements, J., Coggill, P., Eberhardt, R. Y., Eddy, S. R., ... & Sonnhammer, E. L. (2013). Pfam: the protein families database. *Nucleic acids research*, *42*(D1), D222-D230.

Filichkin, S. A., Leonard, J. M., Monteros, A., Liu, P. P., & Nonogaki, H. (2004). A novel endo-β-mannanase gene in tomato LeMAN5 is associated with anther and pollen development. *Plant physiology*, 134(3), 1080-1087.

Flowers, T. J., Troke, P. F., & Yeo, A. R. (1977). The mechanism of salt tolerance in halophytes. *Annual review of plant physiology*, *28*(1), 89-121.

Francis, D. (2007). The plant cell cycle− 15 years on. *New Phytologist*, *174*(2), 261-278.

Francis, D. (2011). A commentary on the G2/M transition of the plant cell cycle. *Annals of botany*, *107*(7), 1065-1070.

Frigerio, M., Alabadí, D., Pérez-Gómez, J., García-Cárcel, L., Phillips, A. L., Hedden, P., & Blázquez, M. A. (2006). Transcriptional regulation of gibberellin metabolism genes by auxin signaling in Arabidopsis. *Plant Physiology*, *142*(2), 553-563.

Garnier, J. (1998). GOR secondary structure prediction method version IV. *Meth. Enzym., RF Doolittle Ed.*, *266*, 540-553.

Gate, P., Bouthier, A., & Monier, J. L. (1992). La tolérance à la sécheresse, une réalité à valoriser. *Perspectives in Agriculture*, *169*, 62-67.

Gaxiola, R. A., Fink, G. R., & Hirschi, K. D. (2002). Genetic manipulation of vacuolar proton pumps and transporters. *Plant Physiology*, *129*(3), 967-973.

Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant physiology and biochemistry*, *48*(12), 909-930.

Glotzer, M., Murray, A. W., & Kirschner, M. W. (1991). Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature*, *349*(6305), 132.

Guharoy, M., Szabo, B., Martos, S. C., Kosol, S., & Tompa, P. (2013). Intrinsic structural disorder in cytoskeletal proteins. *Cytoskeleton*, *70*(10), 550-571.

Haouala, F., Ferjani, H., & El Hadj, S. B. (2007). Effet de la salinité sur la répartition des cations (Na+, K+ et Ca2+) et du chlore (Cl-) dans les parties aériennes et les racines du ray-grass anglais et du chiendent. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, *11*(3), 235-244.

Hasegawa, P. M., Bressan, R. A., Zhu, J. K., & Bohnert, H. J. (2000). Plant cellular and molecular responses to high salinity. Annual review of plant biology, 51(1), 463-499.

Heroes, E., Lesage, B., Görnemann, J., Beullens, M., Van Meervelt, L., & Bollen, M. (2013). The PP1 binding code: a molecular-lego strategy that governs specificity. *The FEBS journal*, *280*(2), 584-595.

Hoekema, A., Hirsch, P. R., Hooykaas, P. J., & Schilperoort, R. A. (1983). A binary plant vector strategy based on separation of vir-and T-region of the Agrobacterium tumefaciens Ti-plasmid. *Nature*, *303*(5913), 179.

Holmes, K. C., Popp, D., Gebhard, W., & Kabsch, W. (1990). Atomic model of the actin filament. Nature, 347(6288), 44.

Horie, T., & Schroeder, J. I. (2004). Sodium transporters in plants. Diverse genes and physiological functions. *Plant Physiology*, *136*(1), 2457-2462.

Hsiao, T. C., Acevedo, E., Fereres, E., & Henderson, D. W. (1976). Water stress, growth and osmotic adjustment. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, *273*(927), 479-500.

Hu, Y., & Schmidhalter, U. (2005). Drought and salinity: a comparison of their effects on mineral nutrition of plants. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, *168*(4), 541-549.

Hutchins, J. R., Toyoda, Y., Hegemann, B., Poser, I., Hériché, J. K., Sykora, M. M., ... & Conrad, C. (2010). Systematic analysis of human protein complexes identifies chromosome segregation proteins. *Science*, *328*(5978), 593-599.

Inzé, D., & De Veylder, L. (2006). Cell cycle regulation in plant development. *Annu. Rev. Genet.*, *40*, 77-105.

Loio, R. D., Nakamura, K., Moubayidin, L., Perilli, S., Taniguchi, M., Morita, M. T., ... & Sabatini, S. (2008). A genetic framework for the control of cell division and differentiation in the root meristem. *Science*, *322*(5906), 1380-1384.

Janski, N., Herzog, E., & Schmit, A. C. (2008). Identification of a novel small Arabidopsis protein interacting with gamma-tubulin complex protein 3. *Cell biology international*, *32*(5), 546-548.

Janski, N., Masoud, K., Batzenschlager, M., Herzog, E., Evrard, J. L., Houlné, G., ... & Schmit, A. C. (2012). The GCP3-interacting proteins GIP1 and GIP2 are required for γ-tubulin complex protein localization, spindle integrity, and chromosomal stability. *The Plant Cell*, *24*(3), 1171-1187.

Javid, M. G., Sorooshzadeh, A., Moradi, F., Modarres Sanavy, S. A. M., & Allahdadi, I. (2011). The role of phytohormones in alleviating salt stress in crop plants. *Australian Journal of Crop Science*, *5*(6), 726.

Johnston, J. R. 1988. In Yeast, a practical approach. (Eds: I. Campbell et J. H. Duffus) IRL Press, 107-123.

Juraniec, M., Heyman, J., Schubert, V., Salis, P., De Veylder, L., & Verbruggen, N. (2016). Arabidopsis COPPER MODIFIED RESISTANCE1/PATRONUS1 is essential for growth adaptation to stress and required for mitotic onset control. *New Phytologist*, *209*(1), 177-191.

Juraniec, M., Lequeux, H., Hermans, C., Willems, G., Nordborg, M., Schneeberger, K., ... & Verbruggen, N. (2014). Towards the discovery of novel genetic component involved in stress

resistance in Arabidopsis thaliana. *New phytologist*, *201*(3), 810-824.

Kaplan, B., Davydov, O., Knight, H., Galon, Y., Knight, M. R., Fluhr, R., & Fromm, H. (2006). Rapid transcriptome changes induced by cytosolic Ca2+ transients reveal ABRE-related sequences as Ca2+-responsive cis elements in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 18(10), 2733-2748.

Kazan, K. (2013). Auxin and the integration of environmental signals into plant root development. *Annals of botany*, *112*(9), 1655-1665.

Kim, D. W., Lee, S. H., Choi, S. B., Won, S. K., Heo, Y. K., Cho, M., & Cho, H. T. (2006). Functional conservation of a root hair cell-specific cis-element in angiosperms with different root hair distribution patterns. *The Plant Cell*, 18(11), 2958-2970.

Kollman, J. M., Merdes, A., Mourey, L., & Agard, D. A. (2011). Microtubule nucleation by γ-tubulin complexes. *Nature reviews Molecular cell biology*, *12*(11), 709.

Komaki, S., & Schnittger, A. (2017). The Spindle Assembly Checkpoint in Arabidopsis Is Rapidly Shut Off during Severe Stress. *Developmental cell*, *43*(2), 172-185.

Kurihara, D., Matsunaga, S., Uchiyama, S., & Fukui, K. (2008). Live cell imaging reveals plant aurora kinase has dual roles during mitosis. *Plant and cell physiology*, *49*(8), 1256-1261.

Kurotani, K. I., Hayashi, K., Hatanaka, S., Toda, Y., Ogawa, D., Ichikawa, H., ... & Hattori, T. (2015). Elevated levels of CYP94 family gene expression alleviate the jasmonate response and enhance salt tolerance in rice. *Plant and Cell Physiology*, *56*(4), 779-789.

Laemmli, U. K. (1970). SDS-page Laemmli method. *Nature*, *227*, 680-5.

Lau, S., Jürgens, G., & De Smet, I. (2008). The evolving complexity of the auxin pathway. The Plant Cell, 20(7), 1738-1746.

Leegood, R. C., Lea, P. J., Adcock, M. D., & Häusler, R. E. (1995). The regulation and control of photorespiration. *Journal of Experimental Botany*, 1397-1414.

Lev-Yadun, S., Gopher, A., & Abbo, S. (2000). The cradle of agriculture. *Science*, *288*(5471), 1602-1603.

Li S, & Assmann, S. M. (2010). Genetic determinants of stomatal function. In Genes for Plant Abiotic Stress. Matthew A. Jenks and Andrew J. Wood.Blackwell Publishing, Iowa, USA. 1-33

Li, Z. G., Ding, X. J., & Du, P. F. (2013). Hydrogen sulfide donor sodium hydrosulfide-improved heat tolerance in maize and involvement of proline. *Journal of plant physiology*, *170*(8), 741-747.

Liu, B., Marc, J., Joshi, H. C., & Palevitz, B. A. (1993). A gamma-tubulin-related protein associated with the microtubule arrays of higher plants in a cell cycle-dependent manner. *Journal of Cell Science*, *104*(4), 1217-1228.

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2− ΔΔCT method. *methods*, *25*(4), 402-408.

Livanos, P., Galatis, B., & Apostolakos, P. (2014). The interplay between ROS and tubulin cytoskeleton in plants. *Plant signaling & behavior*, *9*(3), e28069.

Luo, M., Liu, J. H., Mohapatra, S., Hill, R. D., & Mohapatra, S. S. (1992). Characterization of a gene family encoding abscisic acid-and environmental stress-inducible proteins of alfalfa. *Journal of Biological Chemistry*, *267*(22), 15367-15374.

Lüscher, B., & Eisenman, R. N. (1990). New light on Myc and Myb. Part I. Myc. *Genes & Development*, 4(12a), 2025-2035.

Maas, E. V., & Poss, J. A. (1989). Salt sensitivity of wheat at various growth stages. *Irrigation Science*, *10*(1), 29-40.

Maathuis, F. J., & Amtmann, A. N. N. A. (1999). K+ nutrition and Na+ toxicity: the basis of cellular K+/Na+ ratios. *Annals of Botany*, *84*(2), 123-133.

Mahajan, S., & Tuteja, N. (2005). Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives of biochemistry and biophysics*, *444*(2), 139-158.

Mahajan, S., Pandey, G. K., & Tuteja, N. (2008). Calcium-and salt-stress signaling in plants: shedding light on SOS pathway. *Archives of biochemistry and biophysics*, *471*(2), 146-158.

Mahjoubi, H., Ebel, C., & Hanin, M. (2015). Molecular and functional characterization of the durum wheat TdRL1, a member of the conserved Poaceae RSS1-like family that exhibits features of intrinsically disordered proteins and confers stress tolerance in yeast. *Functional & integrative genomics*, *15*(6), 717-728.

Masoud, K., Herzog, E., Chabouté, M. E., & Schmit, A. C. (2013). Microtubule nucleation and establishment of the mitotic spindle in vascular plant cells. *The Plant Journal*, *75*(2), 245-257.

Mészáros, T., Miskolczi, P., Ayaydin, F., Pettkó-Szandtner, A., Peres, A., Magyar, Z., ... & Dudits, D. (2000). Multiple cyclin-dependent kinase complexes and phosphatases control G 2/M progression in alfalfa cells. *In The Plant Cell Cycle* (pp. 51-61). Springer, Dordrecht.

Miller, G., Shulaev, V., & Mittler, R. (2008). Reactive oxygen signaling and abiotic stress. *Physiologia Plantarum*, *133*(3), 481-489.

Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in plant science*, *7*(9), 405-410.

Mizukami, Y., & Fischer, R. L. (2000). Plant organ size control: AINTEGUMENTA regulates growth and cell numbers during organogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(2), 942-947.

Moons, A., Prinsen, E., Bauw, G., & Van Montagu, M. (1997). Antagonistic effects of abscisic acid and jasmonates on salt stress-inducible transcripts in rice roots. *The Plant Cell*, *9*(12), 2243-2259.

Munns, R. (2005). Genes and salt tolerance: bringing them together. *New phytologist*, *167*(3), 645-663.

Munns, R., & Rawson, H. M. (1999). Effect of salinity on salt accumulation and reproductive development in the apical meristem of wheat and barley. *Functional Plant Biology*, *26*(5), 459-464.

Munns, R., & Tester, M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.*, *59*, 651-681.

Murata, T., Sonobe, S., Baskin, T. I., Hyodo, S., Hasezawa, S., Nagata, T., ... & Hasebe, M. (2005). Microtubule-dependent microtubule nucleation based on recruitment of γ-tubulin in higher plants. Nature Cell Biology, 7(10), 961.

Nachit, M., Picard, E., Monneveux, P., Labhilili, M., Baum, M., & Rivoal, R. (1998). Présentation d'un programme international d'amélioration du blé dur pour le bassin méditerranéen. *Cahiers Agricultures*, *7*(6), 510-515.

Nagata, T., Nemoto, Y., & Hasezawa, S. (1992). Tobacco BY-2 cell line as the “HeLa” cell in the cell biology of higher plants. In *International Review of Cytology* (Vol. 132, pp. 1-30). Academic Press.

Nakamura, M., Ehrhardt, D. W., & Hashimoto, T. (2010). Microtubule and katanin-dependent dynamics of microtubule nucleation complexes in the acentrosomal Arabidopsis cortical array. *Nature Cell Biology*, *12*(11), 1064.

Nakamura, M., Yagi, N., Kato, T., Fujita, S., Kawashima, N., Ehrhardt, D. W., & Hashimoto, T. (2012). Arabidopsis GCP3-interacting protein 1/MOZART 1 is an integral component of the γ-tubulin-containing microtubule nucleating complex. *The plant journal*, *71*(2), 216-225.

Narayanan, A., & Jacobson, M. P. (2009). Computational studies of protein regulation by post-translational phosphorylation. *Current opinion in structural biology*, 19(2), 156-163.

Neill, S., Barros, R., Bright, J., Desikan, R., Hancock, J., Harrison, J., ... & Wilson, I. (2008). Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress. *Journal of experimental botany*, *59*(2), 165-176.

Nieuwland, J., Menges, M., & Murray, J. A. (2008). 2 The plant cyclins. *Annual Plant Reviews, Cell Cycle Control and Plant Development*, 32, 31.

Niu, L., & Liao, W. (2016). Hydrogen peroxide signaling in plant development and abiotic responses: crosstalk with nitric oxide and calcium. *Frontiers in plant science*, 7, 230.

Nishiuchi, T., Shinshi, H., & Suzuki, K. (2004). Rapid and transient activation of transcription of the ERF3 Gene by Wounding in Tobacco Leaves POSSIBLE INVOLVEMENT OF NtWRKYs AND

AUTOREPRESSION. *Journal of Biological Chemistry*, 279(53), 55355-55361.

Nxele, X., Klein, A., & Ndimba, B. K. (2017). Drought and salinity stress alters ROS accumulation, water retention, and osmolyte content in sorghum plants. *South African Journal of Botany*, *108*, 261-266.

Oegema, K., Wiese, C., Martin, O. C., Milligan, R. A., Iwamatsu, A., Mitchison, T. J., & Zheng, Y. (1999). Characterization of two related Drosophila γ-tubulin complexes that differ in their ability to nucleate microtubules. *The Journal of cell biology*, *144*(4), 721-733.

Ogawa, D., Abe, K., Miyao, A., Kojima, M., Sakakibara, H., Mizutani, M., ... & Hattori, T. (2011). RSS1 regulates the cell cycle and maintains meristematic activity under stress conditions in rice. *Nature communications*, *2*, 278.

Ogawa, D., Morita, H., Hattori, T., & Takeda, S. (2012). Molecular characterization of the rice protein RSS1 required for meristematic activity under stressful conditions. *Plant physiology and biochemistry*, *61*, 54-60.

Park, H. C., Kim, M. L., Kang, Y. H., Jeon, J. M., Yoo, J. H., Kim, M. C., & Yoon, H. W. (2004). Pathogen-and NaCl-induced expression of the SCaM-4 promoter is mediated in part by a GT-1 box that interacts with a GT-1-like transcription factor. *Plant physiology*, 135(4), 2150-2161.

Pazos, F., Pietrosemoli, N., García-Martín, J. A., & Solano, R. (2013). Protein intrinsic disorder in plants. *Frontiers in plant science*, 4, 363.

Pasternak, T. P., Ötvös, K., Domoki, M., & Fehér, A. (2007). Linked activation of cell division and oxidative stress defense in alfalfa leaf protoplast-derived cells is dependent on exogenous auxin. *Plant Growth Regulation*, 51(2), 109-117.

Pedranzani, H., & Vigliocco, A. (2017). Regulation of jasmonic acid and salicylic acid levels in abiotic stress tolerance: past and present. *Singh VP, Singh S., Prasad SM, editors.(New York, NY: Nova Science Publishers*, 329-370.

Pettkó-Szandtner, A., Mészáros, T., Horváth, G. V., Bakó, L., Csordás-Tóth, É., Blastyák, A., ... & Dudits, D. (2006). Activation of an alfalfa cyclin-dependent kinase inhibitor by calmodulin-like domain protein kinase. *The Plant Journal*, 46(1), 111-123.

Pietrosemoli, N., García-Martín, J. A., Solano, R., & Pazos, F. (2013). Genome-wide analysis of protein disorder in Arabidopsis thaliana: implications for plant environmental adaptation. *PLoS One*, 8(2), e55524.

Radivojac, P., Vacic, V., Haynes, C., Cocklin, R. R., Mohan, A., Heyen, J. W., ... & Iakoucheva, L. M. (2010). Identification, analysis, and prediction of protein ubiquitination sites. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, *78*(2), 365-380.

Ross, E. J., Stone, J. M., Elowsky, C. G., Arredondo-Peter, R., Klucas, R. V., & Sarath, G. (2004). Activation of the Oryza sativa non-symbiotic haemoglobin-2 promoter by the cytokinin-regulated transcription factor, ARR1. *Journal of experimental botany*, 55(403), 1721-1731.

Roy, M., Sivan-Loukianova, E., & Eberl, D. F. (2013). Cell-type–specific roles of Na+/K+ ATPase subunits in Drosophila auditory mechanosensation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(1), 181-186.

Rushton, P. J., Reinstädler, A., Lipka, V., Lippok, B., & Somssich, I. E. (2002). Synthetic plant promoters containing defined regulatory elements provide novel insights into pathogen-and wound-induced signaling. *The Plant Cell*, 14(4), 749-762.

Ryu, H., & Cho, Y. G. (2015). Plant hormones in salt stress tolerance. *Journal of Plant Biology*, *58*(3), 147-155.

Sah, S. K., Reddy, K. R., & Li, J. (2016). Abscisic acid and abiotic stress tolerance in crop plants. *Frontiers in plant science*, *7*, 571.

Sairam, R. K., & Tyagi, A. (2004). Physiological and molecular biology of salinity stress tolerance in deficient and cultivated genotypes of chickpea. *Plant Growth Regul*, *57*(10).

Sánchez-Calderón, L., Ibarra-Cortés, M. E., & Zepeda-Jazo, I. (2013). Root development and abiotic stress adaptation. In *Abiotic Stress-Plant Responses and Applications in Agriculture*. InTech.

Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods*, *9*(7), 671.

Scofield, S., Jones, A., & Murray, J. A. (2014). The plant cell cycle in context. *Journal of experimental botany*, *65*(10), 2557-2562.

Sekine, M., Ito, M., Uemukai, K., Maeda, Y., Nakagami, H., & Shinmyo, A. (1999). Isolation and characterization of the E2F-like gene in plants. *FEBS letters*, *460*(1), 117-122.

Shi, H., Ishitani, M., Kim, C., & Zhu, J. K. (2000). The Arabidopsis thaliana salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na+/H+ antiporter. *Proceedings of the national academy of sciences*, 97(12), 6896-6901.

Singh, B. D. (2015). Plant breeding: principles and methods. *Kalyani publishers*.

Solano, R., Stepanova, A., Chao, Q., & Ecker, J. R. (1998). Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1. *Genes & development*, 12(23), 3703-3714.

Sparkes, I. A., Runions, J., Kearns, A., & Hawes, C. (2006). Rapid, transient expression of fluorescent fusion proteins in tobacco plants and generation of stably transformed plants. *Nature protocols*, *1*(4), 2019.

Stepanova, A. N., Hoyt, J. M., Hamilton, A. A., & Alonso, J. M. (2005). A link between ethylene and auxin uncovered by the characterization of two root-specific ethylene-insensitive mutants in

Arabidopsis. *The Plant Cell*, *17*(8), 2230-2242.

Stockinger, E. J., Gilmour, S. J., & Thomashow, M. F. (1997). Arabidopsis thaliana CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *94*(3), 1035-1040.

Takahashi, S., Katagiri, T., Hirayama, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (2001). Hyperosmotic stress induces a rapid and transient increase in inositol 1, 4, 5-trisphosphate independent of abscisic acid in Arabidopsis cell culture. *Plant and Cell Physiology*, *42*(2), 214-222.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution*, *28*(10), 2731-2739.

Tapia, G., Verdugo, I., Yañez, M., Ahumada, I., Theoduloz, C., Cordero, C., & Ruiz-Lara, S. (2005). Involvement of ethylene in stress-induced expression of the TLC1. 1 retrotransposon from Lycopersicon chilense Dun. *Plant Physiology*, 138(4), 2075-2086.

Terzaghi, W. B., & Cashmore, A. R. (1995). Light-regulated transcription. *Annual review of plant biology*, 46(1), 445-474.

Tjaden, G., Edwards, J. W., & Coruzzi, G. M. (1995). Cis elements and trans-acting factors affecting regulation of a nonphotosynthetic light-regulated gene for chloroplast glutamine synthetase. *Plant physiology*, 108(3), 1109-1117.

Tomaštíková, E., Demidov, D., Jeřábková, H., Binarová, P., Houben, A., Doležel, J., & Petrovská, B. (2015). TPX2 protein of Arabidopsis activates Aurora kinase 1, but not Aurora kinase 3 in vitro. *Plant molecular biology reporter*, *33*(6), 1988-1995.

Udvardi, M. K., Czechowski, T., & Scheible, W. R. (2008). Eleven golden rules of quantitative RT-PCR. *The Plant Cell*, *20*(7), 1736-1737.

Ulmasov, T., Liu, Z. B., Hagen, G., & Guilfoyle, T. J. (1995). Composite structure of auxin response elements. *The Plant Cell*, 7(10), 1611-1623.

Vandepoele, K., Raes, J., De Veylder, L., Rouzé, P., Rombauts, S., & Inzé, D. (2002). Genome-wide analysis of core cell cycle genes in Arabidopsis. *The Plant Cell*, *14*(4), 903-916.

Vanhaeren, H., Gonzalez, N., Coppens, F., De Milde, L., Van Daele, T., Vermeersch, M., & Inzé, D. (2014). Combining growth-promoting genes leads to positive epistasis in Arabidopsis thaliana. *Elife*, 3, e02252.

Vanstraelen, M., & Benková, E. (2012). Hormonal interactions in the regulation of plant development. *Annual review of cell and developmental biology*, *28*, 463-487.

Vernoux, T., Besnard, F., & Traas, J. (2010). Auxin at the shoot apical meristem. Cold Spring

Harbor *Perspectives in Biology*, a001487.

Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P., & Baulcombe, D. (2003). Retracted: an enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *The Plant Journal*, *33*(5), 949-956.

Vos, J. W., Pieuchot, L., Evrard, J. L., Janski, N., Bergdoll, M., de Ronde, D., & Schmit, A. C. (2008). The plant TPX2 protein regulates prospindle assembly before nuclear envelope breakdown. *The Plant Cell*, *20*(10), 2783-2797.

Wang, S., Kurepa, J., Hashimoto, T., & Smalle, J. A. (2011). Salt stress–induced disassembly of Arabidopsis cortical microtubule arrays involves 26S proteasome–dependent degradation of SPIRAL1. *The Plant Cell*, 23(9), 3412-3427.

Wang, Y., Wang, T., Li, K., & Li, X. (2008). Genetic analysis of involvement of ETR1 in plant response to salt and osmotic stress. *Plant Growth Regulation*, 54(3), 261-269.

Wani, S. H., Kumar, V., Shriram, V., & Sah, S. K. (2016). Phytohormones and their metabolic engineering for abiotic stress tolerance in crop plants. *The Crop Journal*, *4*(3), 162-176.

Weimer, A. K., Demidov, D., Lermontova, I., Beeckman, T., & Van Damme, D. (2016). Aurora kinases throughout plant development. *Trends in plant science*, *21*(1), 69-79.

Wenkel, S., Turck, F., Singer, K., Gissot, L., Le Gourrierec, J., Samach, A., & Coupland, G. (2006). CONSTANS and the CCAAT box binding complex share a functionally important domain and interact to regulate flowering of Arabidopsis. *The Plant Cell*, 18(11), 2971-2984.

West, G., Inzé, D., & Beemster, G. T. (2004). Cell cycle modulation in the response of the primary root of Arabidopsis to salt stress. *Plant physiology*, *135*(2), 1050-1058.

Williams, P. H., Margules, C. R., & Hilbert, D. W. (2002). Data requirements and data sources for biodiversity priority area selection. *Journal of biosciences*, *27*(4), 327-338.

Wright, P. E., & Dyson, H. J. (1999). Intrinsically unstructured proteins: re-assessing the protein structure-function paradigm. *Journal of molecular biology*, *293*(2), 321-331.

Wu, X., & Tatchell, K. (2001). Mutations in yeast protein phosphatase type 1 that affect targeting subunit binding. *Biochemistry*, *40*(25), 7410-7420.

Yamaguchi, T., & Blumwald, E. (2005). Developing salt-tolerant crop plants: challenges and opportunities. *Trends in plant science*, *10*(12), 615-620.

Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (1994). A novel cis-acting element in an Arabidopsis gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *The Plant Cell*, *6*(2), 251-264.

Zamariola, L., Storme, N., Vannerum, K., Vandepoele, K., Armstrong, S. J., Franklin, F. C. H., &

Geelen, D. (2014). SHUGOSHINs and PATRONUS protect meiotic centromere cohesion in Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal*, *77*(5), 782-794.

Zhang, Z. L., Xie, Z., Zou, X., Casaretto, J., Ho, T. H. D., & Shen, Q. J. (2004). A rice WRKY gene encodes a transcriptional repressor of the gibberellin signaling pathway in aleurone cells. *Plant Physiology*, 134(4), 1500-1513.

Zhiponova, M. K., Pettkó-Szandtner, A., Stelkovics, É., Neer, Z., Bottka, S., Krenács, T., ... & Szilák, L. (2006). Mitosis-specific promoter of the alfalfa cyclin-dependent kinase gene (Medsa; CDKB2; 1) is activated by wounding and ethylene in a non-cell division-dependent manner. *Plant physiology*, *140*(2), 693-703.

Zhu, J. K. (2003). Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Current opinion in plant biology*, *6*(5), 441-445.

Annexes

Annexe 1 : Prédiction des sites de phosphorylation chez RSS1, PANS1 et TdRL1. . Recherche des sites de phosphorylation par les différentes kinases en utilisant les logiciels PPSP et NetPhos2. Les aa marquées en rouge présente les sites identifiés les plus conservée

	Position	Kinase	Peptide	Score	Threshold	Risk-Diff.
TdRL1	34	AURORA-A	PLKPSAKPS	0.978	2.8	5.26
	38	AURORA-A	SAKPSARKA	0.917	2.8	2.96
	47	AMPK	LRDVSNTSK	0.839	3.3	5.65
	49	NIMA	DVSNTSKPQ	0.808	0.6	0.63
	50	CAK	VSNTSKPQA	0.870	0.1	0.24
	77	ATM	SALRSQEAI	0.986	3.5	5.71
	87	AMPK	KNPLSKTTI	0.606	3.3	3.97
	184	AMPK	SGRLSISGD	0.996	3.3	3.83
		AURORA-A	SGRLSISGD		2.8	6.47
		AURORA-B	SGRLSISGD		3.2	6.32
	186	AMPK	RLSISGDKA	0.700	3.3	4.54
	193	CAK	KAKLTEDSF	0.558	0.1	0.47
RSS1	53	AMPK	LRDVSNIGK	0.824	3.3	5.32
		AURORA-B			3.2	4.98
	81	AMPK	GRNISDGTT	0.951	3.3	6.65
		ATM			3.5	4.57
	97	AURORA-A	SHEATKNPV	0.536	2.8	3.07
		CAK			0.1	1.08
	108	CAK	TVIFSDETA	0.933	0.1	0.83
	132	ATM	TGNDSQKLE	0.973	3.5	5.11
	198	AURORA-A	NRRRSSSGD	0.997	2.8	9.29
		AURORA-B			3.2	8.76
		AMPK			3.3	7.36
	199	AURORA-A	RRRSSSGDK	0.998	2.8	6.57
		AURORA-B			3.2	3.83
		AMPK			3.3	7.54
	200	AMPK	RRSSSGDKM	0.994	3.3	7.02
	212	CAK	EDPFTEDEL	0.528	0.1	1.34
PANS1	24	AMPK	HRKKSVTAA	0.995	3.3	4.85
		AURORA-A	HRKKSVTAA		2.8	7.14
		AURORA-B	HRKKSVTAA		3.2	6.83
	29	CK1	VTAASVKSK	0.981	1.2	1.88
		NIMA	VTAASVKSK		0.6	1.20
	56	AURORA-B	ITNKSGIHA	0.763	3.2	3.34
		NIMA	ITNKSGIHA		0.6	1.39
	65	CK1	KAAASSKNK	0.965	1.2	1.77
		NIMA	KAAASSKNK		0.6	1.15
	117	CAM-II	HHGSSIKEK	0.984	3.6	4.29
	161	CAK	TPWRSPIRH	0.963	0.1	2.73
	167	CAM-II	IRHGSMMPS		3.6	4.61
	180	CAK	WRFDSCEFT	0.906	0.1	0.49
		CAM-II	WRFDSCEFT		3.6	4.02

Université de Strasbourg

École Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé STRASBOURG

Habib Mahjoubi

Nouvelle Stratégie d'Amélioration de la productivité végétale en conditions de stress environnemental via un meilleur contrôle du cycle cellulaire

Résumé en Français :

Le stress salin est l'un des principaux facteurs environnementaux limitant la croissance des plantes et entraînant des pertes de rendement des cultures céréalières. Il est ainsi impératif de développer des variétés plus tolérantes à la salinité afin d'augmenter leurs rendements et assurer la sécurité alimentaire. La voie signalétique reliant la perception du stress salin à la réponse cellulaire, encore peu connue, a été abordée ici par l'étude des protéines RSS1-like conservées chez les plantes. La protéine RSS1 (Rice Salt Sensitive 1) du riz joue un rôle primordial dans la tolérance au stress salin en agissant à l'interface entre la perception des stress et le contrôle du développement et de la division dans les méristèmes. Lors de ce travail, l'homologue de RSS1 nommé TdRL1 (Triticum durum RSS-Like 1) a été isolé à partir de la variété tunisienne de blé dur "Oum Rabiaa". Nous avons démontré que TdRL1 porte les motifs D et DEN-Box conservés impliqués dans la régulation post-traductionnelle de la protéine. En outre nous avons apporté la preuve que TdRL1 est l'homologue fonctionnel de RSS1 puisqu'il est capable de complémenter le mutant de perte de fonction rss1, hypersensible au stress salin. En outre, l'expression hétérologue de TdRL1 améliore la tolérance au stress salin chez la levure ainsi que chez Arabidopsis et ce par l'augmentation du pouvoir germinatif et la réduction de l'accumulation des espèces oxygénées réactives. Nos études cytologiques ont montré que la protéine TdRL1 est cytoplasmique en interphase et se localise au niveau des microtubules kinétochoriens pendant la mitose. Remarquablement, TdRL1 change de localisation cellulaire sous stress salin et montre une accumulation partielle dans le noyau, soulignant le caractère multifonctionnel de cette protéine dans la réponse au stress salin. L'ensemble des données suggère que sous contrainte saline, TdRL1 joue un rôle dans la régulation du cycle cellulaire en relation avec le réseau microtubulaire. L'étude de la famille RSS1-like multifonctionnelle permettra ainsi d'aborder de nouvelles voies de recherche pour la création variétale de blé plus résilientes aux stress de l'environnement.

Mots-clés : RSS-like, TdRL1, Stress salin, cycle cellulaire, ROS, blé

Résumé en Anglais :

Salt stress is one of the main environmental factors limiting plant growth and yield in cereal crops. It is therefore imperative to develop varieties more tolerant to salt stress in order to increase yield and ensure food security. The signaling pathway linking salt stress perception to cellular response was addressed here by studying RSS1-like proteins in plants. RSS1 (Rice Salt Sensitive 1) protein plays an important role in salt stress tolerance. It acts at the interface of stress perception and developmental control and division in meristems. During this work, the RSS1 counterpart named TdRL1 (Triticum durum RSS-Like 1) was isolated from the durum wheat Tunisian variety "Oum Rabiaa". We have demonstrated that TdRL1 carries the conserved D and DEN-Box motifs involved in the post-translational regulation of the protein. In addition, we show that TdRL1 is the functional homologue of RSS1 since it was able to complement the loss-of-function mutant rss1, hypersensitive to salt stress. In addition, heterologous expression of TdRL1 enhances salt stress tolerance in yeast and in Arabidopsis by increasing germination and reducing the accumulation of reactive oxygen species. Our cytological studies have shown that the TdRL1 protein is cytoplasmic in interphase and is localized at the spindle during mitosis. Remarkably, TdRL1 changes its subcellular localization under salt stress treatment and shows a partial accumulation in the nucleus, highlighting the multifunctional nature of this protein during salt stress response. Our data suggest that under salt stress, TdRL1 plays a role in the regulation of the cell cycle in relation with the microtubule network. Pursuing the study of RSS1-like multifunctional proteins will open up new research areas for the creation of wheat varieties that are more resilient to environmental stresses.

Keywords : RSS-Like, TdRL1, Salt stress, Cell cycle, ROS, wheat