



HAL
open science

**La famille de transporteurs de monosaccharides
ERD6-like (Early Response to Dehydration six-like) :
émergence, évolution chez les plantes terrestres et
réponses au déficit hydrique dans les feuilles
d'*Arabidopsis thaliana***

Lucie Slawinski

► **To cite this version:**

Lucie Slawinski. La famille de transporteurs de monosaccharides ERD6-like (Early Response to Dehydration six-like) : émergence, évolution chez les plantes terrestres et réponses au déficit hydrique dans les feuilles d'*Arabidopsis thaliana*. Biologie végétale. Université de Poitiers, 2017. Français. NNT : 2017POIT2310 . tel-03193870

HAL Id: tel-03193870

<https://theses.hal.science/tel-03193870>

Submitted on 9 Apr 2021

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.

THESE

Pour l'obtention du Grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE POITIERS

Faculté des Sciences Fondamentales et Appliquées
Diplôme National - Arrêté du 25 mai 2016

Ecole Doctorale Sciences pour l'Environnement Gay Lussac

Secteur de Recherche : Biologie des Organismes ; Biotechnologies Animales, Végétales et
Microbiennes

Présentée par :

Lucie SLAWINSKI

La famille de transporteurs de monosaccharides ERD6-like (Early Response to Dehydration six-like) : émergence, évolution chez les plantes terrestres et réponses au déficit hydrique dans les feuilles d'*Arabidopsis thaliana*

Directrices de Thèse :

Maryse LALOI

Fabienne DEDALDECHAMP

Rossitza ATANASSOVA

Soutenu le 15 Décembre 2017 devant la Commission d'Examen

JURY

Soulaiman SAKR	Professeur, Université d'Angers	Rapporteur
Thierry SIMONNEAU	Directeur de recherche, INRA Montpellier	Rapporteur
Clément GILBERT	Chargé de recherche, CNRS Gif-sur-Yvette	Examineur
Maryse LALOI	Maître de conférences, Université de Poitiers	Examineur
Fabienne DEDALDECHAMP	Maître de conférences, Université de Poitiers	Examineur
Rossitza ATANASSOVA	Professeur, Université de Poitiers	Examineur

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier Soulaïman Sakr et Thierry Simonneau de m'avoir fait l'honneur d'évaluer mon manuscrit et mon travail de thèse en tant que rapporteurs. Je remercie aussi Clément Gilbert d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse.

J'adresse également mes remerciements à Richard Cordaux, Jean-Louis Durand d'avoir participé à mon comité de thèse. Merci pour vos conseils, vos retours sur le travail effectué, et pour la discussion constructive que nous avons pu avoir à cette occasion.

Merci tout particulièrement à toi Richard, de m'avoir aidé dans l'appropriation de mon sujet de thèse, dont le côté « évolution » m'était peu familier au départ. Je pense et j'espère avoir fait beaucoup de progrès depuis, en partie grâce à tes conseils et tes explications claires.

Je remercie Rossitza Atanassova et Didier Bouchon de m'avoir accueilli au sein de l'équipe SEVE et du laboratoire EBI.

Merci beaucoup à mes trois directrices de thèse Maryse Laloi, Fabienne Dédaldéchamp et Rossitza Atanassova, de m'avoir accordé votre confiance et de m'avoir permis de mener à bien mon travail de thèse.

Maryse, merci pour ton implication et ton aide précieuse tout au long de ma thèse ainsi que pour l'intérêt très visible que tu as pour la recherche et pour la science en général. Cela m'a souvent poussé à aller plus loin dans ma démarche scientifique. Merci d'avoir accepté que je reste dans ton bureau durant 2 ans et demi, j'y étais bien. Même si ce n'est pas de tout repos, je garde un bon souvenir de notre petite escapade en République Tchèque, pour mon premier congrès international, ma première bière à Prague, et mes premiers (et derniers !) knedliky. Fabienne, merci pour ta bonne humeur, tes encouragements qui tombent toujours à pic et la facilité avec laquelle tu réussis à me remonter le moral lorsque la fatigue s'installe. Merci aussi pour toutes tes petites astuces, tes petits « trucs » pour me rendre la tâche moins fastidieuse, qui m'ont bien servis surtout pendant la période de réaction de thèse. Et aussi merci pour ton aide durant ces 3 années. Merci à toutes les deux d'avoir passé des dimanche matin avec moi au labo à couper, photographier, peser et congeler des centaines de plantes.

Merci à Vincent Lebeurre de m'avoir aidé dans la préparation des mes cultures de plantes. Vincent, merci de l'œil attentif que tu as pu porter sur mes plantes. Merci aussi de ta gentillesse et de ta sympathie que j'ai tout particulièrement apprécié.

Merci à Bruno Faure pour son aide très précieuse en ce qui concerne les tâches essentielles au bon fonctionnement technique du travail de laboratoire.

Merci à Florence Thibault et Caroline Paillot pour leur aide technique, surtout les jours où 6 bras étaient nécessaires. Flo, merci de ton super boulot sur la partie microscopie et merci d'avoir mis à profit ton expérience dans ce domaine pour mon travail de thèse. Et merci pour les butternut qui sont en fait de délicieuses courges musquées. Caro, merci pour ton aide et ton travail très consciencieux et rapide. Nos échanges ont été un réel plaisir et j'ai apprécié votre compagnie à toutes les deux.

Merci à Armand Vergnault et Mathilde Aimé pour l'enthousiasme dont ils ont fait preuve lors de leur stage de Licence 3. Vous avez été efficaces et d'une aide précieuse pour mon travail de thèse. Ce fut un plaisir de travailler avec vous. Je vous souhaite une bonne continuation.

Merci aux collègues thésards, les anciens (Mickaël, Florian, Jo, Chloé) et les nouveaux (Nils, Antoine, Abir), de leur sympathie. Je souhaite bien du courage à Nils, Antoine et Abir pour la fin de leur thèse. Chloé, nos bavardages en cette période de fin de thèse ont plus que jamais été les bienvenus.

Je remercie l'ensemble des membres de l'équipe SEVE pour leur gentillesse et nos échanges.

Enfin, un énorme merci à toute ma famille. Vous avez toujours été là pour moi et êtes, même si vous êtes loin, d'un soutien sans faille. Je pense tout particulièrement à mes parents qui m'ont aidé (à plusieurs niveaux) depuis le début de mes longues études. Merci à mon petit frère Rémi, juste d'être là.

Jonathan, merci pour TOUT, pour ta patience, ton soutien, ta gentillesse et ton amour. Que de jolis projets, déjà commencés, vont maintenant pouvoir prendre forme.

Liste des abréviations

ABA : acide abscissique

ADN : acide désoxyribonucléase

ADNc : ADN codant

ADNg : ADN génomique

ADN-T : ADN de transfert

ARN : acide ribonucléique

ATP : adénosine triphosphate

BLAST : basic local alignment search tool

BLASTp : BLAST protein

bp : base pair

CDS : coding sequence

CS : conductance stomatique

DDC : duplication dégénérescence complémentation

DDI : duplication dégénérescence innovation

DMSO : diméthylsulfoxyde

dN/dS : taux de substitutons nucléotidiques non synonymes par rapport au taux de substituions nucléotidiques synonymes

DNase : désoxyribonucléase

dNTP : désoxynucléotide 5'-triphosphate

EAC : escape for adaptative conflict

EDTA : ethylène diamine trétra-acéique

ERD6-like : early response to dehydration 6 – like

EST : expressed sequence tag

FRU : fructose

GLC : glucose

GO : gene ontology

HK : hexokinase

INT : inositol transporter

Jv : flux d'eau

K-Pg : jonction Crétacé - Paléogène

Ma : millions d'années

MF : masse fraiche

MFS : major facilitator superfamily
MS : masse sèche
MST : monosaccharide transporter
MT : masse turgide
NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NHEJ : non homologous end joining
ORF : open reading frame
PCR : polymerase chain reaction
PGI : phosphoglucoisomerase
pGIT : plastidic glucose transporter
PLT : polyol transporter
PMT : polyol monosaccharide
ROS : reactive oxygen species
Rubisco : ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase oxygénase
RT-qPCR : real time quantitative polymerase chain reaction
SDS : dodécyl sulfate de sodium
SFp : surface foliaire projetée
STP : sugar transporter protein
Sac : saccharose
SNP : single nucleotide polymorphism
SUC : sucrose carrier
SUT : sucrose transporter
SWEET : sugar will eventually be exported transporter
TAE : tris, acétate, edta
TE : teneur en eau
TRE : teneur relative en eau
TMT : tonoplastic monosaccharide transporter
VGT : vacuolar glucose transporter
WGD : whole genome duplication

Table des matières

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	1
1 La production et le transport des sucres dans la plante.....	2
1.1 Transport de sucres à longue distance.....	2
1.1.1 Le chargement du saccharose dans le phloème	3
1.1.2 Le transport longitudinal du saccharose dans le phloème	4
1.1.3 Le déchargement du phloème.....	4
1.2 Les transporteurs de sucres	5
1.2.1 Les transporteurs de la famille SWEET.....	5
1.2.2 Les transporteurs de la Major Facilitator Superfamily	6
1.2.3 Les transporteurs de disaccharides.....	7
1.2.4 Les transporteurs de monosaccharides.....	8
1.3 Les transporteurs de sucres impliqués dans le transport intracellulaire.....	13
2 La relation plante/eau : hydratation et réponses des plantes au déficit hydrique.....	14
2.1 Le trajet de l'eau dans les plantes	14
2.1.1 Trajet de l'eau du sol vers la plante	14
2.1.2 Trajet de l'eau dans le cortex jusqu'aux vaisseaux du xylème.....	15
2.1.3 Le continuum sol-plante-atmosphère	16
2.1.4 La régulation de l'ouverture des stomates	16
2.2 Les réponses physiologiques au déficit hydrique	18
2.2.1 Limitation des pertes en eau	20
2.2.2 Optimisation de l'absorption d'eau.....	25
2.2.3 Maintien de l'eau dans les cellules.....	25
2.3 Régulation de l'expression de gènes cibles en réponse au déficit hydrique	26
3 Les mécanismes moteurs de l'Evolution	27
3.1 Les phénomènes de duplications géniques	28
3.1.1 Les duplications de génomes entiers.....	29
3.1.2 Les duplications segmentales	33
3.1.3 Les duplications à l'échelle du gène.....	34
3.2 Devenir des gènes dupliqués	34
3.2.1 Le retour à une seule copie dans le génome	35
3.2.2 L'avantage apporté par la redondance fonctionnelle.....	36
3.2.3 Les différents modèles expliquant la conservation de gènes issus d'évènements de duplication.....	37
3.2.4 La rétention ou l'élimination des nouvelles copies de gènes après duplication n'est pas aléatoire chez les plantes	42
3.3 Conséquences des évènements de duplications géniques	45
4 Etat des lieux de l'évolution des transporteurs de sucres chez les plantes	49
4.1 Evolution des transporteurs de disaccharides chez les plantes	50
4.2 Evolution des transporteurs de monosaccharides chez les plantes.....	50
5 Objectifs de la thèse	51
MATERIEL & METHODES.....	53
1 Matériel végétal et conditions de culture des plantes.....	54
1.1 Matériel végétal	54
1.2 Culture des plantes en condition normale d'arrosage.....	54

2	Indentification de mutants d'insertion homozygotes pour l'insertion	56
2.1	Extraction d'ADN génomique.....	56
3	Caractérisation physiologique des rosettes des plantes cultivées Col0 et mutantes cultivées en condition normale et en condition de carence en eau.....	57
3.1	Suivi des plantes et prélèvements.....	57
3.2	Mesure des masses fraîches, turgides et sèches et détermination de la teneur en eau et de la teneur relative en eau.....	58
3.3	Mesure de la surface foliaire projetée	58
3.4	Mesure de la conductance stomatique	59
3.5	Estimation de l'équilibre osmotique et analyse microscopique des feuilles	59
3.5.1	Estimation de l'équilibre osmotique des cellules des feuilles	59
3.5.2	Analyse de l'anatomie des cellules de feuilles par microscopie photonique.....	60
4	Dosage enzymatique des sucres solubles (glucose, fructose et saccharose) dans les feuilles.....	61
5	Traitement des plantes à l'acide abscissique	63
6	Analyse de l'expression de gènes.....	64
6.1	Analyses in silico de l'expression des gènes AtERD6-like	64
6.2	Analyses de l'expression des gènes AtERD6-like par qRT-PCR.....	64
6.2.1	Extraction et quantification des ARN totaux.....	64
6.2.2	Synthèse des ADN complémentaires	64
6.2.3	Mesure de l'expression relative des gènes AtERD6-like par RT-qPVR (Real Time quantitative Polymeras Chain Reaction)	65
7	Analyses statistiques	66
8	Analyses bioinformatiques	66
8.1	Identification des membres de la famille ERD6-like.....	66
8.2	Analyses phylogénétiques.....	67
8.3	Détermination et modélisation des structures introns/exons des gènes ERD6-like 67	
8.4	Analyse des substitutions nucléotidiques dans les 3 génomes du genre Arabidopsis	67
	RESULTATS & DISCUSSIONS.....	70
1	Evolution des transporteurs de monosaccharides de la famille ERD6-like chez les plantes	71
1.1	Identification des gènes ERD6-like dans le génome de 59 espèces représentatives de l'ensemble du Règne Végétal.....	71
1.1.1	Recherche et choix des espèces candidates	71
1.1.2	Identification de protéines homologues aux ERD6-like de vigne	76
1.2	Analyse phylogénétique de l'évolution des transporteurs de monosaccharides de la famille ERD6-like.....	79
1.3	Analyse de la répartition des ERD6-like dans les 3 groupes de l'arbre phylogénétique	86
1.4	Histoire évolutive des ERD6-like chez les espèces étudiées	90
1.5	Analyse des structures des gènes codant pour les transporteurs ERD6-like.....	92
1.6	Analyse des substitutions nucléotidiques (dN/dS) des ERD6-like du genre Arabidopsis	100
1.7	Discussion	103
2	Expression des gènes <i>AtERD6-like</i> dans différents organes d'<i>A. thaliana</i>	109

2.1	Données d'expression in silico, collectée dans la base de données Genevestigator	109
2.2	Cartographie de l'expression de 17 AtERD6-like dans les feuilles, racines, boutons floraux, fleurs et siliques d'<i>A. thaliana</i> en conditions normales d'arrosage.....	111
2.2.1	Comparaison du niveau d'expression de chaque gène dans les 5 organes testés...	112
2.2.2	Comparaison du niveau d'expression des différents AtERD6-like dans chacun des 5 organes testés	113
2.3	Comparaison du niveau d'expression des AtERD6-like dupliqués en tandem dans les 5 organes testés.....	118
2.4	Discussion	120
3	Caractérisation des effets de la carence en eau chez l'écotype Columbia-0 d'<i>Arabidopsis thaliana</i>	122
3.1	Aspect et croissance des rosettes de plantes soumises ou non à une carence en eau	122
3.1.1	Evolution de la surface foliaire projetée des rosettes.....	123
3.1.2	Evolution de la masse fraîche des rosettes.....	124
3.1.3	Evolution de la masse sèche des rosettes	125
3.1.4	Détermination de différentes phases de croissance chez les plantes non arrosées	126
3.1.5	Corrélations entre SFp, MF et MS chez les plantes arrosées et non arrosées, lors de chacune des phases de croissance.....	127
3.2	Caractérisation physiologique des rosettes de plantes soumises ou non à une carence en eau.....	127
3.2.1	Analyse de la teneur en eau dans les rosettes.....	128
3.2.2	Analyse de la masse turgide : capacité d'absorption d'eau des feuilles.....	130
3.2.3	Analyse de la teneur relative en eau dans les rosettes, indicateur de l'état hydrique des plantes.....	132
3.2.4	Mesure de la conductance stomatique (CS).....	133
3.2.5	Comparaison de l'aspect des cellules de feuilles après 10, 12 et 15 jours de culture en condition d'arrosage ou de déficit hydrique	134
3.2.6	Estimation de la capacité des cellules à répondre à des variations de la pression osmotique du milieu extérieur.....	135
3.2.7	Bilan sur les mesures physiologiques et définition de catégories caractérisant les différents stades de réponses physiologiques à la carence en eau.....	137
3.3	Mesure de la teneur en sucres solubles par dosage enzymatique	138
3.4	Discussion	143
4	Réponse de l'expression de 17 gènes <i>AtERD6-like</i> à la carence en eau et à l'application d'acide abscissique exogène dans les feuilles d'<i>A. thaliana</i>	145
4.1	Expression de 17 AtERD6-like dans les feuilles de plantes arrosées entre 35 et 50 jours après semis	145
4.2	Expression de 17 ERD6-like dans les feuilles de plantes en condition de carence hydrique et après réhydratation.....	146
4.3	Réponse de quelques AtERD6-like à l'application exogène d'acide abscissique par pulvérisation foliaire	152
4.4	Discussion	154
5	Etude du comportement de 3 mutants d'insertions <i>aterd6-like</i> vis-à-vis de la carence en eau, dans les feuilles d'<i>A. thaliana</i>.....	158
5.1	Identification de lignées mutantes d'<i>Arabidopsis thaliana</i> pour les gènes AtERD6-like induits lors de la carence hydrique	158
5.2	Comparaison de l'expression des gènes AtERD6-like dans les feuilles des 3 mutants <i>aterd6-like</i> avec celle de l'écotype sauvage Col-0 en condition normale d'arrosage	159

5.3 Comparaison des paramètres physiologiques des 3 mutants aterd6-like avec ceux de l'écotype sauvage Col-0 mesurés pour les feuilles en condition normale d'arrosage, de carence en eau et de réhydratation.....	161
5.3.1 Comparaison de l'évolution de la surface foliaire projetée, de la matière fraîche et de la matière sèche.....	162
5.3.2 Comparaison de l'évolution de la teneur en eau dans les rosettes.....	163
5.3.3 Comparaison de l'évolution de la masse turgide et de la teneur relative en eau	164
5.3.4 Comparaison de l'évolution de la conductance stomatique	165
5.4 Effet de la réhydratation sur les paramètres physiologiques mesurés.....	166
5.5 Comparaison de l'expression des gènes AtERD6-like dans les feuilles des 3 mutants aterd6-like avec celle détectée dans l'écotype sauvage Col-0 en condition de carence en eau et de réhydratation.....	167
5.6 Estimation de la capacité des cellules des feuilles des mutants aterd6-like arrosées et non arrosées à répondre à des variations de concentration du milieu extérieur.....	171
5.7 Teneurs en glucose, fructose et saccharose pour les 3 mutants analysés, et comparaison avec les teneurs en sucres mesurées pour Col-0, pour les plantes arrosées, non arrosées et réhydratées.....	173
5.8 Discussion	180
CONCLUSION & PERSPECTIVES.....	183
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	193
ANNEXES.....	214

Etude bibliographique

1 La production et le transport des sucres dans la plante

Les sucres sont présents dans la plante sous plusieurs formes. Le glucose, le fructose, le mannose et le galactose sont des monosaccharides, alors que le saccharose et le tréhalose sont des disaccharides, sucres complexes formés par l'association de 2 monosaccharides. Le saccharose est constitué de glucose et de fructose, tandis que le tréhalose est constitué de 2 molécules de glucose. Qu'ils soient simples ou complexes, les sucres sont synthétisés, transportés, puis remobilisés ou relocalisés au sein de la plante selon l'état physiologique de la plante, son stade de développement et les conditions environnementales. Les cellules sont en continuité grâce aux plasmodesmes, ponts cytoplasmiques à travers la paroi cellulaire d'un diamètre d'environ 30 nm. Les plasmodesmes permettent les échanges de solutés, comme les sucres, d'une cellule à l'autre en créant un continuum cytoplasmique appelé symplasme. Les petites molécules comme les sucres peuvent circuler librement dans ce symplasme. Or, en certains endroits et dans certains types cellulaires, la voie symplastique n'est pas suffisante ou peu empruntable. Dans ce cas, l'implication de transporteurs protéiques spécifiques est requise. Dans le cas du transport intracellulaire de sucres, c'est-à-dire d'un compartiment cellulaire à un autre, l'action de ces transporteurs spécifiques est nécessaire pour que les sucres puissent franchir les membranes des différents compartiments.

1.1 Transport de sucres à longue distance

La phase sombre de la photosynthèse (cycle de Calvin) qui se déroule principalement dans le stroma des chloroplastes des cellules du mésophylle des feuilles matures, aboutit à la production de trioses phosphate. Ces trioses peuvent être soit utilisés dans le chloroplaste pour la synthèse d'amidon transitoire, soit exportés vers le cytosol pour permettre la synthèse de saccharose (Frommer et Sonnewald, 1995). Après sa synthèse, le saccharose peut soit être utilisé pour le métabolisme de la cellule assimilatrice, soit stocké provisoirement dans la vacuole, soit être exporté vers les autres organes. Différentes études indiquent que le sucre complexe le plus largement utilisé par les plantes supérieures pour le transport sur de longues distances et le stockage à long terme est le saccharose (Lemoine 2000). Chez la Brassicacée *A. thaliana*, c'est en effet le saccharose, sucre non réducteur, qui est préférentiellement transporté par le phloème ainsi qu'un peu de tri-saccharides de la famille du raffinose, synthétisés à partir du saccharose (Haritatos et al. 2000). Chez les Cucurbitacées comme le concombre (*Cucumis sativus*), ce sont plutôt les oligosaccharides de la famille du raffinose, également issus du saccharose, qui sont transportés de manière préférentielle (Pharr and Sox

1984). Finalement, d'autres espèces comme le grand plantain (*Plantago major*) et le céleri (*Apium graveaolens*), transportent plutôt des polyols mais également du saccharose (Noiraud et al. 2000; Ramsperger-Gleixner et al. 2004).

Le phloème joue un rôle clef dans la répartition des ressources carbonées dans la plante. En effet, 50 à 80% du CO₂ fixé dans les organes photosynthétiques matures, appelés organes sources, sont transportés en dehors des feuilles assimilatrices et redirigés par le biais de la sève phloémienne vers les organes puits (Kalt-Torres et al. 1987; Ainsworth and Bush 2011). Sont considérés comme organes puits, des organes non photosynthétiques et/ou jeunes (racines, feuilles jeunes, fleurs, fruits, graines). Le transport des sucres, comme celui de tous les assimilats, est généralement décomposé en trois étapes : i) Un transport latéral au sein de l'organe source, des cellules assimilatrices jusqu'au complexe conducteur (cellule compagne/tube criblé) ii) Un transport longitudinal dans les tubes criblés du phloème iii) Un transport latéral dans l'organe receveur, depuis les cellules criblées jusqu'aux cellules de réserve de l'organe receveur.

1.1.1 *Le chargement du saccharose dans le phloème*

Depuis les cellules assimilatrices (cellules de mésophylle) jusqu'aux cellules du parenchyme phloémien, le saccharose circule par la voie symplastique. Les cellules sont « connectées » entre elles par les plasmodesmes qui permettent les échanges de solutés d'une cellule à l'autre en créant un continuum cytoplasmique appelé symplasma. Les petites molécules comme les sucres peuvent circuler librement dans ce symplasma. L'entrée du saccharose dans le complexe conducteur peut se réaliser selon deux voies : la voie symplasmique et la voie apoplastique. Chez les espèces pour lesquelles une continuité cytoplasmique, entre les cellules parenchymateuses et les cellules compagnes, est assurée par la présence de plasmodesmes, le chargement du saccharose se réalise par la voie symplasmique. Le saccharose diffuse selon son gradient de concentration à travers les plasmodesmes, des cellules du parenchyme vers le complexe conducteur (Turgeon and Beebe 1991). Chez de nombreuses autres espèces, le chargement du complexe conducteur se réalise par la voie apoplastique (Lalonde et al. 2004; Dinant and Lemoine 2010). Le saccharose sort des cellules parenchymateuses pour rejoindre l'apoplaste. Cet efflux du saccharose est réalisé chez *Arabidopsis thaliana* par deux transporteurs nommés AtSWEET11 et AtSWEET12 (Chen et al. 2012) qui fonctionnent sans apport d'énergie. Arrivé dans l'apoplaste, le saccharose est chargé activement dans la cellule compagne *via* un symport proton/saccharose utilisant la force proton-motrice générée par une ATPase pompe à proton (Sauer 2007). Chez

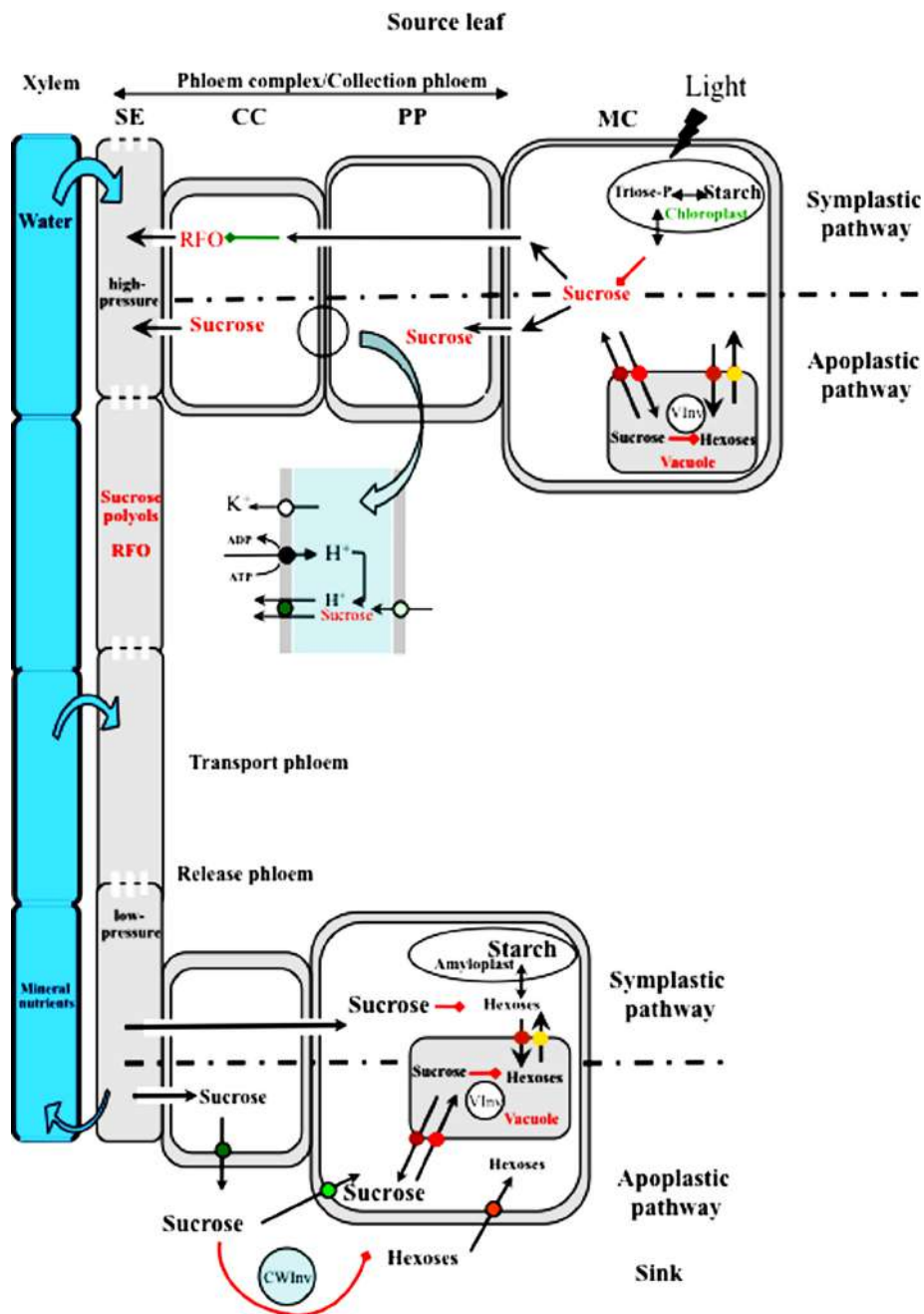


Figure 1 : trajet du saccharose des organes sources aux organes puits. Le saccharose est produit dans les cellules du mésophylle des feuilles matures grâce au mécanisme de photosynthèse. Les sucres peuvent être stockés au niveau des chloroplastes sous forme d'amidon ou au niveau de la vacuole sous forme de saccharose et d'hexoses. Les invertases vacuolaires sont capables de cliver le saccharose en hexoses. Le passage des sucres de à travers le tonoplaste se fait par le biais de transporteurs de sucres spécifiques. Afin d'être remobilisé, le saccharose peut emprunter la voie symplastique pour certaines espèces et arrive au niveau des éléments de la sève élaborée (SE) en passant à travers les plasmodesmes. Pour d'autres espèces, la voie apoplastique est utilisée pour arriver aux cellules compagnes (CC), par des facilitateurs de la famille SWEET (cercle vert très clair) et des symporteurs protons/saccharose de la famille SUT1/SUC2 (cercles verts foncés), afin d'entrer dans le phloème. La forte pression hydrostatique générée dans les éléments de la sève élaborée attire l'eau du xylème. Le phloème de transport véhicule les sucres à travers les tubes criblés et le saccharose est déchargé dans les organes puits où la pression hydrostatique est plus faible. Ce déchargement peut se faire par la voie symplastique ou par la voie apoplastique. Dans ce cas, des transporteurs de type SUT1/SUC2 prennent en charge le saccharose qui peut être convertit par la suite par les invertases pariétales (CW Inv). Ainsi, le saccharose peut entrer dans les cellules puits par des transporteurs spécifiques par le biais des mêmes transporteurs SUT1/SUC2 (cercle vert clair du bas de l'image) et les hexoses (glucose et fructose) peuvent aussi pénétrer dans les cellules puits grâce à des transporteurs spécifiques. Dans les cellules puits, des transporteurs vacuolaires permettent de faire entrer les sucres dans la vacuole et des invertases vacuolaires dégrade le saccharose en hexoses, pouvant être convertis en amidon dans les amyloplastes. D'après Lemoine et al. 2013.

A. thaliana, le principal transporteur impliqué dans le chargement du complexe conducteur est *AtSUC2* (Truernit and Sauer 1995). La connexion de la cellule compagne avec le tube criblé via de nombreux plasmodesmes branchus permet ensuite la diffusion du saccharose vers les éléments des tubes criblés.

1.1.2 *Le transport longitudinal du saccharose dans le phloème*

Le transport longitudinal du saccharose est expliqué par la théorie du « flux de masse » proposée par Munch en 1930. L'accumulation du saccharose dans le complexe conducteur des feuilles conduit à une forte pression osmotique qui crée un appel d'eau à partir de l'apoplaste et par voie de conséquence entraîne une augmentation de la pression hydrostatique qui déclenche le flux longitudinal de sève jusqu'aux organes puits. A l'inverse, au niveau des organes puits, le déchargement provoque une sortie d'eau et une diminution de la pression hydrostatique. La variation (diminution) de pression hydrostatique est donc à l'origine du flux de sève dans les tubes criblés des organes sources vers les organes puits.

1.1.3 *Le déchargement du phloème*

Dans les organes puits, le déchargement du saccharose peut se faire par la voie apoplastique ou par la voie symplastique, voir par les deux. Pour beaucoup d'espèces, le déchargement se réalise par la voie symplastique (Patrick 1997; Imlau et al. 1999). La consommation du saccharose dans les cellules puits entretient un gradient de concentration qui permet une diffusion du saccharose vers les organes puits. Pour d'autres espèces, le saccharose quitte passivement, par des perméases, le complexe phloémien, et les cellules puits l'absorbent activement à partir de l'apoplaste par des symporters proton/saccharose. Cependant, dans certains cas (tissus maternels/filiaux) une succession de la voie symplastique puis de la voie apoplastique est nécessaire. Si le saccharose est libéré dans l'espace extracellulaire, il peut être importé dans les tissus des organes puits par des transporteurs spécifiques ou être converti en glucose et fructose par l'action des invertases pariétales. Les hexoses peuvent ensuite être pris en charge par des transporteurs spécifiques de monosaccharides (Sauer, 2007). Dans tous les cas, Le saccharose et les hexoses peuvent être consommés, transportés vers la vacuole des cellules puits pour stockage, ou permettre la formation d'amidon dans les amyloplastes (Lalonde et al. 2003).

La figure 1 (Lemoine et al. 2013) résume le transport du saccharose au cours de sa relocalisation des tissus photosynthétiques vers les tissus puits.

1.2 Les transporteurs de sucres

1.2.1 Les transporteurs de la famille SWEET

La famille des transporteurs de sucres SWEET (Sugars Will Eventually be Exported Transporter) a été identifiée lors d'un crible ayant pour but d'identifier les transporteurs impliqués dans l'efflux de glucose (Chen et al., 2010). Les SWEET sont présents chez les animaux et les plantes et des protéines homologues, appelées SemiSWEET sont également retrouvées chez les bactéries (Xu et al. 2014). Les SWEET sont de petites protéines caractérisées par 7 hélices transmembranaires formant un pore. Cette configuration résulte d'une duplication de trois hélices α constituant 2 blocs distincts reliés par une 7^e hélice α . Ce sont des uniporteurs de types facilitateurs, fonctionnant de manière bidirectionnelle et permettant un transport des sucres à travers la membrane plasmique ou le tonoplaste. Chez les Angiospermes, la famille des SWEET comprend un nombre de transporteurs très variable allant de 8 pour la Proto-Angiosperme *Amborella trichopoda* à 47 pour *Eucalyptus grandis* (Eom et al. 2015). Dans les génomes de la vigne (*Vitis vinifera*), d'*A. thaliana* et du riz (*Oryza sativa*) 16, 17 et 20 membres ont été identifiés, respectivement (Lecourieux et al. 2013; Chen et al. 2010). Les SWEETs se répartissent en 4 clades différents qui semblent, en partie, refléter des fonctions spécifiques de ces transporteurs: les membres des clades I et II (*AtSWEET* 1 à 8) ont une meilleure affinité pour les hexoses et ceux du clade III (*AtSWEET* 9 à 15) pour le saccharose. Les membres du clade IV (*AtSWEET* 16 à 17) sont localisés sur le tonoplaste. *AtSWEET*1 est le premier transporteur décrit comme responsable de l'influx de glucose à travers la membrane plasmique mais également de l'efflux de glucose dans le réticulum endoplasmique (Chen et al. 2010). *AtSWEET*8 est exprimé dans le tapetum (Guan et al. 2008) et *AtSWEET*9 est impliqué dans la production de nectar (Lin et al. 2014). *AtSWEET* 11 et *AtSWEET* 12 sont responsables de l'efflux du saccharose dans l'apoplaste et alimentent en saccharose le symport proton/saccharose responsable du chargement du complexe conducteur (Chen et al., 2012). Dans les graines, *AtSWEET* 11, 12 et 15 sont impliqués dans l'efflux du saccharose à partir des tissus maternels et contribuent au remplissage de la graine (Chen et al. 2015). La majorité des transporteurs de la famille SWEET sont induits après ajout de *Pseudomonas syringae*, agent pathogène à effecteurs de type III, ou après contact avec un mycélium de champignon (*Golovinomyces cichoracearum*, *Botrytis cinerea*, et *Pythium*). Cette observation suggère que les transporteurs de la famille SWEET pourraient moduler l'efflux de glucose lors d'une attaque pathogène. Cette hypothèse

a été confortée par l'étude de AtSWEET2, un transporteur vacuolaire qui contribue à conférer une résistance à *Pythium* en limitant la perte de carbone dans la rhizosphère en séquestrant les sucres dans les vacuoles des racines (Chen et al., 2015). De plus, AtSWEET 4 qui est localisé sur la membrane plasmique, capable de transporter le glucose et le fructose, semble être impliqué dans la réponse à la bactérie *Pseudomonas syringae* mais également à des stress abiotiques tels que le gel et le déficit hydrique (Liu et al. 2016). Il a été démontré qu'AtSWEET 16, localisé dans le tonoplaste des cellules de parenchyme xylémien, est responsable du transport du glucose, du fructose et du saccharose et que son activité est finement régulée pour permettre le développement d'*Arabidopsis* dans des conditions optimales de développement et également dans des conditions défavorables. La répression de son expression lors d'un stress froid semble être à l'origine d'une accumulation de sucres dans les feuilles (Klemens et al. 2013). AtSWEET 17 a été identifié par une approche de génétique quantitative dont l'objectif était l'identification de l'élément majeur impliqué dans la différence de niveau de fructose entre les écotypes Bay-0 et Shadagra d'*A. thaliana* (Chardon et al. 2013). AtSWEET 17 est un uniporteur vacuolaire à faible affinité pour le fructose responsable de l'efflux du fructose de la vacuole dans les racines et les feuilles d'*A. thaliana* (Guo et al. 2014).

1.2.2 Les transporteurs de la Major Facilitator Superfamily

La Major Facilitator Superfamily (MFS) est une famille de transporteurs retrouvée au sein de tous les Règnes du vivant. Avec plus 10 000 membres séquencés, et en constante augmentation grâce aux progrès des techniques de séquençage, la MFS est une grande famille de transporteurs (Yan 2013a). Des travaux réalisés sur la base d'analyses phylogénétiques, de spécificité de substrat et de mécanismes d'action dénombrent et répertorient 76 sous-familles au sein de la MFS (Transporter Classification Database ; <http://www.tcdb.org/>). Les transporteurs de la MFS transportent une multitude de substrats dont les sucres. De manière générale, les membres de la MFS possèdent des extrémités N-terminal et C-terminal cytosoliques et 12 segments transmembranaires arrangés en deux parties, N-terminale et C-terminale, contenant chacune 6 segments séparés par une boucle cytosolique. Au sein de chaque partie, les segments apparaissent comme dupliqués deux à deux (Büttner and Sauer 2000; Büttner et al. 2000; Reddy et al. 2012; Yan 2013b). Les transporteurs de la MFS ayant les sucres pour substrats sont appelés Sugar Porter (SP) et sont découpés en 2 sous-familles :

- Les transporteurs de disaccharides qui transportent majoritairement le saccharose, mais sont aussi susceptibles de transporter le maltose et les β -glucosides (Reinders et al. 2012).
- Les transporteurs de monosaccharides (Monosaccharides Transporter, MST) qui transportent majoritairement le glucose et le fructose et dans une moindre mesure d'autres hexoses comme le mannose un analogue du glucose, le galactose et le xylose,

1.2.3 Les transporteurs de disaccharides

Le transporteur de saccharose de l'épinard, *SoSUT* (*Spinacia oleracea* Sucrose Transporter) est le premier transporteur de saccharose identifié chez les plantes (Riesmeier et al. 1992). Depuis le séquençage complet du génome d'*A. thaliana*, 9 transporteurs de saccharose ont été identifiés chez cette espèce (*AtSUC1* à 9). La nomenclature n'est pas claire quant à l'appellation des transporteurs de saccharose chez *Arabidopsis*. Dans la littérature, ils sont désignés sous le nom original, SUT, dérivé de leur découverte chez l'épinard. Mais il est possible également de les nommer SUC (SUcrose Carrier) ou encore Scr (Sucrose CarriER) (Lemoine 2000). Depuis les progrès du séquençage et de la disponibilité de nombreux génomes, des transporteurs de la famille SUT/SUC ont été identifiés chez de nombreuses Angiospermes, dicotylédones comme monocotylédones (Ishimaru et al. 2001; Sauer 2007; Braun and Slewinski 2009; Slewinski et al. 2009; Kühn and Grof 2010; Doidy et al. 2012; Reinders et al. 2012). Les transporteurs de type SUT/SUC sont des protéines de nature hydrophobe, de taille équivalente à environ 510 acides aminés et de masse moléculaire avoisinant les 55 kDa (Lemoine 2000). S'ils sont tous des symporteurs protons/saccharose, les transporteurs de type SUT/SUC peuvent être des transporteurs d'influx ou d'efflux de saccharose (Williams et al. 2000; Kühn and Grof 2010). Majoritairement localisés au niveau de la membrane plasmique, ces transporteurs jouent un rôle important lors du chargement et du déchargement du phloème. Néanmoins, certains sont également localisés au niveau du tonoplaste et assureraient le stockage du saccharose dans la vacuole et sa libération pour le transport à longue distance. De nombreuses analyses phylogénétiques ont été réalisées et ont permis d'identifier 5 groupes distincts. Le groupe 1 ou SUT3 (*ZmSUT1* – *OsSUT1*) contient spécifiquement des transporteurs de monocotylédones ayant une forte affinité pour le saccharose. Le groupe 2 ou SUT1 (*AtSUC1* – *AtSUC2* – *AtSUC9*) est spécifique des eudicotylédones et regroupe plusieurs transporteurs à forte affinité pour le saccharose. Ils sont

responsables du chargement du saccharose dans le complexe conducteur, à l'exemple de *AtSUC2* d'*Arabidopsis* (Gottwald et al. 2000; Srivastava et al. 2008). Les transporteurs du groupe 3 ou SUT2 (*AtSUT2/SUC3* – *ZmSUT3*), qui sont présents aussi bien chez les monocotylédones que chez les eudicotylédones, présentent une large boucle cytosolique et un rôle de senseur leur a été attribué. Ils présentent une faible affinité pour le saccharose et leur fonction est encore peu précisée. Le groupe 4 ou SUT4 (*AtSUC4* – *ZmSUT4*) regroupe également des transporteurs de monocotylédones et d'eudicotylédones qui sont principalement localisés dans le tonoplaste. La caractérisation de *AtSUT4* comme un symport H^+ /saccharose (Schulz et al. 2011) indique que ces transporteurs pourraient être impliqués dans l'efflux du saccharose à partir de la vacuole. Enfin, le groupe 5 ou SUT5 (*OsSUT5* – *ZmSUT5*) est spécifique des monocotylédones et regroupe des transporteurs à haute affinité pour le saccharose dont la fonction est inconnue.

1.2.4 Les transporteurs de monosaccharides

Le glucose et le fructose sont les monosaccharides majoritairement métabolisés par les plantes. Les transporteurs de monosaccharides font tous partie de la famille des MST (MonoSaccharide Transporters) et sont regroupés en 7 sous-familles chez *Arabidopsis thaliana* : les STP (Sugar Transporter Protein), les VGT (Vacuolar Glucose Transporter), les INT (Inositol Transporter), les pGlcT (Plastidic Glucose Transporter), les PMT (Polyols/Monosaccharides Transporter), les TMT (Tonoplaste Monosaccharides Transporter) et les ERD6-like (Early Response to Dehydration-like) (Afoufa-Bastien et al. 2010; Büttner and Sauer 2000; Johnson et al. 2006; Johnson and Thomas 2007; Slewinski 2011).

La sous-famille des STP est la plus étudiée jusqu'à présent. Cette famille est très représentée chez *A. thaliana* avec 14 membres. Ces transporteurs membranaires localisés au niveau de la membrane plasmique seraient capables de transporter tous types d'hexoses (3-O-méthyl-glucose, glucose, fructose, galactose) avec toutefois une préférence pour le glucose. Le transport d'hexoses par les transporteurs de type STP est de type symport monosaccharides/protons (Truernit et al. 1999; Scholz-Starke et al. 2003).

La sous-famille des PLT (Polyols/Monosaccharides Transporter) regroupe des transporteurs permettant le transport d'un large panel de monosaccharides dont des hexoses, des pentoses, des tétroses et des polyols. Chez les espèces transportant les polyols sur de longues distances, les PLT joueraient un rôle important dans le chargement du phloème en polyols (Slewinski 2011). Leur rôle reste cependant obscur chez des espèces telles que *Arabidopsis thaliana*, où la production de polyols est faible (Doidy et al. 2012). Chez cette

espèce, 6 gènes ont été identifiés, nommés AtPLT1 à 6 mais seules AtPLT1, 2 et 5 ont été caractérisés comme des protons symporters (Reinders et al. 2005; Klepek et al. 2004; Klepek et al. 2009).

La sous-famille des INT (Inositol Transporter) est représentée par quatre protéines chez *Arabidopsis thaliana* (AtINT1 à 4). Parmi ces protéines seules 3 semblent fonctionnelles, le gène *AtINT3* codant une protéine tronquée avec seulement 4 régions transmembranaires (Schneider et al. 2007). AtINT2 et AtINT4 sont localisés sur la membrane plasmique alors que AtINT1 est un transporteur vacuolaire (Wolfenstetter et al. 2012). AtINT4 est responsable d'un symport H^+ /myo-inositol à très forte affinité pour le myo-inositol qui est notamment un précurseur à la synthèse de certains composés de la paroi cellulaire (Schneider et al. 2006). AtINT2 est un transporteur ayant une plus faible affinité que AtINT4 pour le myo-inositol mais capable de transporter plusieurs épimères de l'inositol (Schneider et al. 2007).

Les 3 dernières sous-familles connues de transporteurs de monosaccharides sont des sous-familles de transporteurs vacuolaires. Les TMT représentent une petite sous-famille de transporteurs de monosaccharides dont 3 membres ont été identifiés chez *A. thaliana* et localisés au niveau du tonoplaste (Wormit et al. 2006). Ils permettent l'influx du glucose mais également du saccharose dans la vacuole contre leur gradient de concentration à la manière d'antiporteurs H^+ /glucose ou H^+ /saccharose (Schulz et al. 2011). De plus, il a été montré qu'une kinase nommée VIK, capable de se fixer sur la large boucle hydrophyle située entre la 6^e et la 7^e hélice transmembranaire d'AtTMT1 pour phosphoryler ce domaine, permet de stimuler l'absorption du glucose dans la vacuole (Wingenter et al. 2011).

Les VGT représentent également une petite sous-famille de transporteurs d'hexoses comprenant 3 membres identifiés chez *A. thaliana*. AtVGT1 transporte le glucose et le fructose par un mécanisme de type antiport H^+ /sucre (Aluri and Büttner 2007). Ceci permettrait à la cellule d'importer les hexoses dans la vacuole lors de mécanismes de compartimentation des sucres.

La dernière famille de monosaccharides est la grande famille ERD6-like (Early Response to Dehydration six-like), représentée par 19 membres chez *Arabidopsis thaliana* (Büttner 2007; Slewinski 2011). Cette sous-famille est donc la plus représentée chez *Arabidopsis thaliana* ; néanmoins, elle a été très peu étudiée. Quelques études seulement portent sur les *ERD6-like* et seuls 6 d'entre eux ont été partiellement caractérisés ; ainsi les *ERD6-like* et leurs fonctions biologiques restent encore assez méconnus. La mise en évidence de l'existence de cette sous-famille de transporteurs de monosaccharides a été permise suite à

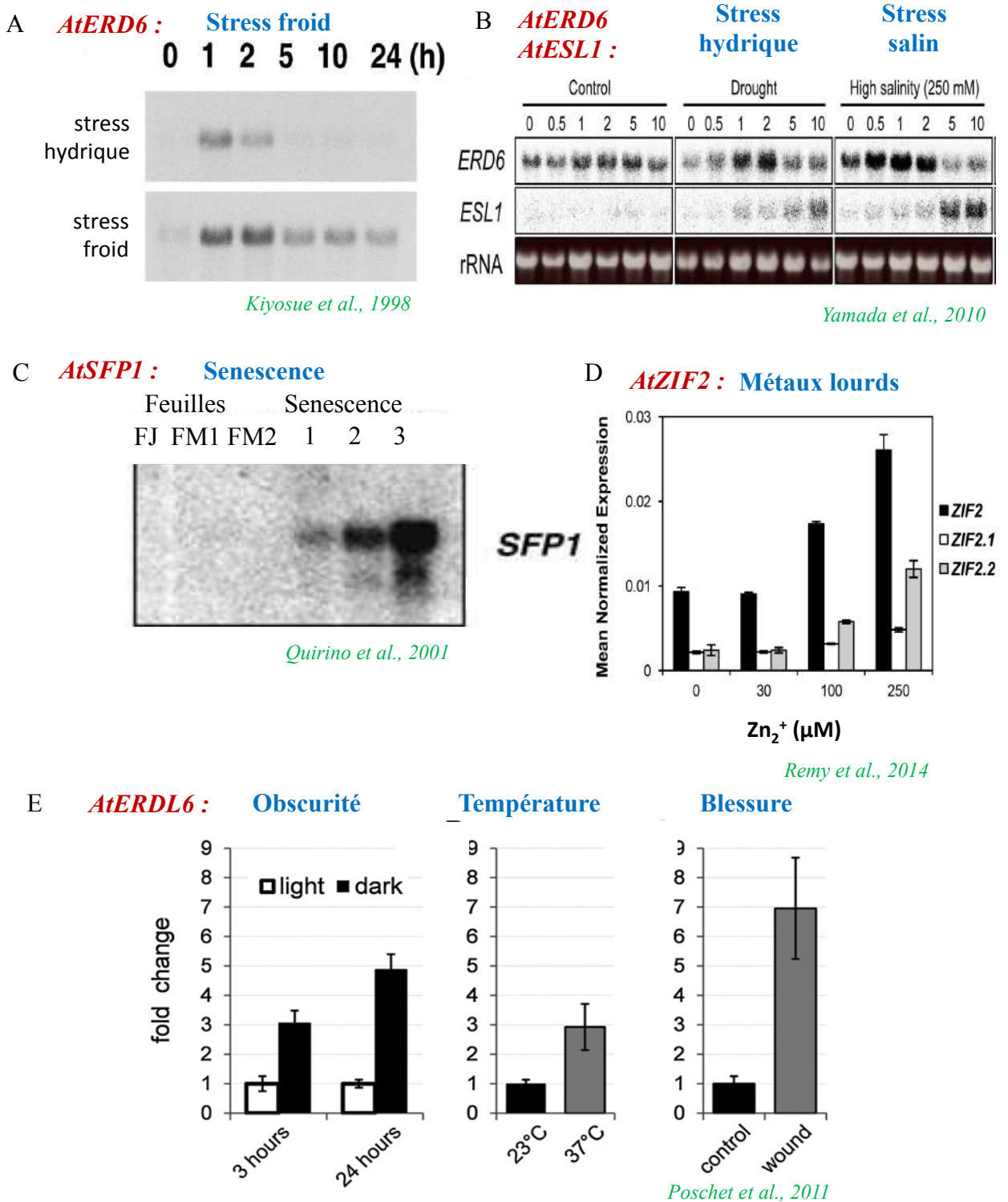


Figure 2 : réponse de 5 *AtERD6-like* à différents stress abiotiques. A : induction de *AtERD6* par le stress froid (Northern blot), d'après *Kiyosue et al. 1998*, B : induction de *AtSFP1* dans les feuilles sénescentes d'*A. thaliana* (FJ = feuilles jeunes, FM1 et 2 = feuilles matures, senescence 1, 2 et 3 = trois stades de sénescence du moins au plus avancé), d'après *Quirino et al. 2001*, C : Induction d'*AtERDL6* par le passage à l'obscurité, la hausse de la température de 23 à 37 °C et les blessures, d'après *Poschet et al. 2011*, D : Induction d'*AtZIF2* par des concentrations croissantes en Zinc, d'après Remy et al. 2014, E : induction précoce d'*AtERD6* par le stress hydrique et le stress salin, et induction un peu plus tardive d'*AtESL1* par ces deux mêmes stress, d'après *Yamada et al. 2010*.

un criblage d'expression différentielle avec une banque d'ADNc préparée à partir de plantules d'*Arabidopsis* cultivées pendant 4 semaines sur de la vermiculite et laissées sécher pendant 1 heure à 22°C en présence de 60% d'humidité (Kiyosue et al. 1998). Dans cette étude, les auteurs ont isolé 26 ADNc pouvant être regroupés en 16 groupes distincts, nommés ERD1 à 16 et dont l'expression est induite après 1 heure de carence en eau. L'ADNc *AtERD6* qui a été caractérisé quatre ans plus tard (Kiyosue et al. 1998) est un fragment de 1741 bp encodant un polypeptide de 496 acides aminés avec un poids moléculaire prédit de 54,354 kDa. L'analyse des séquences nucléotidiques et protéiques a fait apparaître que cette protéine présente de nombreuses caractéristiques communes aux transporteurs de sucres de la MFS, telles que la présence de 12 segments transmembranaires, la présence d'une boucle centrale hydrophile et la présence dans les 6^e et 12^e segments trans-membranaires, des motifs PESPRXL et PETKGXXE, conservés parmi les transporteurs de sucres de la MFS. *AtERD6*, codé par le gène *At1g08930* d'*A. thaliana*, pourrait avoir une localisation vacuolaire pour deux raisons : i) il n'y a aucun transport d'hexoses détecté lors de l'expression de ce transporteur en système hétérologue (levure) ; ii) il est très proche d'un transporteur de la betterave localisé au niveau du tonoplaste. Des plantes transgéniques, exprimant le gène *GUS* ou *TM-GFP* sous le contrôle du promoteur *ERD6*, ont révélé l'activité du promoteur dans les parties aériennes des plantes, dans les sépales et dans les racines notamment dans le rhizoderme et plus fortement dans les cellules du cortex (Yamada et al. 2010). Des analyses d'expression par Northern blot, microarray ou RT-PCR ont non seulement confirmé l'induction précoce d'*At1g08930*, entre 1 et 2 heures après le début de la sécheresse (Kiyosue et al. 1998; Seki et al. 2002; Yamada et al. 2010) mais aussi son induction par un traitement par le froid à 4°C (Kiyosue et al. 1998), (figure 2 A et B) et par un stress salin (250mM NaCl) ainsi que sa répression par l'ABA 100µM dans les feuilles de plantes âgées de 3 semaines cultivées *in vitro* (Yamada et al. 2010). Aucune activité de transport n'a été actuellement caractérisée pour ce transporteur et son rôle physiologique reste méconnu.

AtESL1 (ERD six-like 1 - *At1g08920*) est un gène localisé sur le chromosome 1 en tandem d'*AtERD6*. L'analyse de plantes transgéniques, exprimant le gène *GUS* ou *TM-GFP* sous le contrôle du promoteur *AtESL1*, a révélé l'activité du promoteur dans les mêmes organes qu'*AtERD6*. Cependant, dans les racines, l'activité du promoteur est localisée dans le péricycle et dans les cellules du parenchyme xylémien, en plus des cellules de l'endoderme. De plus, *AtESL1* est induit lors d'un stress hydrique et lors d'un stress salin tout comme *AtERD6* mais de façon plus tardive après 5 à 10h de stress, lorsque l'expression d'*AtERD6* commence à diminuer (figure 2 B). A l'inverse d'*AtERD6*, *AtESL1* est induit par l'ABA

100µM. *AtESL1* et *AtERD6* montrent donc des différences d'expression qui suggèrent des fonctions physiologiques différentes. L'expression transitoire dans des protoplastes de cellules de mésophylle d'*Arabidopsis* d'une protéine de fusion GFP-ESL1 a permis de démontrer la localisation d'ESL1 au niveau du tonoplaste ainsi que l'importance, dans cette localisation, d'un motif tri-leucine (LXXXLL) situé dans la partie N-terminale de la protéine. De plus, l'expression d'une protéine modifiée ESL1 (LLL/AAA) dans des cellules BY-2 a permis de déterminer que ESL1 est transporteur de monosaccharides à faible affinité capable de transporter des hexoses (glucose, fructose, galactose, mannose, xylose) par diffusion facilitée. Enfin, la similitude d'expression d'*AtESL1* avec les deux gènes d'invertases vacuolaires *AtFRUCT3* et *AtFRUCT4*, ainsi que l'augmentation de l'activité de ces deux invertases lors des stress abiotiques, suggèrent que ESL1 pourrait jouer un rôle dans la régulation de la remobilisation des sucres et de la pression osmotique dans les cellules, en coordination avec les invertases vacuolaires (Yamada et al. 2010).

AtSFP1 et *AtSFP2* (Sugar-porter family protein 1 et 2) ont été identifiés lors d'un crible de gènes répondant à la sénescence dans les feuilles sénescentes d'*A. thaliana* (Quirino et al. 2001). *AtSFP1* et *AtSFP2* sont deux gènes dupliqués en tandem sur le chromosome 1 et correspondent aux gènes *At5g27350* et *At1g27360*, respectivement. Ils présentent, cependant, des niveaux d'expression très différents. En effet, une analyse par Northern blot a permis de mettre en évidence que *AtSFP2* est exprimé dans les organes végétatifs et reproducteurs ainsi que dans des germinations de 9 jours alors que l'expression de *AtSFP1* n'est détectée que dans les germinations. De plus, seul *AtSFP1* est induit par la sénescence dans les feuilles dès le début de la dégradation des chlorophylles (figure 2 C) alors que l'expression de *AtSFP2* reste stable au cours de ce processus. Une analyse histochimique à l'aide de plantes surexprimant le gène *GUS* sous le contrôle des promoteurs *AtSFP1* et *AtSFP2* a conforté ces différences d'expression. L'activité du promoteur *AtSFP1* est importante uniquement dans les stomates des cotylédons de germinations âgées de 2 jours et dans les feuilles matures dans les zones où les chlorophylles sont dégradées. Celle du promoteur *AtSFP2* est quant à elle détectée dans les nervures à la périphérie des jeunes feuilles, dans les hydathodes, les hampes et dans les tissus conducteurs des filets d'étamines. L'activité de transport pour ces deux transporteurs n'a pas encore été caractérisée.

L'étude de l'expression de *AtZIF2* (pour Zinc-induced Facilitator - *At2g48020*) a été réalisée à l'aide de plantes d'*Arabidopsis* exprimant le gène *GUS* sous le contrôle du promoteur *AtZIF2* (Remy et al. 2014). Cette étude a révélé que le promoteur *AtZIF2* était actif dans la plupart des organes, tels que les cellules du mésophylle, les organes floraux et plus

particulièrement le système racinaire, au niveau des pointes racinaires des racines principales et dans les primordia des racines latérales. L'expression de la protéine *GFP* sous le contrôle du promoteur *AtZIF2* a permis de mettre en évidence l'activité du promoteur dans les cellules de l'endoderme et du cortex racinaire. La localisation de ce transporteur au niveau du tonoplaste a pu être mise en évidence par l'utilisation de protéine de fusion *ZIF2-YFP* dans des cellules du mésophylle et dans des pointes racinaires d'*Arabidopsis*. Considérant que l'expression de deux variants d'épissage de *AtZIF2* est induite dans les racines par de fortes concentrations en zinc (figure 2 D) et que la perte de fonction et la surexpression de *AtZIF2* induit une hypersensibilité au zinc et une tolérance accrue au zinc, respectivement, il a été proposé que *ZIF2* pourrait indirectement être responsable de la séquestration du zinc dans la vacuole par le transport d'une autre molécule (chélateur ou acide organique) ou en modifiant le gradient de proton de part et d'autre du tonoplaste. Aucune activité de transport de sucres n'a été décrite actuellement pour ce transporteur.

Enfin, un dernier transporteur nommé *AtERDL6* (Early Responsive to Dehydration-Like six - *At1g75220*) a été caractérisé chez *Arabidopsis*. L'expression du gène *AtERDL6* est importante dans de très nombreux organes photosynthétiques ou non et principalement dans les organes ou les stades de développement pour lesquels le métabolisme cellulaire est important tels que la germination des graines, le développement des plantules, la zone d'abscission des fleurs. L'expression de *AtERDL6-GFP* dans des protoplastes d'*Arabidopsis* et dans des feuilles de tabac a permis de démontrer la localisation de la protéine au niveau du tonoplaste. Des conditions qui nécessitent une rapide utilisation de l'énergie stockée (export des sucres de la vacuole) telles que le passage de la lumière à l'obscurité, l'augmentation de la température de 23°C à 37°C ainsi que des blessures, augmentent l'expression de *AtERDL6*. A l'inverse, une baisse des températures de 22°C à 4°C, processus qui conduit à une accumulation des sucres dans les vacuoles, induit une répression d'*AtERDL6* (figure 2 E). De même, l'expression de *AtERDL6* est réprimée par des concentrations extérieures en glucose et en saccharose élevées, une condition qui ne nécessite pas d'export de sucres de la vacuole. Dans des lignées mutantes *aterdl6*, la teneur en glucose vacuolaire est fortement augmentée et représente plus de 90% du glucose total des cellules alors qu'il ne représente que 86% dans les lignées sauvages. A l'inverse, des plantes sur-exprimant *AtERDL6* possèdent moitié moins de glucose que les plantes de la lignée sauvage. Enfin, l'analyse des lignées mutantes *aterdl6* montre que lors d'un réchauffement après une période de froid (passage 4°C à 22°C), la vitesse d'export du glucose des vacuoles est réduite dans les lignées mutantes par rapport à la lignée sauvage. Toutes ces observations suggèrent que la régulation de l'expression

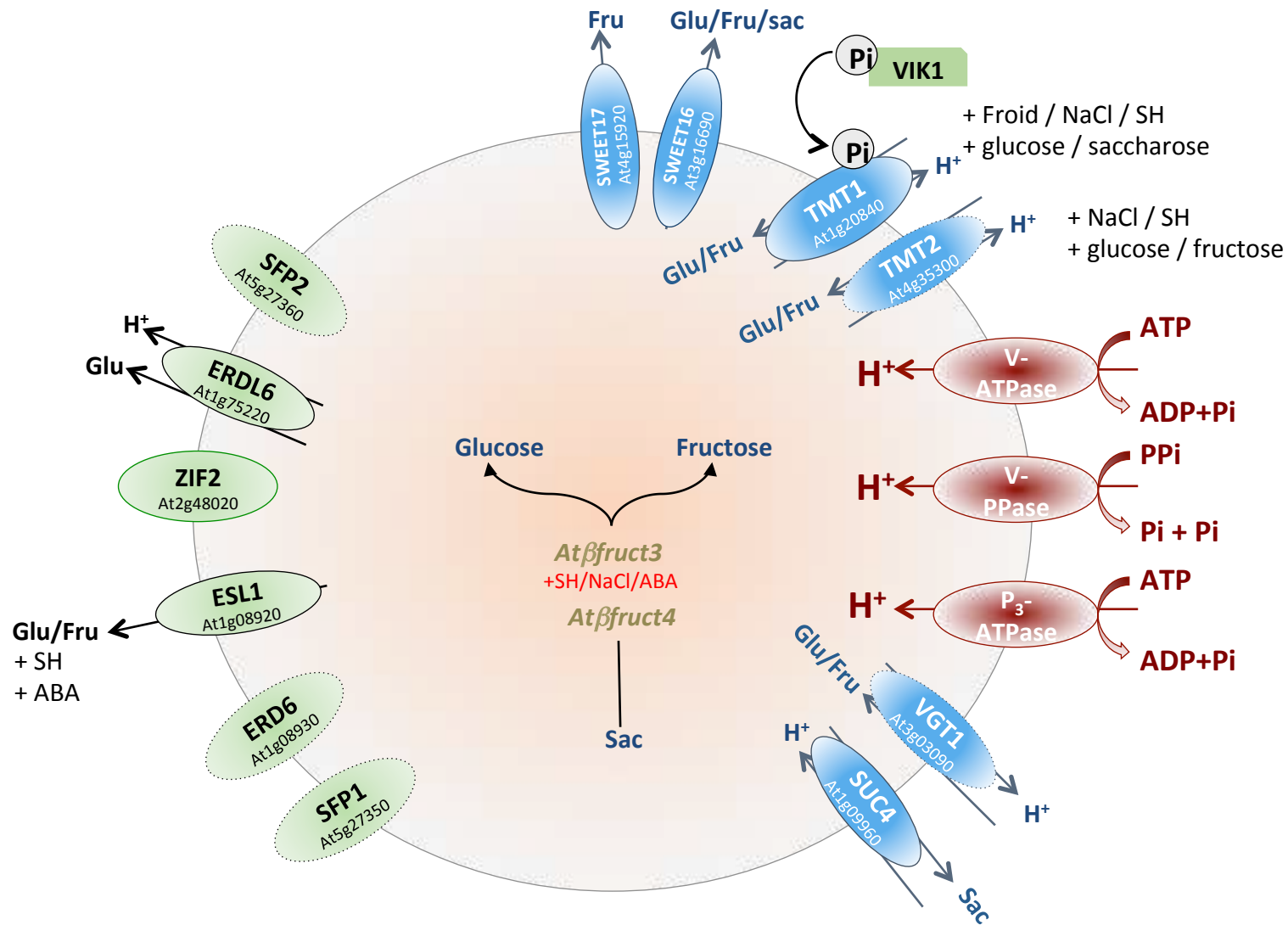


Figure 3 : données actuelles quant au transport de sucres de part et d'autre du tonoplast. Fru = fructose, Glu = glucose, Sac = saccharose, Sh = stress hydrique, NaCl = stress salin, ABA = acide abscissique. AtTMT3, AtVGT2 et AtVGT3 sont non caractérisés mais sont a priori localisés au niveau du tonoplast. De même, les treize autres AtERD6-like sont potentiellement localisés au niveau du tonoplast mais non encore caractérisés. D'après Hedrich et al. 2015, Guo et al. 20174, Klemens et al. 2013, Schulz et al. 2011, Yamada et al. 2010, Kiyosue et al., 1998, Quirino et al. 2001, Remy et al. 2014, Poschet et al. 2011, Wingenter et al. 2011, Wormit et a. 2006 et Aluri and Büttner, 2016. Cercles en traits pleins = transporteur localisé sur le tonoplast, cercles en traits pointillés = transporteurs putativement localisé sur le tonoplast.

d'*AtERDL6* est en corrélation avec l'état glucidique des cellules qui requièrent l'accès au pool de sucres vacuolaire (Poschet et al. 2011). La comparaison des courants induits par le glucose déterminés par des analyses de patch-clamp réalisées sur des vacuoles isolées d'un double mutant *attmt1/attmt2* et d'un triple mutant *attmt1/attmt2/aterdl6* a permis de démontrer que le transporteur ERDL6 est un symporteur H⁺/glucose responsable de l'export du glucose de la vacuole vers le cytosol (Klemens et al. 2013).

Sur la base des 6 *AtERD6-like* étudiés, il s'avère que les *ERD6-like* semblent avoir des profils d'expression très variés et répondre à différents stress abiotiques. De plus, la localisation vacuolaire des membres de la famille ERD6-like, même si elle n'est pas prouvée pour les 19 ERD6-like identifiés chez *A. thaliana*, est confortée par la présence d'un motif di/tri-leucine dans la partie N terminale des séquences protéiques.

1.3 Les transporteurs de sucres impliqués dans le transport intracellulaire

Au sein d'une cellule, le transport des sucres sous forme de disaccharides et de monosaccharides est nécessaire entre les compartiments cellulaires et permet leur accumulation ou leur remobilisation au niveau vacuolaire. En effet, les sucres sont stockés dans la vacuole où ils vont avoir un rôle en tant qu'osmolytes. Ils peuvent aussi, dans certaines conditions, être remobilisés afin de participer au métabolisme. Ces transferts nécessitent l'implication de transporteurs de sucres pour le passage à travers les différentes membranes biologiques.

La vacuole est un organe représentant 90 % du volume des cellules végétales lorsque les conditions hydriques permettent aux cellules d'être en turgescence. La vacuole est délimitée par sa propre membrane nommée tonoplaste, dans lequel sont enchassées, entre autres, diverses protéines de transport : canaux, pompes et transporteurs. Les transporteurs de sucres participent au transport intracellulaire entre la vacuole et le cytosol. La figure 3, fait l'état des lieux actuel des rôles des transporteurs vacuolaires de sucres décrits précédemment dans l'introduction (Hedrich et al. 2015).

La remobilisation des sucres est une réponse importante des plantes au déficit hydrique, permettant les ajustements osmotiques mais aussi le maintien de la croissance des racines.

2 La relation plante/eau : hydratation et réponses des plantes au déficit hydrique

Les plantes consomment de l'eau en grandes quantités. Cette eau, absorbée par les racines (97 %), est perdue par évaporation au niveau des feuilles au cours de la transpiration. Une faible part de l'eau absorbée reste dans la plante afin d'assurer la croissance (2%) ou d'être consommée par les réactions biochimiques telles que de la photosynthèse et d'autres processus métaboliques (1%) (Taiz and Zeiger 2010).

2.1 Le trajet de l'eau dans les plantes

La demande évaporative et la disponibilité en eau régulent le flux d'eau dans la plante.

2.1.1 Trajet de l'eau du sol vers la plante

L'eau provenant du substrat est absorbée par la plante au niveau des racines (principalement par les poils absorbants mais aussi au niveau des pointes racinaires qui sont moins subérisées) et est un phénomène physique en lien avec le potentiel hydrique du sol et des racines. Le potentiel hydrique (ou disponibilité en eau), noté Ψ_w , est la résultante de quatre composantes : le potentiel osmotique (Ψ_s), la pression hydrostatique (Ψ_p), le potentiel gravitationnel (Ψ_g) et le potentiel matriciel (Ψ_m). La formule permettant de calculer le potentiel hydrique est $\Psi_w = \Psi_s + \Psi_p + \Psi_g + \Psi_m$. Toutefois, pour les plantes herbacées, celle-ci peut être réduite à $\Psi_w = \Psi_s + \Psi_p$ car Ψ_g est négligeable jusqu'à des hauteurs de 5 à 10 mètres et Ψ_m est aussi négligeable sauf pour des états de déshydratation extrêmes. Le potentiel osmotique Ψ_s est représentatif de la concentration en solutés. Ψ_s est l'inverse de la pression osmotique π ($\Psi_s = -\pi$) qui se calcule par la formule RTC_s (J/L). R est la constante des gaz parfaits (8,32 J/mol/K), T est la température absolue (K), et C_s la concentration de la solution (mol/L). Ainsi, plus il y a de solutés dans l'eau, plus la pression osmotique augmente et plus le potentiel hydrique diminue. Le potentiel hydrostatique est directement lié à la pression de turgescence. Un Ψ_p positif augmente le Ψ_w et un Ψ_p négatif le diminue. Le Ψ_w de l'eau pure à 20°C est de 0 MPa, c'est la valeur maximale que peut prendre le Ψ_w . Ainsi, l'eau circule par osmose d'un potentiel hydrique négatif vers un potentiel hydrique plus négatif. Dans les feuilles de plantes herbacées arrosées régulièrement Ψ_w a une valeur comprise entre -0,2 et -1,0 MPa (Taiz and Zeiger 2010). De plus, le flux d'eau (J_v) engendré par un gradient de potentiel hydrique à travers une barrière physique (membrane, cellule, tissu) est proportionnel à la conductivité hydraulique de la barrière (à sa perméabilité à l'eau) qui est régulé de manière physiologique. Le flux d'eau peut être défini par la formule $J_v = S.L.p.\Delta\Psi$.

Pour la plupart des plantes, la zone d'absorption de l'eau par les plantes est la zone de différenciation des racines ou zone des poils absorbants. Ces derniers ayant un faible diamètre facilitent la pénétration dans les espaces capillaires du sol ; de plus, ils augmentent le diamètre du cylindre d'absorption de deux fois leur longueur. Pour les plantes dépourvues de poils absorbants, l'absorption de l'eau peut se réaliser soit par un manchon de mycélium de champignons symbiotiques, soit par des microfractures, notamment dans les racines subérisées. L'absorption de l'eau par les racines provoque une diminution du potentiel hydrique de la solution du sol à proximité des racines créant ainsi un gradient de potentiel hydrique entre les parties du sol proches des racines et les autres. Ce gradient est alors à l'origine d'une tension qui attire l'eau du sol vers les racines ; la plante exerce donc une attraction de l'eau de la solution du sol appelée succion.

2.1.2 *Trajet de l'eau dans le cortex jusqu'aux vaisseaux du xylème*

Pour pouvoir être transportée vers les parties aériennes, l'eau doit atteindre le xylème, localisé dans le cylindre central séparé du cortex par l'endoderme. Trois voies sont empruntables par les molécules d'eau afin d'entrer dans le cylindre central :

- La voie symplastique : elle correspond à un réseau cytoplasmique formé par les cellules interconnectées au niveau des plasmodesmes. L'eau peut traverser le cortex *via* ces plasmodesmes,
- La voie apoplastique : elle est constituée d'un réseau continu de parois cellulaires, espaces intercellulaires et cellules mortes (xylème). L'eau peut emprunter cette voie pour se rendre au cylindre central, sans jamais traverser de membrane cellulaire,
- La voie transmembranaire : dans ce cas, l'eau traverse chaque cellule jusqu'au cylindre central, y entre et en sort en traversant la membrane plasmique et le tonoplaste.

Au niveau de l'endoderme, les mouvements d'eau à travers l'apoplaste sont bloqués par le cadre de Caspari (bande composée de subérine, substance hydrophobe et cireuse, déposée au niveau des parois cellulaires radiales). L'eau et les solutés traversent donc les membranes plasmiques de ces cellules afin d'arriver au cylindre central en grande partie grâce aux aquaporines. Il s'agit de protéines ayant une fonction de canaux, enchâssés à travers les membranes biologiques et facilitant l'influx ou l'efflux d'eau (Maurel et al. 2015). Les aquaporines sont nécessaires au niveau de l'endoderme, à cette étape de traversée de l'apoplaste par l'eau.

2.1.3 *Le continuum sol-plante-atmosphère*

Les racines absorbent l'eau et les ions du sol et transportent ces ions en même temps que l'eau jusqu'au xylème. L'arrivée de ces solutés dans le xylème entraîne une diminution du potentiel osmotique du xylème et, par conséquent, une diminution du potentiel hydrique, ce qui va provoquer une absorption d'eau dans le xylème. Ceci aboutit à une pression hydrostatique positive dans le xylème appelée pression racinaire. C'est cette pression racinaire qui, combinée à la transpiration, permet la montée d'eau par le xylème dans toutes les parties de la plante. Néanmoins, le rôle de la pression racinaire dans la montée d'eau dans la plante, est moindre dans des conditions où la transpiration est importante. Dans ce cas, l'eau est en quelque sorte « tirée » vers le haut par la demande évaporative. En effet, la pression hydrostatique dans le xylème, au niveau de la partie apicale, est négative, alors que, dans la partie basale, elle est positive, ce qui développe une grande force de tension, qui « tire » l'eau dans le xylème et participe à son transport dans la plante (montée de sève brute). C'est la théorie de tension-cohésion de l'ascension de la sève brute.

L'eau, une fois dans les vaisseaux du xylème est transportée vers les parties aériennes où une infime partie sera utilisée pour le métabolisme et la grande majorité sera transpirée en dehors de la plante, par le biais des stomates.

2.1.4 *La régulation de l'ouverture des stomates*

L'ouverture et la fermeture des stomates sont des processus mécaniques dus à la pression de turgescence ou sa chute dans les cellules de garde.

L'accumulation d'ions potassium (K^+) (Fischer and Hsiao 1968; Fujino 1967) sucres et d'anions (Cl^- , NO_3^- , malate) (Poffenroth et al. 1992; Talbott and Zeiger 1998) dans les cellules de garde entraîne une diminution de leur potentiel hydrique, et provoque une absorption d'eau dans ces cellules. L'absorption d'eau en grande quantité conduit à la turgescence des cellules de garde, menant à l'ouverture de l'ostiole, due à la réorganisation des microfibrilles dans les cellules de garde qui se contractent d'autant plus que la pression de turgescence est élevée. Ceci est rendu possible par le fait que la paroi des cellules de garde est plus épaisse du côté de l'ostiole.

La lumière est la base des mécanismes conduisant à l'ouverture des stomates. La combinaison de lumière bleue à faible intensité et de lumière rouge à forte intensité est nécessaire à l'ouverture des stomates la plus efficace possible et la plus rapide possible (Shimazaki et al. 2007). La réception de la lumière bleue par les phototropines PHOT1 et PHOT2 (Kinoshita et al. 2001) entraîne une augmentation de la concentration en calcium

(Ca²⁺) sans oscillation dans le cytosol (Baum et al. 1999; Harada and Shimazaki 2007; Stoelzle et al. 2003) mais aussi de protéines kinases (Pei et al. 1996). Au final, le signal envoyé par la lumière bleue aux cellules de garde aboutit à l'activation de pompes à protons (H⁺/ATPases), phosphorylées par les protéines kinases (Kinoshita and Shimazaki 1999), qui permettent la sortie des ions H⁺ conduisant à un gradient de protons et à une hyperpolarisation de la membrane plasmique des cellules de garde. Cette hyperpolarisation induit l'entrée d'ions potassium (K⁺) et d'anions dans la cellule de garde (Lebaudy et al. 2008) et par conséquent une diminution du potentiel hydrique. L'absorption de l'eau par la cellule est alors favorisée pour ajuster l'osmolarité par rapport au milieu extérieur, ce qui aboutit à la turgescence des cellules de garde et à l'ouverture des stomates. Ce mécanisme est tributaire de l'énergie apportée par la production d'ATP dans les mitochondries. Néanmoins, un autre mécanisme peut apporter l'ATP nécessaire au maintien de l'hyperpolarisation de la membrane et donc, à l'entrée de K⁺ et d'anions dans les cellules de garde : il s'agit de la synthèse d'ATP par les chloroplastes des cellules de garde lors de processus de photophosphorylation (Shimazaki et al. 1986) qui sont induits par la lumière rouge. Dans les chloroplastes des cellules de garde, la dégradation de l'amidon en saccharose induite par la lumière bleue remplace, dans l'après-midi, l'accumulation de K⁺ pour permettre le maintien de l'ouverture des stomates pendant toute la journée (Tallman and Zeiger 1988; Talbot and Zeiger 1998). Puisque les cellules de garde possèdent peu de pigments chlorophylliens et que l'activité de la Rubisco (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase) y est faible, il est peu probable que tout le saccharose permettant de maintenir les stomates ouverts soit produit par les cellules de garde elles-mêmes. L'hypothèse d'un import, à partir de l'apoplaste, de saccharose et/ou d'hexoses provenant de la photosynthèse des cellules du mésophylle doit être envisagée (Vavasseur and Raghavendra 2005). Deux transporteurs *AtSTP1* et *AtSUC3* pourraient être impliqués dans l'import de sucres des cellules voisines vers les cellules de garde permettant ainsi indirectement le maintien de l'ouverture des cellules de garde le jour (Stadler et al. 2003; Meyer et al. 2004). Pour compenser les charges positives accumulées par l'entrée de K⁺ dans les cellules de garde, du malate²⁻ est synthétisé (majoritairement par dégradation de l'amidon) et des ions chlorure (Cl⁻) et nitrate (NO₃⁻) sont importés dans les cellules de garde. L'accumulation de ces anions est indispensable au mécanisme d'ouverture des stomates par accumulation de K⁺ (Shimazaki et al. 2007).

L'ouverture des stomates permet les échanges gazeux entre l'intérieur de la plante et l'atmosphère. Le CO₂ entre dans la plante et l'eau s'en évapore.

2.2 *Les réponses physiologiques au déficit hydrique*

Un déficit hydrique peut être perçu par la plante lors d'une période de sécheresse, c'est-à-dire lorsque les précipitations sont insuffisantes, ou que la température de l'air est importante, ou par une combinaison de ces deux conditions. La composition du substrat peut aussi être à l'origine d'une faible disponibilité en eau pour les plantes. C'est le cas notamment des sols très drainants ou calcaires, des sols rocheux et sablonneux. Les conditions de salinité du sol peuvent aussi influencer sur la disponibilité en eau en diminuant le potentiel osmotique de la solution du sol et par conséquent en diminuant son potentiel hydrique. Pour les plantes, un déficit hydrique est perçu lorsque la demande évaporative au niveau des feuilles est plus importante que la disponibilité de l'eau dans le sol, et donc, que la capacité d'absorption d'eau par les racines (Blum 2011; Bray 1997).

Lors d'un déficit hydrique, le Ψ_w du sol diminue, ce qui entraîne la diminution du Ψ_w de la plante. Dans le cas où la plante ne transpire pas, le Ψ_w de la plante s'équilibre avec la couche du sol la plus humide explorée par les racines (Améglio et al. 1999). Dans ces conditions, plus la plante transpire, plus le Ψ_w de la plante diminue.

Trois catégories de plantes peuvent être définies en relation avec la disponibilité en eau dans le sol de leur niche écologique naturelle. Les hydrophytes sont des plantes adaptées à la vie dans un milieu aquatique, les xérophytes ont développé des mécanismes d'adaptation à la vie en milieu sec et les mésophytes sont des plantes adaptées à divers milieux dans lesquels l'apport d'eau est constant et modéré, aussi bien au niveau du sol que de l'humidité de l'air, avec cependant des changements saisonniers, comme c'est le cas dans les zones tempérées (Warming 1909).

Le déficit hydrique provoque un stress pour les plantes conduisant à diverses réponses, selon le type de plante concerné (Lawlor 2012). Ces réponses dépendent du type de stratégie de résistance vis-à-vis d'un déficit hydrique mis en place par la plante. Ces réponses surviennent à différents niveaux de la plante : morphologique, anatomique, physiologique et biochimique (Blum 2011). Il existe différents types de stratégies de résistance des plantes au déficit hydrique (Lawlor 2012) :

- **L'échappement** (Drought escape): cette stratégie consiste à faire coïncider les phases de croissance avec la disponibilité en eau, dans un environnement où les

apports sont rythmiques, au fil des saisons. Par exemple, chez les plantes cultivées annuelles telles que les céréales, la croissance végétative peut exploiter la période des pluies et la maturation des grains a lieu lors des périodes plus sèches (Lawlor 2012).

- L'**évitement** (Drought avoidance): les plantes se développent lors de périodes de sécheresse mais vont maintenir leur statut hydrique par : i) restriction des pertes en eau (réduction de la surface foliaire, réduction de la transpiration, enroulement des feuilles, sénescence des plus vieilles feuilles lorsque le déficit hydrique devient sévère). En général, la productivité diminue car il y a réduction de l'efficacité de la photosynthèse (Hsiao and Acevedo 1974; Sherrard and Maherali 2006), ii) développement d'un système racinaire plus dense et plus étendu pour optimiser l'absorption d'eau, iii) stockage de réserves d'eau dans certains organes comme le tronc (baobabs).
- La **survie** (Drought survival): forme de résistance pour laquelle, les cellules quiescentes, c'est-à-dire ayant arrêté leur croissance face au déficit hydrique, restent dans un état assurant les fonctions métaboliques clefs et peuvent retrouver rapidement leur état d'avant le déficit hydrique lorsqu'un apport d'eau aura lieu, sans dommages sérieux. Certaines mésophytes pourraient avoir développé des mécanismes de survie à la sécheresse (Lawlor 2012). Par exemple, *Craterostigma plantagineum* est capable, après ré-arrosage, de reprendre sa croissance normale même après avoir presque complètement séché. Ceci serait dû à une forte accumulation d'osmolytes compatibles et de protéines LEA (Late Embryogenesis Abundant) (Scott 2000). La tolérance à la dessiccation acquise chez les mousses, en tant que premières plantes terrestres et dérivées des algues vertes, est à l'origine des mécanismes de survie qu'ont développés certaines Angiospermes. La tolérance à la dessiccation est néanmoins perdue chez 99,8 % des Angiospermes sauf dans les graines qui utilisent des programmes développementaux spécifiques dérivés de la tolérance à la dessiccation des premières plantes terrestres. Les Angiospermes tolérantes à la dessiccation (0,2% des Angiospermes) réactiveraient ces programmes développementaux perdus dans les organes végétatifs (Farrant and Moore 2011).
- La **tolérance** (Drought tolerance): mise en place de mécanismes permettant de supporter le manque d'eau en maintenant la turgescence par l'accumulation d'ions et de molécules servant d'osmoprotectants. Le potentiel osmotique diminue grâce

à l'accumulation de molécules appelées solutés ou osmolytes compatibles (Hare et al. 1998; Morgan 1984). Le flux hydrique dans les cellules est maintenu par le biais de l'activité des aquaporines, transporteurs d'eau facilitant son apport par la voie transmembranaire (Maurel et al. 2008).

Ces catégories de stratégies de résistance au stress hydrique ne s'excluent pas entre elles puisqu'en réalité les plantes vont pouvoir combiner de différentes façons un large éventail de types de réponses au stress hydrique (Ludlow et al. 1989). En principe toutes les plantes sont capables de répondre au déficit hydrique modéré mais seules certaines plantes mettent en place des stratégies afin de faire face au déficit hydrique sévère.

Les principaux mécanismes permettant aux plantes de limiter les dégâts causés par un manque d'eau visent soit à limiter les pertes d'eau, soit à optimiser l'absorption d'eau, ou bien encore à faire des réserves d'eau. Certaines plantes ne répondent qu'à l'un de ces trois buts, alors que d'autres vont pouvoir jouer physiologiquement sur une combinaison de mécanismes menant à améliorer chacun de ces trois processus.

2.2.1 Limitation des pertes en eau

La fermeture des stomates et l'arrêt de la croissance des parties aériennes des plantes sont les premiers effets du déficit hydrique au niveau des feuilles (Damour et al. 2010; Chaves 1991). L'arrêt de croissance et la fermeture des stomates participent à la limitation des pertes en eau par des mécanismes différents :

- **Limitation de la perte en eau par réduction de la croissance des feuilles :** l'arrêt de l'expansion cellulaire constitue la première réponse de croissance au déficit hydrique (Hsiao 1973). Cela aboutit à une réduction de la croissance des feuilles, amenant à une réduction de la taille de la partie aérienne de la plante, laissant moins de surface exposées à la lumière et à l'environnement, et de ce fait, moins de zones de transpiration (Simonneau et al. 2017). La conformation des feuilles (enroulement et flétrissement) joue aussi sur la limitation de la transpiration en limitant l'échauffement et en faisant diminuer la demande évaporative (Simonneau et al. 2017).
- **Limitation de la perte en eau par la fermeture des stomates :** la fermeture des stomates est un mécanisme dynamique survenant de façon précoce lors du déficit hydrique. La fermeture des stomates est couramment observée chez les

plantes soumises à un déficit hydrique. Ce mécanisme a été rapporté chez de nombreuses plantes comme par exemple *O. sativa* (riz) (Blouin et al. 2007), *V. vinifera* (vigne) (Flexas et al. 2004), *P. vulgaris* (haricot) (França et al. 2000; Martínez et al. 2007), *G. max* (soja) (Liu et al. 2005), *S. lycopersicum* (tomate) (Galmes et al. 2013), *S. tuberosum* (pomme de terre) (Liu et al. 2006) et *A. thaliana* (Harb et al. 2010). L'hormone acide abscissique (ABA) joue un rôle très important dans le contrôle de la fermeture des stomates. L'ABA induit la fermeture et inhibe l'ouverture des stomates.

Chez *Heliantus annuus* lorsque le sol est sec, la concentration en acide abscissique (ABA) dans les racines augmente et cette augmentation s'accompagne de la fermeture des stomates (Davies and Zhang 1991). Il a été montré chez *Zea mays* (maïs) que la diminution du potentiel hydrique du sol (lorsque la quantité d'eau disponible y est moins importante), est à l'origine de l'accumulation d'ABA dans les racines, que ce soit au niveau des pointes racinaires, de la racine principale, ou des racines secondaires (Simonneau et al. 1998). En effet, un potentiel hydrique du sol estimé entre -0,2 et -0,3 MPa chez *Z. mays* s'accompagne d'une accumulation d'ABA dans les racines (Zhang and Davies 1989). Chez *Commelina communis*, des expériences de « split-root » dans lesquelles une partie du système racinaire des plantes est soumise à un déficit hydrique, ont montré que l'accumulation d'ABA dans les racines soumises à un déficit hydrique est corrélée avec l'augmentation de la concentration d'ABA dans l'épiderme foliaire et s'accompagne de la réduction de la conductance stomatique, liée à la fermeture des stomates (Zhang and Davies 1987). Néanmoins, une production accrue d'ABA dans les racines n'est pas nécessaire à la fermeture des stomates, comme cela a été démontré par des expériences de greffes chez *Solanum lycopersicum* (tomate) entre des sauvages et des mutants (*flacca* et *sitiens*), déficients vis-à-vis de la production d'ABA. En effet, les auteurs démontrent que, lors d'un déficit hydrique, la conductance stomatique (Holbrook et al. 2002) reste plus élevée chez les mutants déficients en production d'ABA que chez le sauvage et ce, quel que soit le génotype des racines greffées (sauvage ou mutant). Ces résultats sont en accord avec une étude antérieure chez le tournesol (Fambrini et al. 1995). De plus, lors d'un déficit hydrique perçu par les racines, l'accumulation en ABA augmente dans les plantules d'*A. thaliana* essentiellement au niveau des feuilles, par le biais de l'activation de gènes et d'enzymes de la voie de biosynthèse de l'ABA (Christmann et al. 2005). Un signal allant des racines vers les feuilles est probablement à l'origine de l'accumulation d'ABA dans les feuilles des plantes soumises à

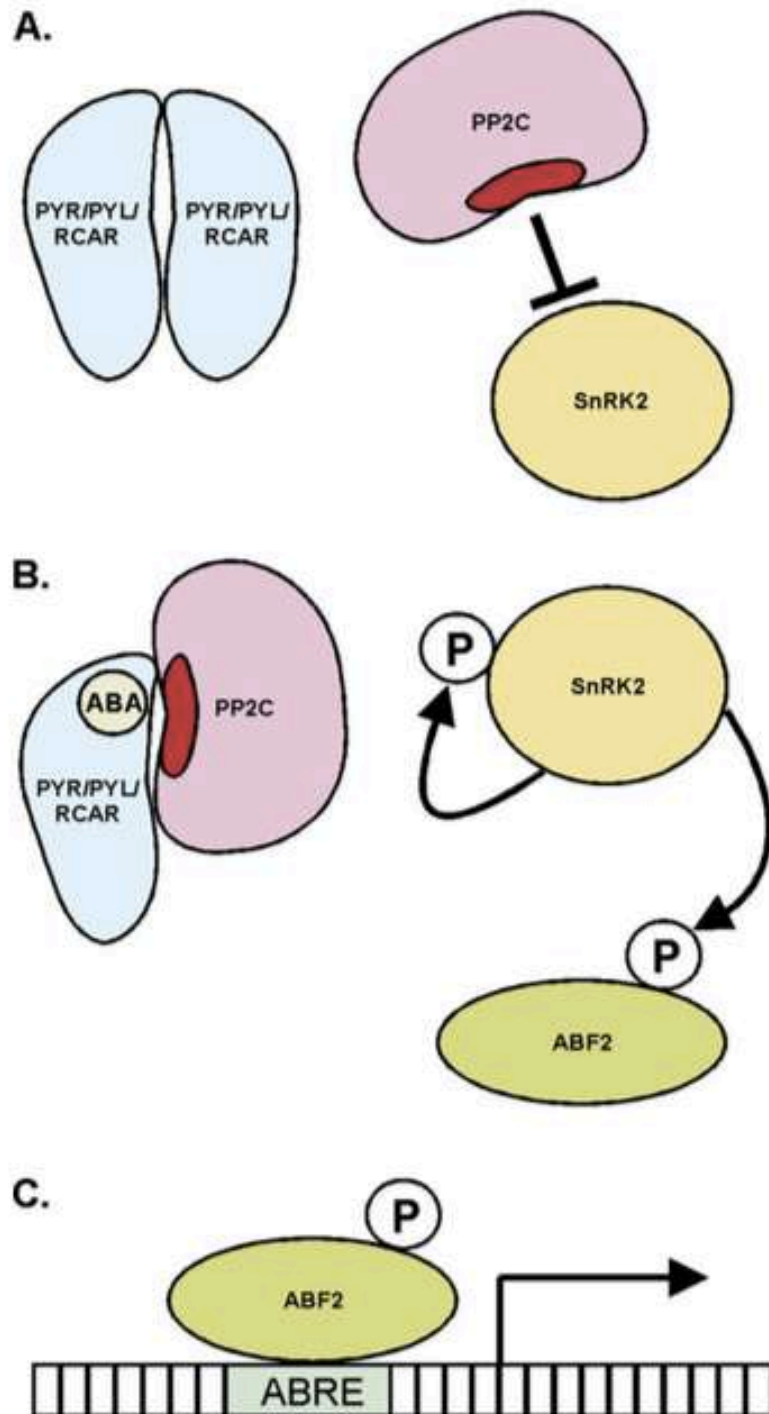
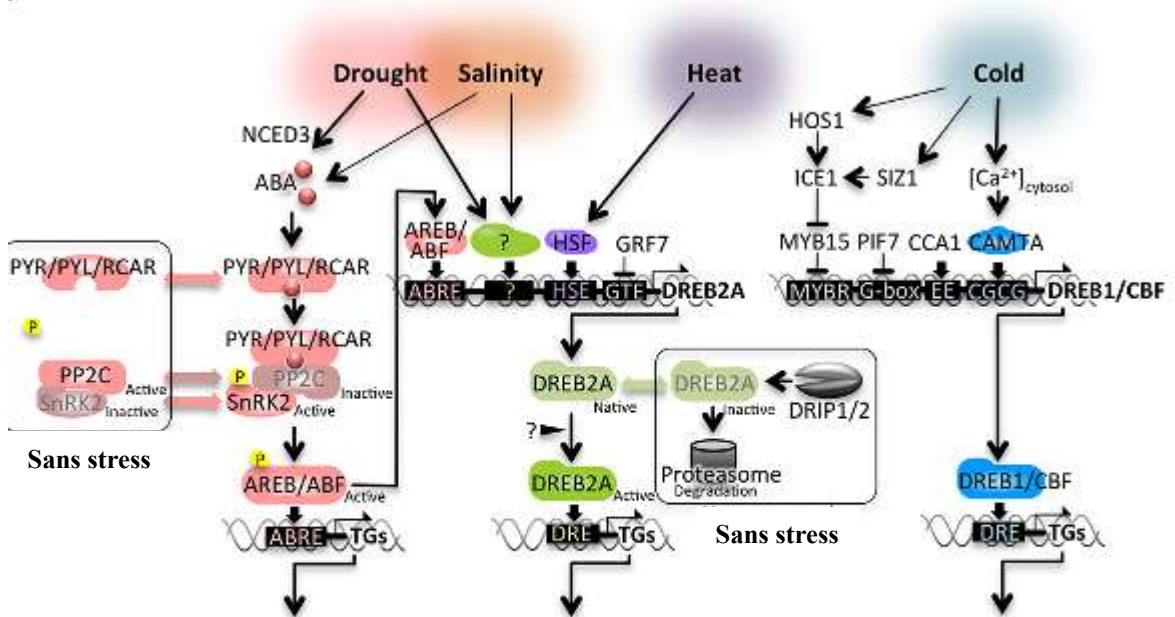


Figure 4 : schéma d'activation des gènes de réponses à l'acide abscissique (ABA). A : en absence d'ABA le récepteur PYR/PYL/RCAR n'interagit pas avec la phosphatase PP2C qui empêche donc la phosphorylation de la kinase SnRK2. B : en présence d'ABA qui se fixe sur PYR/PYL/RCAR, la phosphatase PP2C est réquisitionnée par le complexe ABA/PYR/PYL/RCAR et ne permet plus d'empêcher la phosphorylation de SnRK2, qui peut alors d'autophosphoryler et phosphoryler ABF2, un facteur de transcription. C ABF2 se fixe sur les promoteurs des gènes de réponse à l'ABA afin d'induire l'expression de ces gènes et d'engendrer les réponses à l'ABA.

une carence en eau (Holbrook et al. 2002; Wilkinson and Davies 2002; Christmann et al. 2005; Christmann et al. 2007). Néanmoins, l'ABA transporté des racines vers les parties aériennes n'est pas le signal permettant l'accumulation accrue d'ABA dans les feuilles afin de limiter la conductance stomatique. Un signal de nature hydraulique précéderait et conduirait à l'accumulation d'ABA dans les feuilles, accumulation qui serait à l'origine de la fermeture des stomates (Christmann et al., 2007). Ce signal de transduction reste encore à éclaircir de façon plus précise (Simonneau et al., 2017), toutefois, une étude immuno-histochimique (basée sur l'utilisation d'anticorps) a permis de localiser chez *A. thaliana* les enzymes-clés de la voie de biosynthèse de l'ABA : *AtNCDE3*, *AtABA2* et *AtAAO3* au niveau des cellules du parenchyme xylémien (Endo et al. 2008). Ces trois enzymes participent à la voie de biosynthèse de l'ABA. De plus, *AtNCED3* l'enzyme de clivage du sesquiterpène précurseur de l'ABA, est exprimé spécifiquement dans les cellules du parenchyme xylémien lors d'un stress hydrique. Le signal hydraulique (osmotique) menant à l'accumulation d'ABA dans les feuilles en réponse à un déficit hydrique est donc potentiellement perçu au niveau des cellules des tissus vasculaires de la plante (Endo et al., 2008). Il a été montré que la sève xylémienne a un pH plus élevé dans les plantes lorsque le potentiel hydrique de sol diminue jusqu'au déficit (pH autour de 6,3 chez les plantes en général, et autour de 7,2 chez les plantes en carence en eau) (Wilkinson 1999). Depuis, une multitude d'études suggère que le premier signal nécessaire à la fermeture des stomates est cette alcalinisation de la sève xylémienne (sève brute). De ce fait, l'influx d'ABA dans les compartiments symplastiques (comme les cellules du mésophylle des feuilles par exemple) est défavorisé en faveur d'une accumulation préférentielle d'ABA dans les cellules de garde de l'épiderme, qui sont isolées symplastiquement des autres cellules (Wilkinson and Davies 2002; Wang et al. 2011). L'ABA est un acide faible : il y a prédominance de la forme protonée en présence de pH acide et *vice versa*, de la forme déprotonée en pH neutre à légèrement basique. Comme tous les acides faibles, la forme protonée peut traverser la bicouche lipidique de la membrane plasmique, d'où la redistribution de l'ABA dans les cellules du mésophylle en conditions normales d'hydratation, et la diminution de sa concentration en arrivant au niveau des cellules de garde des stomates. Lors d'un déficit hydrique le changement du pH de la sève xylémienne vers des valeurs légèrement basiques (autours de 7,0 – 7,5), favorise la forme déprotonée, qui ne peut pas traverser les structures membranaires et reste piégée dans les compartiments apoplastiques, dont la sève xylémienne et, arrive en forte concentration, au niveau des cellules de garde des stomates.



Augmentation de la résistance aux stress et retard de la croissance de la rosette

Figure 5 : activation de gènes de réponses à la sécheresse, au stress salin, à la chaleur et au froid, par les voies dépendantes et indépendantes de l'acide abscissique. Drought = sécheresse, Salinity = stress salin, Heat = températures chaudes, cold = stress froid, TGs = gènes cibles D'après Todaka et al., 2015.

Dans les cellules de garde, la perception de l'ABA est effectuée par les récepteurs protéiques de la famille PYR/PYL/RCAR, capables de fixer l'ABA et de déclencher une voie de signalisation (Ma et al. 2009; Park et al. 2009). Après la fixation de l'ABA en tant que ligand sur ces récepteurs solubles, ces derniers interagissent et inhibent le clade-A des protéines phosphatases 2Cs : ABA-insensitive 1 (ABI1), ABA-insensitive 2 (ABI2), hypersensitive to ABA 1 (HAB1) et la Protéine phosphatase 2CA (PP2CA), des régulateurs négatifs de la signalisation de l'ABA (Wang et al. 2000). En l'absence d'ABA, les protéines phosphatases PP2Cs inhibent l'activité de la sérine-thréonine protéine kinase SnRK2 (SnF1-Sucrose non fermenting 1 related protein kinase 2) spécifique, nommée OST1 (Open STOMATA 1) en la déphosphorylant (Joshi-Saha et al. 2011) (Brandt et al. 2012). La formation d'un complexe ABA/Récepteur/PP2Cs inhibe l'activité des PP2Cs et favorise celle de SnRK2. SnRK2 active à son tour les facteurs de transcription de type ABF (ABA Responsive element Binding Factors), tels que ABI3 et ABI5, en les phosphorylant. À leur tour les facteurs de transcription activés induisent l'expression des gènes cibles en se fixant sur les éléments *cis* de réponse à l'ABA (ABRE) de leurs promoteurs (figure 4) (Klingler et al. 2010; Boneh et al. 2012). Il existe également une voie de signalisation indépendante de l'ABA dans la réponse aux stress abiotiques et notamment au stress hydrique. Les facteurs de transcription DREB2 (Dehydration Responsive Element-Binding 2) sont impliqués dans cette voie indépendante de l'ABA. Chez *A. thaliana* DREB2A et DRREB2B sont fortement induits par la sécheresse, les fortes concentrations en sel et la chaleur. En conditions normales, lorsque la plante n'est soumise à aucun de ces trois stress abiotiques, DREB2A est dégradé par ubiquitination. Un autre facteur de transcription, DREB1, est impliqué dans la réponse des plantes au stress par le froid, dans une voie de réponse indépendante de l'ABA. La figure 5 montre le réseau de signalisation régulé par les facteurs de transcription de type ABF, DREB2 et DREB1, impliqués dans la réponse des plantes aux stress abiotiques.

S'ensuit une cascade d'évènements aboutissant à des changements osmotiques dans les cellules de garde, permettant une perte de turgescence qui résulte nécessairement en la fermeture stomatique (Joshi-Saha, 2011). L'un des premiers évènements déclenché par l'ABA est la production de ROS (reactive oxygen species), parfois appelée « burst oxydatif » et qui stimule la libération de Ca^{2+} des stocks internes dans le cytoplasme et son influx à travers la membrane plasmique par le biais de canaux calciques entrants (Cho et al. 2009). Des oscillations de la concentration interne en Ca^{2+} cytosolique (McAinsh et al. 1997) (Blatt et al., 2000) amènent au processus de fermeture des stomates. Le Ca^{2+} active les canaux anioniques permettant la libération d'anions (Cl^- , NO_3^- , malate) vers l'apoplaste et cause une

dépolarisation de la membrane plasmique (Blatt 2000; Schroeder et al. 2001; Roelfsema and Hedrich 2005; Pandey et al. 2007; Sirichandra et al. 2009). La sortie des anions de la vacuole et de la cellule entraîne la sortie des molécules d'eau stockées dans ce compartiment par le biais des aquaporines. La perte de turgescence des cellules de garde entraîne la fermeture de l'ostiole. Ce processus est aussi accompagné par la réorganisation de l'actine (Jiang et al. 2012) et la dépolymérisation des microtubules (Jiang et al. 2014). Le Ca^{2+} prévient également l'hyperpolarisation de la membrane plasmique en inhibant les pompes à protons requises pour l'ouverture des stomates.

L'accumulation d'oxyde nitrique (NO) dans les cellules de garde contribue également à la fermeture des stomates (Simonneau et al., 2017). Le NO joue un rôle dans la fermeture stomatique, en intervenant dans la voie de transduction en amont du signal Ca^{2+} , impliqué dans les conséquences du burst oxydatif (apoptose, fragmentation de l'ADN, chloroses). De plus, le NO est présent dans la voie de transduction amenant du stress hydrique à l'activation de protéines LEA qui participent à la tolérance au stress hydrique (Garcia-Mas et al. 2012).

La fermeture des stomates et la réduction de la taille des parties aériennes chez les plantes ressentant un déficit hydrique n'aboutissent pas uniquement à une limitation des pertes en eau mais permettent également de lutter contre les phénomènes de cavitation qui ont lieu dans le xylème des plantes en déficit hydrique. Lorsqu'une forte demande évaporative est combinée à un fort dessèchement du sol, des bulles d'air se forment dans le xylème et cassent le flux d'eau (Sack and Holbrook 2006) (Brodersen and McElrone 2013). Ces bulles d'air sont aussi appelées embolies. Le phénomène d'embolisation des vaisseaux diminue la conductivité de ces derniers et aboutit à la chute du potentiel hydrique des feuilles. Si la surface foliaire ne diminue pas et que les stomates ne se ferment pas, le phénomène de cavitation endommage sévèrement le système conducteur des plantes et de manière irréversible. Les conséquences de la déshydratation pour les plantes sont dramatiques et amplifiées par la cavitation (Brodrigg and Cochard 2009; Zufferey et al. 2011). Ces conséquences peuvent causer la mort de l'organisme (McDowell et al. 2008). Des études ont montré que la nuit, la capacité de transport d'eau après cavitation peut être restaurée par la diminution de transpiration. L'eau remplit à nouveau les vaisseaux du xylème. Cela est attribué à la fermeture des stomates et a été observé chez de nombreuses espèces (Sperry et al. 2002; Simonneau et al. 2017). Selon les espèces, et selon la hauteur de la plante et le diamètre de son système de transport de l'eau, les phénomènes de cavitation peuvent être plus ou moins fréquents.

2.2.2 *Optimisation de l'absorption d'eau*

Afin de compenser les pertes d'eau et de lutter contre le déficit hydrique, les plantes peuvent accroître leur système racinaire en densité et en profondeur, ce qui leur permet d'aller chercher l'eau plus profondément, et de trouver de nouvelles source d'eau disponibles. La diminution de croissance des parties aériennes lors d'un stress hydrique n'est pas forcément corrélée à une diminution de la croissance du système racinaire de même ampleur (Chaves et al. 2002; Sharp et al. 2004). Il a été montré que, bien que la croissance et la surface des feuilles soient diminuées lors d'un déficit hydrique ainsi que la conductance stomatique, la photosynthèse n'est impactée que plus tardivement et donc, les assimilats issus de la photosynthèse (les sucres) sont en grande partie redistribués des organes sources (feuilles matures) vers les organes puits (principalement les racines lors d'un déficit hydrique), permettant ainsi de maintenir la croissance racinaire, qui est moins affectée par le déficit hydrique que la croissance des feuilles (Hummel et al. 2010; Muller et al. 2011; Durand et al. 2016). De plus, l'ABA jouerait un rôle de signal dans les racines, entraînant des modifications de l'architecture racinaire, pour permettre à la plante d'aller puiser de l'eau dans les réserves du sol (Xiong et al. 2006; Roycewicz and Malamy 2012).

2.2.3 *Maintien de l'eau dans les cellules*

Les ajustements osmotiques dans les cellules permettent, même s'il y a peu d'eau disponible et transportée dans la plante, de maintenir l'eau dans les cellules en augmentant la concentration en solutés osmo-compatibles ou osmolytes compatibles (substances organiques fortement solubles et n'interférant pas avec le métabolisme cellulaire mêmes à des fortes concentrations). Ainsi la pression osmotique augmente ce qui fait diminuer le potentiel hydrique des cellules et ainsi limite l'efflux d'eau en dehors de la cellule. Cela permet aux cellules de garder une pression de turgescence leur permettant de croître (expansion cellulaire) (Hare et al. 1998). Ces solutés s'accumulent dans la vacuole et peuvent être de natures variées. Les solutés impliqués dans les ajustements osmotiques en réponse à une diminution du potentiel hydrique du sol sont : les ions K^+ , certains acides aminés (proline), des composés d'ammonium quaternaire (glycine-bétaïne, alanine-bétaïne) ainsi que des sucres (hexoses, saccharose et polyols) (Munns 2002; Moore et al. 2008; Hummel et al. 2010; Mewis et al. 2012).

En ce qui concerne les sucres, le saccharose est accumulé de façon très importante chez la plante reviviscente *C. plantagineum* (Scott 2000). Une accumulation de sucres solubles a été démontré chez de nombreuses plantes et notamment chez la plante modèle *A.*

thaliana, il est classiquement observé une accumulation de sucres solubles essentiellement sous forme d'hexoses et de saccharose, dans les feuilles en condition de stress hydrique (Hummel et al. 2010; Taji et al. 2002; Sperdouli and Moustakas 2012). La diminution de la conductance stomatique corrélée à la fermeture des stomates lors d'un déficit hydrique a pour conséquence à courts termes de limiter la transpiration, et, à plus longs termes, de diminuer l'efficacité de la photosynthèse, puisque le CO₂ requis pour la photosynthèse entre dans les feuilles par les stomates (Lawlor and Cornic 2002). Il a été montré dans des expériences dans lesquelles une carence en eau est imposée à différentes espèces d'amandier à un déficit hydrique (Rouhi et al. 2007), que lors d'une diminution légère de la conductance stomatique, due à une faible diminution du potentiel hydrique du sol, l'assimilation du CO₂ dans les feuilles n'est pas atteinte. C'est-à-dire qu'une légère fermeture des stomates n'empêche pas la photosynthèse de se dérouler de façon à ce que des sucres soient synthétisés et puissent être stockés sous forme d'amidon, exportés des organes sources vers les organes puits, afin de permettre la croissance de la racine.

2.3 Régulation de l'expression de gènes cibles en réponse au déficit hydrique

La complexité et la pléiotropie de la réponse des plantes à la sécheresse ont été démontrées par une centaine d'études, qui ont révélé l'implication de plus de mille gènes (Fukao and Xiong 2013). Certains sont régulés par l'ABA, d'autres sont régulés de façon indépendante de l'ABA (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki 2005). De nombreux gènes dont le niveau d'expression relative est régulé par le déficit hydrique le sont également par l'application exogène d'ABA (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki 2007). Chez *A. thaliana*, des analyses de microarray effectuées sur 7000 ADNc ont révélé 299 gènes inductibles (positivement et négativement) par le déficit hydrique, dont plus de la moitié le sont également par le NaCl (sel, choc osmotique) et l'ABA (Seki et al., 2002). En revanche, une autre étude montre que 100 % des gènes régulés par de fortes concentrations en NaCl ou par l'ABA le sont aussi par le déficit hydrique (Rabbani et al., 2003). Au final, les gènes régulés par le déficit hydrique sont classés dans 8 catégories, selon la fonction des protéines codées par ces gènes (Seki et al., 2002):

- i) Facteurs de transcription
- ii) Protéines kinases, phosphatases, métabolisme des phospholipides
- iii) Biosynthèse de l'ABA

- iv) Protéases
- v) Enzymes de détoxication
- vi) Protecteurs de macromolécules : protéines LEA, protéines chaperonnes
- vii) Enzymes clefs de la biosynthèse d'osmolytes (proline, amines quaternaires, polyols)
- viii) Canaux hydriques (aquaporines) et ioniques, dont les transporteurs dont les transporteurs de K^+ et un transporteur de monosaccharides de la famille ERD6-like (Early Response to Dehydration), At1g08930 (AtERD6), comme cela a déjà été démontré en 1998 (Kiyosue et al., 1998).

Les transporteurs de sucres jouent donc un rôle dans la réponse au déficit hydrique et on peut imaginer qu'ils pourraient répondre au stress hydrique afin de permettre la remobilisation des ressources carbonées participant aux ajustements osmotiques et également nécessaire, comme mentionné plus haut, à la croissance des racines. La remobilisation des sucres est une réponse importante des plantes au déficit hydrique, permettant les ajustements osmotiques mais aussi le maintien de la croissance des racines.

3 Les mécanismes moteurs de l'Evolution

La génomique comparative est une approche de comparaison moléculaire de génomes de différentes espèces ayant pour but l'identification de gènes chez les espèces étudiées. Cette approche permet de comprendre l'évolution des génomes, des familles de gènes ou des gènes et d'identifier les événements ayant conduit à l'aboutissement de la structuration des génomes, tels qu'ils sont représentés aujourd'hui. Ces événements sont majoritairement des événements de duplication (moteur de l'apparition de nouvelles fonctions) ou de spéciation (moteur de l'apparition de nouvelles espèces). La co-évolution (évolution concomitante et liée, de 2 organismes vivant dans une même zone géographique) est également un puissant moteur pouvant être à l'origine de l'évolution des gènes mais également dans un sens plus large, de l'évolution des espèces. En général, les mécanismes de spéciation et de co-évolution sont fortement dépendants des mécanismes de duplications, les 3 mécanismes étant souvent liés lors de l'évolution des organismes.

Il existe plusieurs mécanismes de duplication de gènes et la génomique comparative utilise un vocabulaire particulier pour définir les relations de parenté observées entre différents gènes ou différentes familles de gènes. Un gène simple et isolé sera différencié

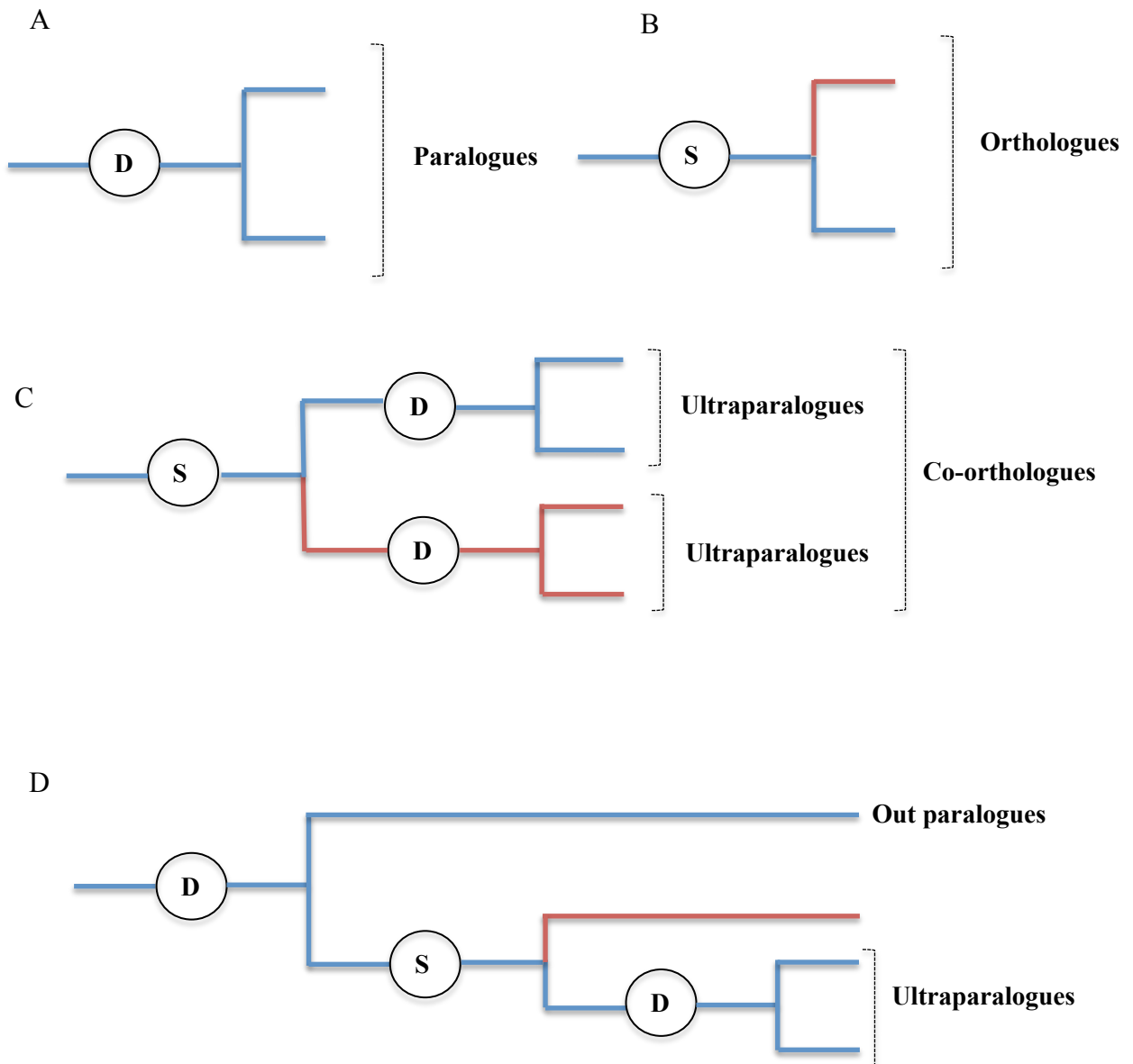


Figure 6 : définitions des relations entre plusieurs gènes dans un arbre phylogénétique. En bleu est représentée l'évolution de gènes quelconques d'une espèce donnée et en rouge, d'une autre espèce. Une lettre D dans un cercle définit un événement de duplication et une lettre S dans un cercle définit un événement de spéciation. A : des paralogues sont des gènes appartenant à la même espèce et séparés par un événement de duplication, B : des orthologues sont des gènes de deux espèces différentes dérivés d'un gène retrouvé dans un ancêtre commun, C : des ultraparalogues sont des paralogues ayant subi en amont un événement de spéciation, deux groupes d'ultraparalogues de deux espèces différentes peuvent être considérés comme co-orthologues, D : les out paralogues sont des orthologues apparus avant un événement de spéciation. D'après Sonnhammer and Koonin, 2002, Zmasek and Eddy, 2002 et Cyril Jourda, 2013).

d'une famille multigénique qui regroupe un ensemble de gènes issus d'une copie ancestrale. A l'intérieur d'une famille de gènes, les séquences d'ADN présentent un fort pourcentage d'identité; ils sont définis comme gènes **homologues**. Pour une espèce donnée, des gènes homologues séparés par un évènement de duplication sont dits **paralogues** et, s'ils sont séparés par un évènement de spéciation, ils sont qualifiés de gènes **orthologues**. Des gènes orthologues sont communément définis par Ils sont donc nécessairement retrouvés chez des espèces différentes, à l'inverse des gènes paralogues. Ces définitions peuvent être précisées par certains préfixes : ainsi, seront désignés comme **co-orthologues**, plusieurs gènes d'une même espèce, orthologues à plusieurs autres gènes d'une espèce différente. Les **ultraparalogues** sont des orthologues apparus spécifiquement par duplication à la suite d'un évènement de spéciation tandis que les **out-paralogues** sont des orthologues apparus par duplication avant un évènement de spéciation. Toutes ces définitions de base sont représentées dans la figure 6 afin d'en avoir une vision plus claire et schématique.

Même s'il existe des mécanismes de duplications pour tous les types d'êtres vivants, dans ce chapitre, l'accent sera mis sur les plantes et les exemples choisis seront la plupart du temps des observations réalisées dans les génomes de plantes.

3.1 *Les phénomènes de duplications géniques*

Les évènements de duplications peuvent être classés en trois catégories différentes en fonction notamment de leurs causes et de leurs conséquences : les duplications de génomes entiers, les duplications segmentales et les duplications à l'échelle du gène. Tous ces évènements de duplication jouent un rôle majeur dans l'évolution des êtres vivants dont ils sont en quelque sorte le moteur. L'origine et la radiation des Angiospermes sont relativement récentes par rapport à l'apparition de la lignée verte. De plus, l'apparition des Angiospermes est considérée comme ayant été brutale (De Bodt et al. 2005). Depuis 90 Ma environ, les Angiospermes sont devenues la lignée majeure et dominante chez les plantes terrestres (Crepet and Niklas 2009). Il est désormais établi que les évènements de duplication de gènes, et particulièrement les duplications de génomes entiers, ont joué un rôle très important dans le succès que connaissent les Angiospermes. Chez *Arabidopsis thaliana* par exemple, 65% des gènes sont issus de duplications (Kaul et al. 2000). Une étude a montré que, chez *A. thaliana*, parmi 2851 gènes situés dans des régions probablement non dupliquées (soit 11% du nombre total), 1570 (55% des gènes situés dans des régions non dupliquées) sont localisés au niveau

des centromères, et le reste dans des gaps localisés entre les blocs dupliqués (Bowers et al. 2003).

3.1.1 *Les duplications de génomes entiers*

La polyploïdie est classiquement définie comme étant la possession, pour un organisme vivant, d'au moins 3 sets de chromosomes. Les duplications de génomes entiers (Whole Genome Duplication ; WGD) sont en fait des évènements de polyploïdie dus à une non-réduction des gamètes en anaphase et à leur union au sein d'une même espèce (Ramsey and Schemske 1998; Adams and Wendel 2005). Les gènes dupliqués par WGD peuvent être identifiés par leur localisation dans de grands groupes de gènes dupliqués qui ne se chevauchent pas dans le génome. Ces grands groupes sont conservés sous forme de blocs de manière sythénique et colinéaire c'est-à-dire dans le même ordre chez différentes espèces (Tang et al. 2008; Tang et al. 2011).

De tels évènements ont été démontrés chez tous les êtres vivants incluant les champignons, les animaux et les plantes. Néanmoins, ces évènements sont beaucoup plus représentés chez les plantes (Otto and Whitton 2000; Mable et al. 2011), surtout chez les plantes à fleurs (Bowers et al. 2003; Jaillon et al. 2007; Van de Peer et al. 2009), apparues au début du Crétacé (130-135 Ma) (Friis et al. 2006). Pour trancher sur le pourcentage d'Angiospermes polyploïdes, qui était à l'époque discuté (entre 30 et 80% selon les méthodes employées), Jane Masterson (Masterson 1994) a pu déterminer que 70% des Angiospermes actuelles ont subi des évènements de polyploïdie. Chez les plantes, la polyploïdie peut être due à différentes anomalies (Ramsey and Schemske 1998) :

- Un doublement somatique dans les tissus méristématiques de l'organisme juvénile à l'adulte
- Un doublement somatique dans un zygote ou un jeune embryon
- La polyspermie : fécondation d'une oosphère par plusieurs spermatozoïdes (observé chez certaines orchidées)
- L'absence de réduction chromatique au moment de la méiose. La formation de gamètes non réduits, influencée par divers stimuli environnementaux comme des stress ou des fluctuations, est l'une des principales causes de la formation de polyploïdes, ces stimuli vont également influencer le taux de formation des polyploïdes (Mable et al. 2011; Bomblies and Madlung 2014; Ramsey and Schemske 1998; Kreiner et al. 2017). La température constitue un bel exemple de stimulus. Son

augmentation (température haute) joue un rôle dans la formation de polyploïdes chez le rosier (Pécricx et al. 2011) et sa diminution (températures basses) joue un rôle dans la formation de polyploïdes chez *Arabidopsis* et les hybrides du genre *Brassica* (Mason et al. 2011).

Toutes les plantes, incluant les petits génomes comme *A. thaliana*, ont été touchées par des phénomènes de polyploïdisation (Seoighe 2003; Wendel 2000; Paterson et al. 2000). L'évolution des Angiospermes a pu être reliée à de grands évènements de WGD en se basant sur de tels évènements identifiés sur un petit génome comme celui d'*A. thaliana* (Bowers et al. 2003). Un des évènements de WGD les plus marquant chez les plantes est l'évènement γ , proposé pour la première fois en regard des données issues du séquençage du génome d'*A. thaliana*. Chez le genre *Arabidopsis*, possédant des génomes très petits (125Mb par exemple pour *A. thaliana*), au moins 3 grands évènements de WGD ont été identifiés et appelés α , β et γ . Trois segments chromosomiques ont été attribués à chacun des trois évènements de duplication respectivement. Les protéines présentant des duplications identifiées dans ces 3 régions ont été comparées par BLAST à des bases de données de plusieurs génomes d'Angiospermes. Puis, les meilleurs orthologues retenus ont participé à des analyses phylogénétiques incluant aussi les protéines d'*A. thaliana* ayant servi à faire les BLAST. L'évènement γ a retenu l'attention car il aurait eu lieu avant la divergence Angiospermes/Gymnospermes (environ 200 Ma). En effet, des orthologues des protéines d'*Arabidopsis*, codées par des gènes appartenant au segment γ , ont été retrouvées chez tous les génomes analysés lors de l'étude (Bowers et al. 2003). D'autres études plus prudentes utilisant notamment des méthodes de comparaisons de blocs de gènes conservés chez différentes espèces (synthénies), rapportent que de façon certaine, l'évènement γ a eu lieu au moment de la divergence des Eudicotylédones (environ 140 Ma) (Tang et al. 2008; Jiao et al. 2012; Wang et al. 2016). Cette hypothèse a été motivée en majeure partie par la structure en triplicas du génome de *Vitis vinifera* (vigne), indiquant une ancienne hexaploïdie, due à des évènements de WGD (Jaillon et al., 2007 ; Tang et al., 2008). Cette ancienne hexaploïdie serait le reflet de l'évènement γ . Le scénario de l'hexaploïdisation ayant été controversé (Velasco et al. 2007) et des études ont cherché à le vérifier. En 2012, Jiao et ses collaborateurs ont étudié les génomes entièrement séquencés de *Populus trichocarpa* (peuplier), *Carica papaya* (papayer), *Arabidopsis thaliana*, *Ricinus communis* (ricin) et *Solanum tuberosum* (pomme de terre). Il est apparu que ces espèces possèdent toutes des génomes avec une structure en triplicas. De plus, certains blocs chromosomiques présentent une synthénie

interspécifique avec des blocs présents dans les triplicas de *Vitis vinifera*. Cette observation est un élément majeur qui a permis d'estimer de façon parcimonieuse et certaine que l'évènement γ a eu lieu au plus tard chez l'ancêtre commun des Eurosidiées et des Astéridées (représentés par *Solanum tuberosum*) (Jiao et al., 2012). En effet, en 2013, le séquençage du génome de *Nelumbo nucifera* (lotus sacré), représentant un taxon d'émergence précoce, n'a pas mis en évidence de traces de l'évènement d'hexaploïdisation γ mais un autre évènement de duplication propre à *Nelumbo nucifera*, l'évènement λ (Ming et al. 2013). Depuis les années 2010 et le séquençage massif des génomes, tous les articles traitant de l'étude d'un génome d'Eudicotylédone reportent l'existence de traces de cet évènement d'hexaploïdisation γ . Cet évènement, attestant d'une ancienne hexaploïdie des Eudicotylédones (Jaillon et al. 2007; Jiao et al. 2012; Chan et al. 2010) aurait pu se produire par deux scénarios différents. Le premier est qu'il y a pu y avoir génération par évènement de duplication, de triploïdes qui se sont hybridés à des diploïdes (très probablement stériles à la suite de cette hybridation), puis un second évènement de duplication aurait amené à des hexaploïdes. Le second scénario est que des gamètes non réduits d'un tétraploïde et celles d'un diploïde auraient fusionné pour donner tout simplement et directement un hexaploïde (Jiao et al., 2012). Chez certaines espèces, des études ont montré qu'il y a eu d'autres évènements de WGD importants et indépendant de l'évènement γ . En effet, des études révèlent la possibilité qu'il y ait eu deux évènements de WGD chez les monocotylédones (nommés ρ et σ), datant d'avant la diversification des Poacées (Blanc and Wolfe 2004; Paterson et al. 2004; Tang et al. 2010). Chez *Musa acuminata* (banane), deux évènements de WGD indépendant des évènements ρ et σ et spécifiques de cette espèce ont été retrouvés (D'Hont et al. 2012). L'analyse du génome de *Populus trichocarpa* (Tuskan et al. 2006) révèle qu'il y a eu un évènement de WGD postérieur à l'évènement γ et propose également un partage de cet évènement avec *Salix purpurea* (saule), une autre Salicacée très proche génétiquement. *A priori*, il y aurait également eu un autre évènement de WGD il y a environ 50 Ma, après la séparation des Salicacées et des Fabacées. En effet, des marques d'un tel évènement non retrouvées chez les Salicacées (peuplier et saule) sont en revanche retrouvées dans les génomes de Fabacées : *Lotus japonicus* (lotier) (Sato et al. 2008), *Medicago truncatula* (Cannon et al. 2005; Cannon et al. 2006) et *Cicer arietinum* (pois chiche) (Varshney et al. 2013). Chez *Linum usitatissimum* (lin), en plus d'une trace de l'évènement d'hexaploïdisation, un évènement spécifique de WGD a été identifié il y a entre 5 et 9 Ma (Wang et al. 2012). Un évènement spécifique chez *Malus domestica* (pommier) a été identifié et putativement spécifique des

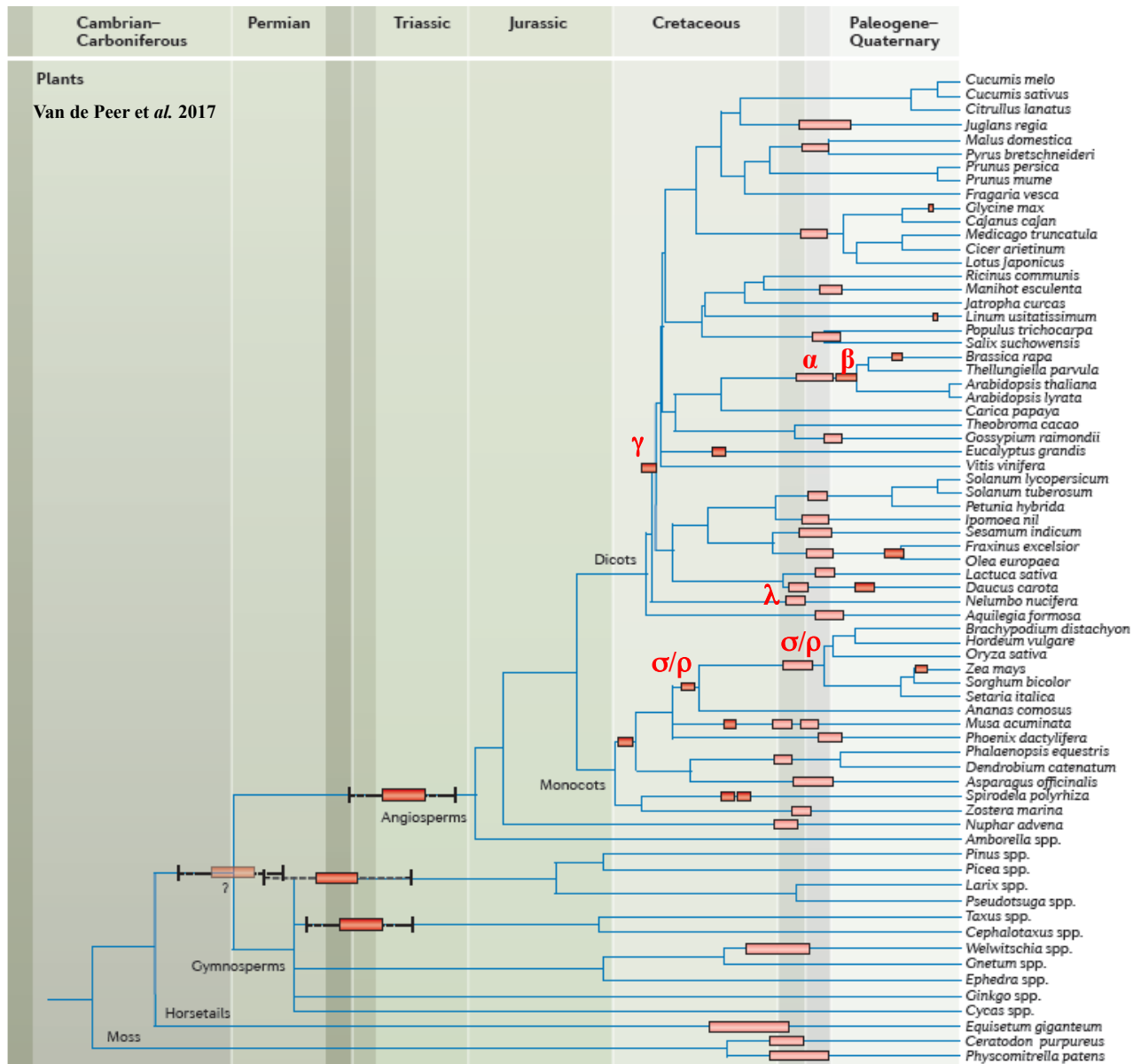


Figure 7 : évènements de duplication de génomes entiers (WGD chez les plantes terrestres (Embryophytes) et leur relation avec les grands évènements d’extinctions. Les rectangles rouges représentent des évènements de WGD (parfois encadrés de marges d’erreurs). Les lignes grises verticales représentent des périodes au cours desquelles il y a eu de grands évènements d’extinctions dues à des évènements météorologiques cataclysmiques. Sur cette figure, ont été replacés les évènements de WGD décrits dans l’introduction, lorsqu’ils ont été nommés (en rouge). D’après Van de Peer et al. 2017.

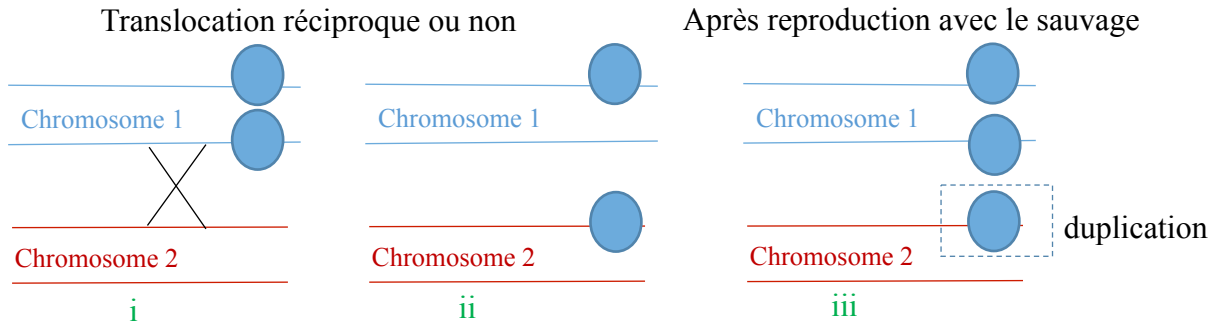
plantes de la famille des Pyreae (Velasco et al. 2010). La Myrtale *Eucalyptus grandis* (eucalyptus) a connu, en plus de l'évènement γ , au moins un évènement de WGD spécifique et plus récent daté d'il y a environ 109,9 Ma. Cette duplication aurait eu lieu chez un ancêtre du Gondwana, au temps où l'Australie et l'Antarctique se séparèrent du Gondwana est (Myburg et al. 2014). Chez *Gossypium raimondii* (le cotonnier) et *Theobroma cacao* (le cacaoyer), deux études ont montré qu'il y avait eu un évènement de duplication spécifique et commun aux deux espèces (Wang et al. 2012; Argout et al. 2011). Chez les Brassicales, *Brassica rapa*, *Arabidopsis halleri*, *Arabidopsis lyrata* et *Thellungiella halophila*, on retrouve les trois évènements de WGD α , β et γ , tout comme chez *Arabidopsis thaliana* (Cheng et al. 2013; Kaul et al. 2000) (Hu et al. 2011; Slotte et al. 2013; Yang et al. 2013; Van de Peer et al. 2017). En revanche, les évènements α et β ne sont pas retrouvés chez la Brassicale *Carica papaya* (Ming et al. 2008). Les évènements de duplication α et β sont donc apparus après la divergence des Brassicacées et des Caricacées.

Enfin, l'existence de deux grands évènements de WGD très anciens (antérieurs à l'évènement γ), a été proposée (Jiao et al. 2011; Jiao et al. 2012). Le premier aurait eu lieu avant la diversification des plantes à graines et le second chez les Angiospermes ancestrales. Si toutefois les grands évènements de WGD chez les plantes sont généralement admis chez la communauté scientifique, ils sont aussi très controversés et parfois peu clairs (Van de Peer 2011). Ceci est notamment dû au fait que des évènements passés de polyploïdie peuvent être peu visibles au niveau d'un grand nombre de génomes, raison pour laquelle il est souvent difficile de les dater de manière précise. Ceci est attribué à la perte de gènes dupliqués, aux réarrangements chromosomiques fréquents et à l'existence de phénomènes de mouvements de gènes (Tang et al. 2011 ; Adams and Wendel 2005).

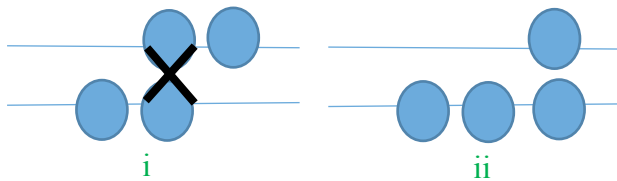
Un arbre phylogénétique a été récemment proposé par Van de Peer (2017) représentant tous les évènements de duplication de génomes entiers connus à ce jour ayant eu lieu chez les plantes. Il est présenté en figure 7.

Etant donné que la formation de gamètes non-réduits, influencée par divers stimuli environnementaux comme des stress ou des fluctuations, est l'une des principales causes de la formation de polyploïdes, ces stimuli influencent le taux de formation des polyploïdes (Mable et al., 2011 ; Bomblies and Madlung, 2014 ; Ramsey and Schemske, 1998 ; Kreiner et al., 2017). En particulier l'augmentation de la température (températures hautes) joue un rôle dans la formation de polyploïdes chez le rosier (Pecrix et al., 2011) tandis que la diminution

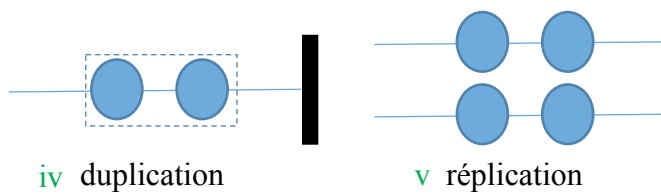
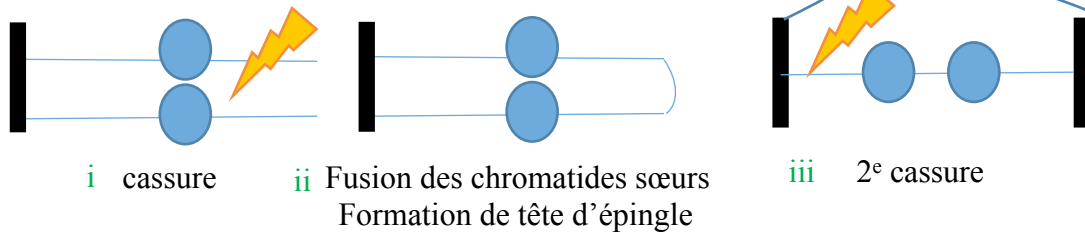
A : duplication segmentale



B : crossing over inégaux



C : cassures_fusions (DSB)



D : non-homologous end-joining (NHEJ)

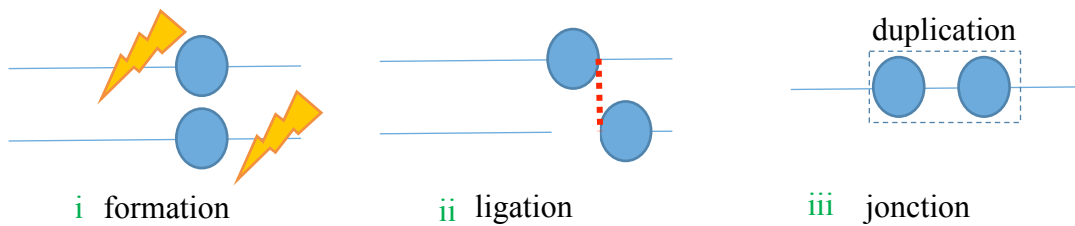


Figure 8 : différents mécanismes de formation de duplications. Cercles bleu = gènes, croix noires = réarrangements chromosomique, crossing over, éclair : cassure, barre verticale épaisse noir = centromère. Les lettres vertes donnent l'ordre chronologique des événements pour chaque mécanisme explicité. A : duplication segmentale par translocation, B : duplications en tandem par crossing over inégaux, C et D : apparition de gènes ou de segments dupliqués à la suite de cassures au niveau de la chromatine. D'après Koszul and Fisher 2009.

(températures basses) joue un rôle dans la formation de polyploïdes chez *Arabidopsis* et les hybrides du genre *Brassica* (Mason et al., 2011).

3.1.2 *Les duplications segmentales*

Il s'agit de segments chromosomiques uniques dupliqués à la suite d'un évènement entraînant une division cellulaire anormale (Kozsul and Fischer 2009; Freeling 2009; Li et al. 2012) comme un crossing over inégal, des recombinaisons chromosomiques aberrantes ou l'insertion d'éléments transposables à mécanismes de copier/coller (Kaessmann et al. 2009). Les duplications segmentales causées par des éléments transposables se caractérisent par des séquences plus courtes que celles des duplications segmentales dues à des anomalies lors de la division cellulaire (Jiang et al. 2004; Li et al. 2012). Au moins 5 % du génome humain consisterait en des duplications segmentales (Bailey et al. 2002). Il existe différentes classes de duplications segmentales en fonction de leur localisation au niveau du chromosome : duplications péricentromériques (proche du centromère), subtélomérique (proche d'un télomère) ou encore interstitielles (entre la région centromérique et une région télomérique). Dans cette dernière catégorie on distingue les duplications segmentales intrachromosomiques (sur le même chromosome) des duplications segmentales interchromosomiques (sur 2 chromosomes différents). De plus, les segments dupliqués de manière intrachromosomique peuvent être localisés à des positions consécutives sur le chromosome (en tandem) ou espacés (Kozsul and Fisher, 2009). L'analyse des séquences des extrémités des segments dupliqués a ouvert les portes à de nombreuses propositions de mécanismes de duplication des segments de chromosomes. Ci-après est présenté un bref résumé de ces mécanismes compilés et très bien décrits par Kozsul et ses collaborateurs (2009) sur la base de nombreuses études. L'apparition sur un chromosome d'un segment d'ADN homologue à celui présent sur un autre chromosome peut résulter d'un polymorphisme hérité ayant pour origine une translocation réciproque ou non (figure 8 A). Une duplication segmentale peut aussi avoir résulté de crossing over inégaux (figure 8 B). Parfois, il peut y avoir fusion de chromatides sœurs après perte de télomère par dégradation ou par cassure au niveau de l'ADN double brin (DNA double Strain Break, DSB) et dans ce cas, une des cellules filles porte une délétion (figure 8 C). Deux chromatides homologues subissant chacune une DSB à des positions différentes peuvent aboutir à la formation de duplications segmentales si le processus de réparation par ligature est incorrect (Non Homologous End-Joining, NHEJ ; figure 8 D). Chez les plantes, les tailles de segments dupliqués varient d'une dizaine à des centaines de kbp (Li et al., 2012). Des duplications segmentales ont pu être mises en évidence un peu partout dans le Règne

Végétal, cependant, quelques études mettent en avant certains génomes qui en présentent particulièrement peu ou, à l'inverse, beaucoup. Chez *Cucumis sativus* (le concombre) par exemple, il y a eu très peu de duplications segmentales (Huang et al. 2009). De plus, étant donné qu'aucune trace d'évènements de WGD spécifique, après l'évènement γ , n'a été identifiée dans le génome de cette espèce, les auteurs proposent le concombre comme étant un bon candidat, en complément de la vigne et du papayer, pour représenter des génomes ancestraux et aider à la compréhension de l'évolution des génomes des Eurosidées. Chez *Linum usitatissimum* (le lin), on dénombre de nombreuses duplications segmentales (Wang et al., 2012) et plus encore plus *Eucalyptus grandis* (Myburg et al., 2014).

3.1.3 Les duplications à l'échelle du gène

La duplication d'un gène unique résultant de recombinaison dite co-inégale, c'est-à-dire inégale entre deux chromosomes homologues, peut générer une ou plusieurs copies du même gène. Les copies présentent un très fort pourcentage d'identité mais les séquences ne sont pas strictement identiques, ce qui permet l'apparition de fonctions un peu différentes du premier gène dupliqué. Les duplications locales, ou « tandems » sont définies comme des duplications séparées de moins de 5 autres gènes sur le chromosome (Cusack and Wolfe 2007). Néanmoins, le nombre maximal de gènes entre deux copies dupliquées en tandem varie selon les études (Rizzon et al. 2006). Les duplications en tandem peuvent être uniques ou alors présenter plusieurs exemplaires copiés de manière consécutive. Les autres duplications monogéniques sont donc des duplications dites « distantes » (Cusack et Wolfe, 2007). Ce type de duplication monogénique distante pourrait aussi être induit par l'activité de certains éléments transposables. Le mécanisme le plus courant amenant à la formation de tandems est la recombinaison homologue inégale, mais, un rôle suggéré des rétrotransposons n'est pas à négliger (Zhao et al. 1998). Les copies en tandem sont fréquentes chez les plantes. En effet, elles représentent environ 15 % des gènes chez *Oryza sativa* (riz) et *Arabidopsis thaliana* (Rizzon et al., 2006). Chez les plantes dont le génome est entièrement séquencé, les duplications en tandem sont généralement repérables par le numéro identifiant chaque gène. Les gènes ayant un identifiant très proche (parfois un chiffre d'écart, ou une dizaine d'écart pour *Arabidopsis* par exemple) sont des tandems. Une base de données créée en 2017, PTGBase (<http://ocri-genomics.org/PTGBase/>) recense tous les gènes dupliqués en tandem pour 39 génomes d'organismes végétaux.

3.2 Devenir des gènes dupliqués

Cinq phases permettent de décrire l'état d'un gène selon l'étape du processus de duplication dans laquelle il se trouve à un instant donné (Innan and Kondrashov, 2010) :

Phase de pré duplication : le génotype contenant la copie simple est fixé dans la population.

Phase de duplication

Phase de fixation : des mutations peuvent avoir lieu dans la copie dupliquée

Phase de détermination dans certains cas, la nouvelle copie devient peu à peu un pseudogène, menant à la fixation d'une mutation nulle. Dans d'autres cas, durant cette phase, la nouvelle copie va acquérir sa fonction (nouvelle ou pas) définitive

Phase de préservation : les deux copies sont maintenues de façon stable par la sélection.

Ces phases ne sont pas toutes obligatoires et le devenir d'un gène dupliqué peut s'arrêter bien avant la phase de préservation.

3.2.1 *Le retour à une seule copie dans le génome*

A la suite d'une duplication de gènes, qu'elle soit sur le génome entier, segmentale ou monogénique, la plupart des copies dupliquées deviennent des pseudogènes ou sont perdus à cause de multiples et variés enchainements de phénomènes d'insertions/délétions, de mutations ponctuelles et de conversion (Langham et al., 2004). La duplication de gènes entraîne souvent des redondances fonctionnelles. Ainsi, les mutations pouvant être accumulées dans l'une des deux copies ne sont pas forcément éliminées par la sélection, menant à la création de pseudogènes, si une mutation affectant la structure ou/et la fonction de la protéine codée par ce gène survient (Zhang 2003). Chez un gène dupliqué non soumis à la pression de sélection (en sélection neutre), en général, la transformation en pseudogène « pseudogénisation » apparaît dans les quelques premiers Ma suivant l'évènement de duplication (Lynch and Conery 2000). L'expression des gènes dupliqués peut être également affectée par une inactivation (silencing) épigénétique (Osborn et al. 2003). Lorsque la duplication est due à un évènement de WGD, la perte de copies est appelée « fractionation » (Langham et al. 2004; Freeling 2009). Chez les plantes, la « fractionation » (perte de copies dupliquées lors d'un évènement de WGD) a pu être démontrée chez les céréales (Ilic et al. 2003) et résulte, à partir d'un ancêtre tétraploïde, au retour à la diploïdie fonctionnelle chez les espèces étudiées (maïs, riz et sorgho). De ce fait, la « fractionation » est aussi appelée

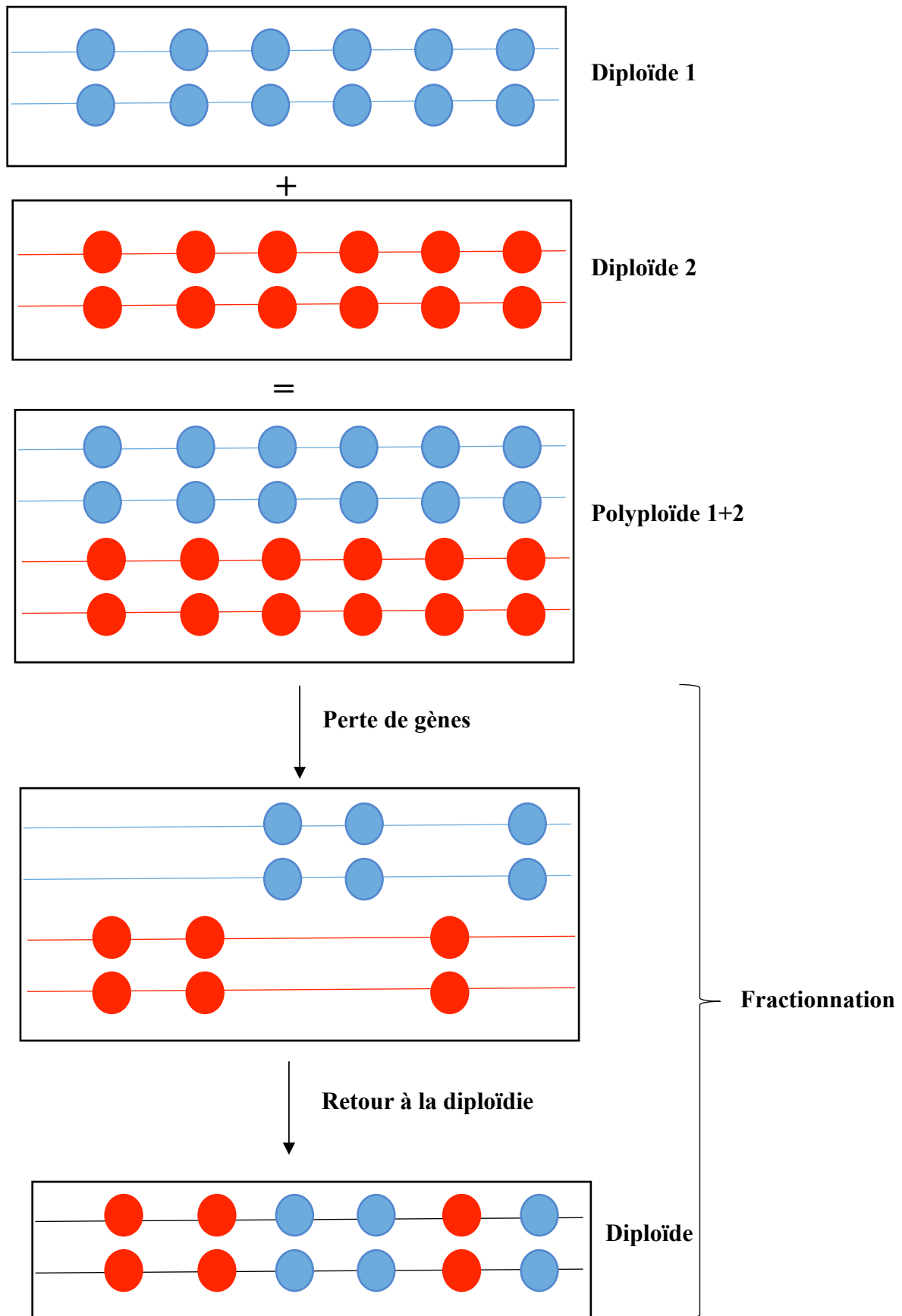


Figure 9 : schéma du mécanisme de fractionnement. Les cercles bleus et rouges représentent les gènes appartenant respectivement au diploïde 1 et au diploïde 2. D'après Adams and Wendel 2005.

diploïdisation. La figure 9, modifiée à partir d'une figure d'Adams and Wendel (2005) illustre de façon schématique le résultat d'évènements de polyploïdisation et de « fractionnation ».

Malgré une forte probabilité d'extinction pour un gène dupliqué et, ainsi, de non-fonctionnalisation, certains gènes sont tout de même retenus dans le génome. Une étude a montré que, chez les Castomidées, les locus ayant subi un évènement de polyploïdisation retournent généralement à un état diploïde fonctionnel en 50 Ma (Ferris and Whitt 1977). Cette période est appelée période post-polyploïdisation. Plusieurs mécanismes ont été proposés pour essayer d'expliquer comment a lieu la rétention de copies de gènes dupliqués. Ces mécanismes sont englobés dans plusieurs théories, ou modèles différents.

3.2.2 *L'avantage apporté par la redondance fonctionnelle*

A la suite d'un évènement de WGD, deux copies fonctionnelles du même gène et ayant une même fonction (redondance fonctionnelle), sont amenées à coexister. Une étude réalisée sur *Arabidopsis* et le riz a démontré, que les gènes anciennement dupliqués montrent une plus grande proportion de SNP au niveau du 3^e nucléotide d'un codon par rapport aux gènes en copie unique (Chapman et al. 2006). Au vu de la redondance du code génétique, les auteurs en ont déduit que pour les gènes dupliqués, des mutations observées sont généralement moins sévères que chez les gènes en simple copie. Ce résultat a été testé par une matrice de substitutions Blosum80 et est avéré uniquement pour l'évènement α chez *Arabidopsis*, mais pour tous les évènements chez le riz. La conclusion des auteurs est que la redondance fonctionnelle pourrait servir de « tampon génétique » pour certaines fonctions très importantes, voire essentielles pour l'organisme, en permettant d'éviter les mutations délétères. Ceci a été décrit pour *A.thaliana* et *O.sativa*, lors d'une étude de leurs génomes entiers respectifs (Chapman et al., 2006). Si une des deux copies devient moins fonctionnelle à cause, par exemple, d'effets délétères de mutations, alors l'autre copie redondante continue d'assurer la fonction. Une autre analyse, visant essentiellement les interactions protéine-protéine, suggère que la rétention forte, suite à un évènement de WGD, de membres d'un même réseau d'interactions génique, était très probablement due à leur redondance fonctionnelle. L'explication de l'avantage conféré à la rétention de copies à fonction redondante est encore une fois, de pouvoir coûte que coûte, assurer la fonction (De Smet and Van de Peer 2012). Malgré tout, il a été montré que chez les plantes, plus les gènes sont d'origine ancienne et plus ils sont conservés, c'est-à-dire en sélection négative. Un gène en sélection négative ou purifiante, se caractérise par un taux de mutations synonymes (dS)

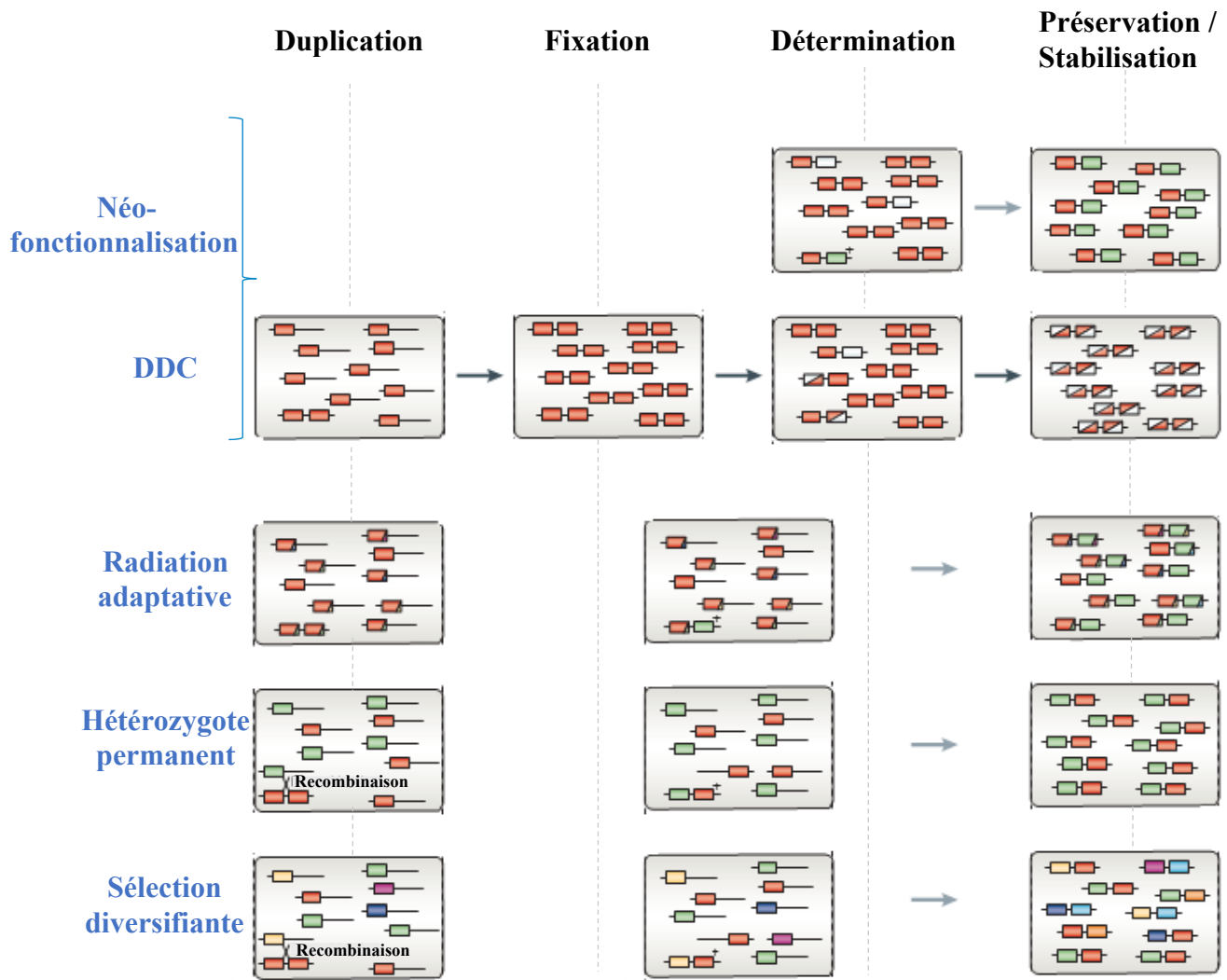


Figure 10: Schémas explicatifs des modèles de néo-fonctionnalisation, DDC (Duplication, Dégénérescence, Complémentation), de radiation adaptative, de l'hétérozygote permanent et de sélection diversifiante. En noir, les 4 différentes phases à partir de la duplication d'un gène. En bleu, les différents modèles expliqués. Un rectangle représente un gène et la ligne sur laquelle il est situé représente le chromosome. Les modèles de néo-fonctionnalisation et DDC ont les mêmes phases de duplication et de fixation et se distinguent par la suite, dès la phase de détermination. Un signe « + » est signe d'un avantage sélectif. Pour tous les modèles sauf le modèle de sélection diversifiante, les rectangles qui ne sont pas rouges sont dus à des mutations apparue à la suite de la duplication. D'après Innan and Kondrashov 2010.

important (nombre de mutations synonymes/nombre de sites disponibles à ce genre de mutation). Une mutation synonyme dans un gène ne change pas l'acide aminé codé par le codant muté. A l'inverse, les copies apparues plus récemment par duplication ne sont pas toujours retenues : la sélection sur ces gènes est moins stricte. Les gènes d'origine plus récente sont en général plus courts, moins exprimés et connaissent plus de mutations non synonymes (mutations qui changent la protéine), représenté par le ratio dN qui équivaut au taux de mutations non synonymes (nombre de mutations non synonymes/nombre de sites disponibles à ce genre de mutation) (Guo 2013; Yang and Gaut 2011).

3.2.3 *Les différents modèles expliquant la conservation de gènes issus d'évènements de duplication*

Puisqu'il peut y avoir des avantages au maintien d'un gène dupliqué dans le génome, bien que ça ne soit pas le cas le plus courant, plusieurs modèles sont décrits dans la littérature et permettent d'apporter des explications sur les mécanismes génétiques favorisant la rétention d'un gène dupliqué plutôt que sa perte.

Dans un premier temps, nous aborderons les modèles nécessitant de formuler l'hypothèse que la duplication est un processus neutre (Innan and Kondrashov., 2010):

- **Le modèle de néo-fonctionnalisation** : proposé en premier par Ohno en 1970 (Ohno 1970) ce modèle a longtemps été considéré comme le modèle unique permettant aux gènes dupliqués de persister dans un génome (Ohta 1988; Walsh 1995). Il s'agit pour la nouvelle copie d'acquérir une nouvelle fonction apportant un avantage à l'organisme, tandis que la copie plus ancienne garde sa fonction d'origine. Ce modèle prédit que le taux d'évolution après l'évènement de duplication se maintient pour la copie ancienne et s'accélère pour la nouvelle copie, qui est alors sous sélection positive (favorise le changement dans la séquence et donc le changement de fonction de la protéine codée). En effet, une mutation conférant un avantage sélectif à la nouvelle copie serait la bienvenue et augmenterait encore l'intérêt de cette nouvelle copie (Innan and Kondrashov., 2010). Ce modèle est expliqué dans la figure 10.

Néanmoins, des études ont montré que ce modèle n'est pas le seul pouvant expliquer la rétention de copies de gènes issues de duplications. Dans des lignées de poissons tétraploïdes, de 30 à 75% de gènes dupliqués codant des protéines, ont échappés à la non-fonctionnalisation pendant 50 à 100 Ma (Allendorf et al. 1975; Ferris and Whitt 1979). Chez

le maïs (Poacées, Monocotylédones), 72 % des gènes ont évités la non-fonctionnalisation durant 11 Ma (Whitkus et al. 1992; Ahn and Tanksley 1993; White and Doebley 1998). Or, il n'apparaît pas forcément que la majorité des copies dupliquées ont acquis une nouvelle fonction (Ferris and Whitt, 1979). Il y aurait au moins un autre modèle pouvant expliquer la rétention préférentielle de certains gènes dupliqués.

- **Le modèle de sous-fonctionnalisation DDC (Duplication, Dégénérescence et Complémentation) :** de nombreux gènes et surtout ceux qui sont impliqués dans le développement peuvent avoir de nombreuses sous-fonctions indépendantes en ce qui concerne leur patron d'expression spatio-temporelle (Force et al. 1999). En effet, le modèle de néo-fonctionnalisation ne prend pas en compte le fait qu'un gène peut avoir plusieurs fonctions, contrôlées par des facteurs régulateurs différents. De très nombreuses études et revues traitent de cette pluralité dans les fonctions pouvant être assurées par un gène (Piatigorsky and Wistow 1991; Arnone and Davidson 1997). A partir de ces observations, Force et al, 1999 proposent le modèle DDC (sous-fonctionnalisation). Si un fragment de chromosome dupliqué perd plusieurs gènes différents, alors, pour rester viable, les deux fragments de chromosomes doivent se compléter en retenant ensemble des copies fonctionnelles de tous les gènes présents dans le chromosome d'origine. De ce fait, si des gènes dupliqués perdent différentes sous-fonctions régulatrices, alors ils doivent également se compléter pour retenir ensemble la totalité des fonctions régulatrices présentes initialement dans le gène ancestral. Le modèle DDC, de par sa nature, peut rendre les deux copies d'un même gène dupliqué essentielles. Les mécanismes de ce modèle sont présentés en figure 10.
- **Le modèle de sous-fonctionnalisation DDI (Duplication, Dégénérescence et Innovation) :** une étude propose que les modèles de néo-fonctionnalisation et de sous-fonctionnalisation de type DDC ne sont pas mutuellement exclusifs mais plutôt reliés (Jiménez-Delgado et al. 2009). En effet, les éléments *cis*-régulateurs de gènes dupliqués peuvent, par le biais de mutations aléatoires, changer l'affinité du promoteur pour d'autres régulateurs en *trans*-, soit d'autres facteurs de transcription, et donc entraîner l'acquisition de nouveaux profils d'expression spatio-temporelle, ce qui, en soi, représente une nouvelle fonction et est donc assimilée à de la néo-fonctionnalisation. D'après les auteurs, alors que le modèle

DDC suggère une possible néo-fonctionnalisation par l'acquisition de nouveaux enhancers après la duplication, le modèle DDI propose que le gène dupliqué devienne plus spécifique et qu'il soit exprimé dans des zones spatio-temporelles plus restreintes.

- **Le modèle EAC (Escape for Adaptive Conflicts) :** Il a la même finalité que le modèle DDC (ou DDI) mais impose un prérequis, antérieur à l'évènement de duplication, pour expliquer qu'une copie dupliquée soit retenue par un modèle de sous-fonctionnalisation. Un gène en simple copie (singleton) porteur de plusieurs fonctions (au moins deux) subit potentiellement des « conflits d'adaptation » dans le sens où, il peut être envisagé qu'il soit difficile, pour un gène, de remplir plusieurs fonctions correctement. A l'issue d'une duplication de ce gène, les différentes copies pourraient se partager les différentes fonctions d'origine, dans le cadre de la sous-fonctionnalisation (Hittinger and Carroll 2007). Dans ce modèle EAC le potentiel de départ dû aux conflits d'adaptation pesant sur les gènes singletons et menant à la sous-fonctionnalisation après duplication est mis en exergue. Cela supposerait donc que les gènes, immédiatement après duplication, soient sous sélection positive puisqu'ils confèrent un avantage en levant le conflit d'adaptation qui pesait sur le gène en singleton.

Les quatre modèles discutés précédemment partagent un point commun : un gène dupliqué doit passer très rapidement de la phase de détermination à la phase de préservation, autrement, une des copies risque d'être réduite à l'état de pseudogène avant de pouvoir commencer la phase de préservation, par accumulation de mutations non avantageuses (Lynch and Katju 2004).

D'autres modèles préconisent que la duplication en elle-même est avantageuse :

- **Effet du dosage des gènes (ou dosage génique):** si une augmentation de la quantité (dosage) d'un gène particulier est bénéfique (amplification) (Francino 2005; Innan and Kondrashov 2010), alors la duplication de ce gène sera fixée par sélection positive. Les gènes impliqués dans ce type de modèle sont les gènes qui jouent un rôle dans les interactions organisme/environnement, comme les gènes de réponses aux stress environnementaux, les senseurs, les gènes codant pour des transporteurs, ou les gènes ayant un rôle dans le métabolisme (Kondrashov et al. 2002). Peuvent aussi être

impliqués dans ce type de modèle les gènes ayant une sensibilité particulière au dosage, codant des protéines impliqués dans des interactions protéines/protéines (Kondrashov and Koonin 2004; Veitia 2005) ou des gènes codant des protéines, dont la fonction requiert une quantité importante de matériel génétique (ribosomes, histones) (Sugino and Innan 2006).

- **Nouvelle fonction apportée directement par une duplication :** parfois les gènes dupliqués sont partiels, sans les éléments régulateurs ou sans partie fonctionnelle. Ceci peut résulter directement en une nouvelle fonction qui sera immédiatement retenue par sélection positive. Parfois ce peut être la nouvelle position dans le génome de la copie dupliquée qui va entraîner l'apparition d'une nouvelle fonction (Lynch and Katju, 2004). Il a été montré chez *C. elegans*, que les duplications partielles sont des événements courants. En effet, pour entre 50 % et 64% des gènes récemment dupliqués chez *C. elegans*, un exon entier est présent uniquement dans l'une des deux copies. La présence d'un exon spécifique peut entraîner une fonction spécifique. De plus, 50% des copies dupliqués se retrouvent à des positions adjacentes mais dans des orientations opposées (Katju and Lynch 2003).

Une autre catégorie de modèles peut être suggérée. Dans celle-ci, les duplications concernent des gènes pour lesquels il existe des variations dans les populations. Un allèle polymorphe est présent dans le génome en phase de pré-duplication. Cet allèle va être fixé en même temps que la nouvelle copie, ce qui requiert une recombinaison entre les deux copies (Innan and Kondrashov, 2010). Les mécanismes d'établissement de gènes dupliqués selon les trois modèles suivants sont présentés en figure 10.

- **Modèle de radiation adaptative :** ce modèle, proposé par Francino en 2004, s'appuie sur la démonstration de l'implication du couplage amplification/mutagenèse chez les bactéries, dans la rétention de gènes ayant une nouvelle fonction (Hendrickson et al. 2002; Roth and Andersson 2004). Le modèle de radiation adaptative propose une période d'adaptation préliminaire au sein de la phase de pré-duplication, supposant que les gènes dupliqués doivent être adaptés à fournir du matériel prompt à l'apparition d'une nouvelle fonction. Dans ce modèle, la plupart des plus grandes familles de gènes détectées dans tous les génomes seraient dans un stade transitoire, présents durant un temps limité. Après le premier stade de sélection pour des gènes amplifiés, une sélection positive des copies dupliquées a lieu pour donner lieu à

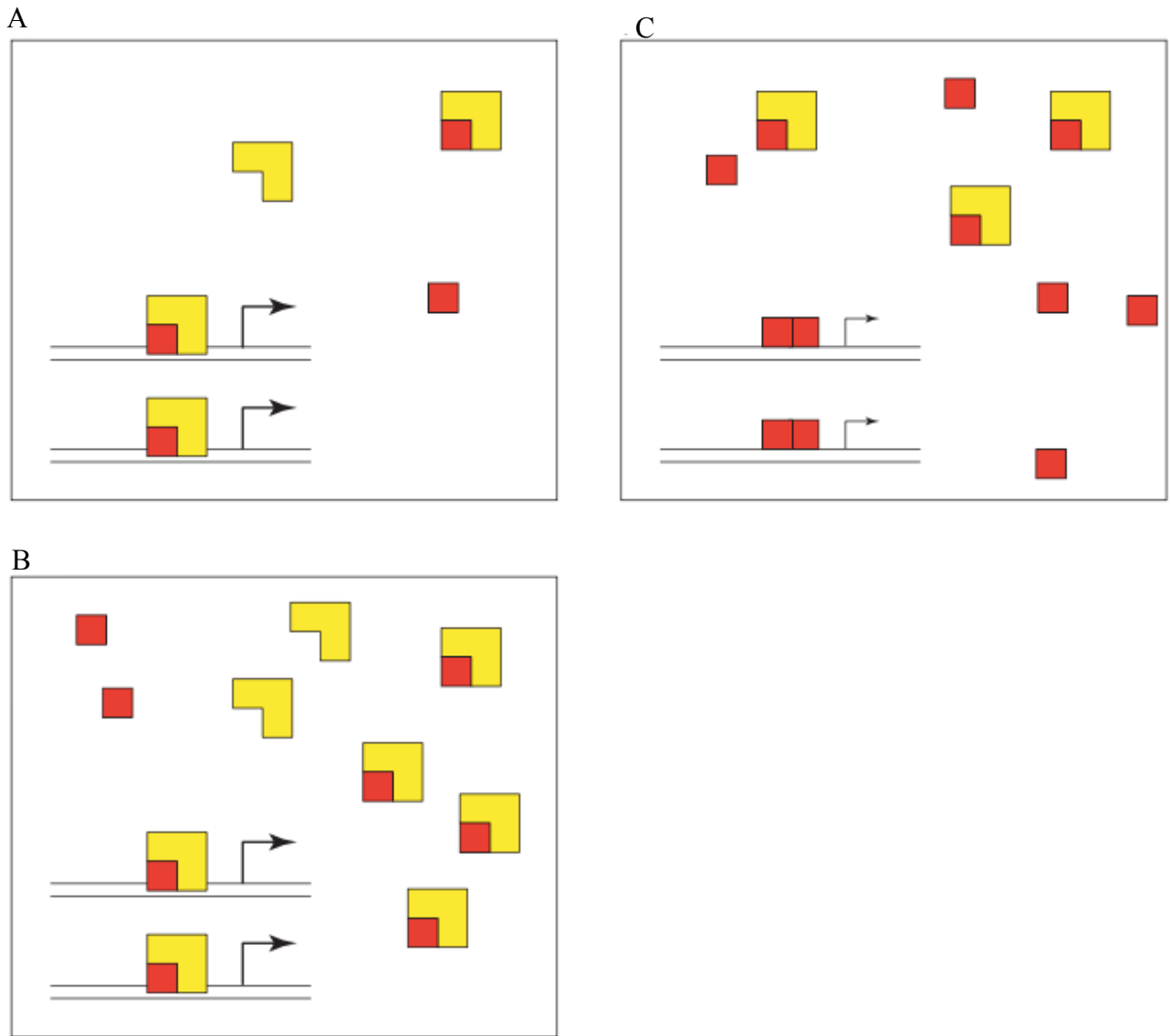


Figure 11 : balance du dosage des gènes dupliqués. Rouge = régulateur 1, jaune = régulateur 2. A : stoechiométrie respectée , B : stoechiométrie respectée malgré l'augmentation de la quantité de régulateurs due à des duplications, C : stoechiométrie non respectée, expression du gène cible dérégulée. D'après Birchler et al. 2005.

l'acquisition d'une nouvelle fonction (Francino et al., 2004). Un exemple est donné pour représenter une famille de gènes évoluant suivant le modèle de radiation adaptative : la famille OR (récepteurs olfactifs) chez l'humain.

- **Modèle de l'hétérozygote permanent** : des études ont montré que l'avantage apporté par l'hétérozygotie pouvait mener à la fixation et la maintenance de duplications de gènes (Innan and Kondrashov, 2010). Le modèle suggère que les forces de l'évolution agissent sur les duplications avant qu'elles n'aient lieu, au sein du gène en simple copie (Proulx and Phillips 2006). De multiples variants alléliques peuvent apparaître et se maintenir, sous certaines conditions, dans une population. Les allèles de la population montrant un avantage de l'hétérozygotie vont ensuite être ségrégués. Une duplication impliquant un gène à l'état hétérozygote avantageux va créer une nouvelle copie qui sera fixée plus rapidement qu'un allèle neutre puisque l'allèle hétérozygote apporte un avantage.
- **Modèle de la sélection diversifiante multi-allélique** : le modèle ressemble au modèle de l'hétérozygote permanent. Les auteurs proposent que pour certains gènes la sélection favorise le brassage génétique. Un gène en simple copie qui serait sous sélection diversifiante multi-allélique accumule plusieurs allèles avec différentes fonctions. De ce fait, une copie dupliquée de ce gène sera sélectionnée comme dans le modèle de l'hétérozygote permanent, sauf que cette fois, les recombinaisons seront maintenues en priorité (Proulx and Philips, 2006, Innan and Kondrashov, 2010).

Une dernière catégorie de modèles expliquant le maintien de gènes dupliqués postule que la fixation d'une copie dupliquée est la résultante d'autres événements comme des duplications à plus large échelle par exemple :

- **L'hypothèse de la balance du dosage des gènes** : le changement d'un membre d'un complexe génique de régulation entraîne la modification du complexe entier ainsi que son efficacité (Birchler et al. 2005). Les complexes régulateurs chez les eucaryotes sont donc sensibles au dosage génique, et un changement dans une composante d'un réseau d'interaction génique entraîne un effet sur le phénotype. La figure 11, adaptée d'après Birchler et al., 2005, présente le concept de balance des gènes. Dans un génotype les régulateurs 1 et 2 (respectivement rouge et jaune) coexistent dans une stoechiométrie particulière pour assurer un certain niveau d'expression (matérialisés

par des flèches) des loci cibles (figure 11 A). Si le ratio régulateur 1/régulateur 2 est maintenu bien que les quantités de régulateurs changent, le niveau d'expression des loci cibles restera inchangé (figure 11 B). Si seul le taux de régulateur 2 change, alors le rapport stoechiométrique des 2 régulateurs sera différent, et ce défaut dans la balance génétique résulte en l'altération de l'expression des loci cibles (figure 11C). Si le nombre de cibles augmente mais pas le ratio régulateur 1/ régulateur 2, alors la balance des régulateurs est maintenue et l'expression du gène cible est proportionnelle aux nombres de copies de ce gènes (Gibson and Spring 1998; Veitia 2003).

3.2.4 *La rétention ou l'élimination des nouvelles copies de gènes après duplication n'est pas aléatoire chez les plantes*

Il a été montré, chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, lors d'une étude comparant l'ontologie des gènes dupliqués durant un évènement récent de polyploïdisation chez les levures (Wolfe and Shields 1997), que le maintien ou la perte de copies dupliquées n'est pas toujours aléatoire (Seoighe and Wolfe 1999). En effet, on constate une élimination aléatoire, préférentielle ou un maintien préférentiel des copies dupliquées, et ce, de façon dépendante de la fonction de la protéine codée. Des études ont contribué à démontrer que chez les plantes, des biais existent également dans la rétention et la perte de certaines copies par rapport à d'autres. Chez *A. thaliana*, deux études ont procédé à l'identification de gènes dupliqués lors du dernier évènement de polyploïdie ayant eu lieu chez cette espèce (Bowers et al. 2003; Blanc et al. 2003). Puis, Blanc et Wolfe, (2004), ont examinés la répartition de ces copies dupliquées dans différentes catégories fonctionnelles. Pour cela, ils ont fait appel à deux types de classification : la classification GO (Gene Ontology) (Ashburner et al. 2000) et la classification MIPS (Mewes et al. 2002; Schoof et al. 2002) appliquées à *A. thaliana*. Ces deux types de classification permettent d'avoir un langage commun pour l'annotation des protéines. GO utilise un schéma, dans lequel les grandes fonctions sont : les fonctions moléculaires, les processus biologiques et les composants cellulaires. Ces grandes fonctions sont divisées en de nombreuses sous-classes fonctionnelles. Avec les deux types de classification, les auteurs ont montré que 94% (sur l'ensemble des gènes identifiés par Bowers et al., 2003) et 93% (sur l'ensemble des gènes identifiés par Blanc et al., 2003) les catégories fonctionnelles testées ne montrent pas de sur- ou sous-représentation de copies de gènes dupliquées. Pour ces catégories, on peut imaginer que les copies dupliquées sont retenues aléatoirement dans le génome, et de façon indépendante des fonctions des protéines codées

par ces gènes. Néanmoins, ce chiffre n'atteint pas 100%, ce qui montre bien, que chez certaines catégories fonctionnelles, il y a une préférence pour le maintien ou la perte de gènes dupliqués après des évènements de WGD.

Les gènes dont les copies dupliquées sont surreprésentées sont :

- Des gènes codant pour des protéines de la machinerie cellulaire : ribosomes, métabolisme Cys, protéasome, glycolyse, photosystèmes, métabolisme nucléotides-sucres.
- Des gènes codant pour des protéines impliquées dans la transduction des signaux et les fonctions régulatrices : facteurs de transcription, kinases, phosphatases, protéines de liaison avec le calcium.
- Des gènes codant pour des protéines impliquées dans le transport d'ions et le catabolisme de stockage dépendant de l'ubiquitine.

Les copies dupliquées de ces gènes sont préférentiellement maintenues dans le génome d'*A. thaliana*. La catégorie des gènes codant des sous-unités ribosomales, des phosphatases et des kinases est également représentée chez la levure *S. cerevisiae* (Seoighe and Wolfe, 1999). Un évènement de WGD conduit au doublement du contenu en ADN nucléaire et donc des gènes nucléaires, ce qui demande une augmentation de la production d'énergie pour les voies métaboliques. Pour pallier cela, soit les gènes retournent en copie simple mais leur niveau d'expression peut être augmenté, soit la présence de deux copies est requise pour assurer la fonction métabolique : c'est vraisemblablement le cas pour les gènes codant pour les protéines du protéasome, les protéines impliquées dans le métabolisme Cys et le métabolisme nucléotides-sucres, ainsi que la glycolyse.

De plus, les gènes impliqués dans la régulation, la transduction des signaux ou la transcription sont fortement dépendant du dosage chez les eucaryotes multicellulaires (Birchler et al. 2001). En effet, les effets phénotypiques qu'engendrent la transcription de ces gènes sont plutôt de l'ordre du quantifiable : taux d'un métabolite, niveau d'expression d'un gène, taille d'un organe, etc. de ce fait, ces gènes sont très sensibles au dosage. Le phénotype dépend directement du nombre de copies et du niveau d'expression de ces gènes, ou de leurs gènes cibles (Birchler et al., 2001). La sélection sur ces gènes dupliqués favorise leur rétention dans le génome, afin d'augmenter leur nombre.

Pour les gènes codant pour des protéines fonctionnant en complexes, l'hypothèse de la balance du dosage des gènes est le moteur favorisant la rétention préférentielle des copies

dupliquées (Veitia, 2003 ; Birchler et al., 2005). Il s'agit des gènes codant des protéines ribosomales, nucléosomales, kinases, phosphatases, et du protéasome, qui présentent des sous-unités respectant la stœchiométrie et, par conséquent, sensibles au dosage. Un évènement de WGD doit conduire à leur maintien préférentiel.

Les gènes dont les copies dupliquées sont sous-représentées sont :

- Les gènes de défense,
- Les gènes codant pour des protéines impliquées dans les mécanismes de réparation de l'ADN, apoptose, ARNt synthétase, les flavoprotéines et les récepteurs transmembranaires,

Les gènes de défense sont probablement sous-représentés parce qu'ils évoluent à travers un processus de naissance/mort, caractérisé par de fréquentes duplications suivies de délétions (Nei et al. 1997; Michelmore and Meyers 1998; Blanc and Wolfe 2004). Chez les plantes, les gènes R (gènes de résistance contre les agents pathogènes), sont en co-évolution avec les gènes Avr (gènes d'avirulence chez les agents pathogènes). L'interaction simplifiée des gènes R et Avr repose sur la théorie « gène pour gène ». Aussi, des cycles de détection et mutations sont inhérents à la co-évolution des plantes et de leurs agents pathogènes potentiels (Michelmore and Meyers 1998). Ce type de mécanisme de co-évolution cyclique est générateur de nouveautés géniques. Les forces permettant d'obtenir une telle diversité de gènes sont les duplications, mutations et la sélection diversifiante. Le mécanisme de naissance-mort des gènes dans un génome est souvent relié et comparé au mécanisme d'évolution concertée, dans lequel tous les membres d'une famille multigénique évoluent de concert. L'apparition d'une mutation dans l'un des membres s'étend à la famille entière par répétitions de crossing over ou de conversion de gènes (Nei and Rooney 2005). Chez les plantes, une analyse des génomes d'*A. thaliana*, *O. sativa* (riz) et *P. trichocarpa* (peuplier), a montré que beaucoup de gènes de la superfamille des protéines F-box, formant un composant du complexe de liaison à l'ubiquitine SCF (Shp1-Rbx1-Cul1-FBox), ont subi beaucoup d'évènements de duplication (Xu et al. 2009). Pour cette famille de gènes, les auteurs proposent une évolution de type naissance/mort de copies de façon cyclique liée à la fonction de ces protéines, afin de pouvoir répondre à la demande forte de protéolyse. En effet, durant l'évolution, les duplications ont généré de plus en plus de protéines devant être régulées par protéolyse (Xu et al., 2009).

Pour les autres catégories de gènes, dont les copies sont sous représentées (réparation de l'ADN et ARNt synthétase), l'on peut imaginer que la présence de plus d'une copie aurait un caractère délétère pour la plante (Blanc and Wolfe, 2004).

3.3 Conséquences des évènements de duplications géniques

La duplication de gènes, qu'elle soit à large ou petite échelle, est le moteur de la génération de nouveauté fonctionnelle et de la spécialisation (Ohno, 1970). En effet, suite à des évènements de WGD, de nouveaux phénotypes peuvent apparaître (Carroll 2005). Les conséquences des évènements de duplication prouvent qu'ils constituent une force significative de l'évolution des êtres vivants, notamment et de manière accrue chez les Angiospermes (Osborn et al. 2003).

Après des évènements de WGD, le retour à la diploïdie est commune et se fait généralement en quelques Ma (Allendorf et al. 1975; Ferris and Whitt 1979; Whitkus et al. 1992; Ahn and Tanksley 1993; White and Doebley 1998; Bowers et al. 2003). De plus, 25 à 30 % des plantes actuelles se retrouvent encore à l'état polyploïdes (Scarpino et al. 2014; Wood et al. 2009; Barker et al. 2016). Ces deux éléments signifient que les plantes polyploïdes ont le potentiel de survivre, s'adapter en tant que telles et de perdurer sur le long terme.

En effet, il a été montré que les évènements de polyploïdisation présentent un potentiel adaptatif important rendant certains polyploïdes capables de survivre et de prospérer à court terme (Comai 2005; Leitch and Leitch 2008; Soltis et al. 2009; te Beest et al. 2011; Madlung 2013; Bomblies and Madlung 2014) mais aussi à long terme (Van de Peer et al., 2017). Sur le long terme, des travaux ont aboutis à l'hypothèse que les polyploïdes forment de nouvelles espèces plus lentement, et s'éteignent plus rapidement dans une population que les diploïdes, particulièrement dans les environnements stables car les polyploïdes sont moins compétitifs que les diploïdes bien mieux adaptés (Mayrose et al. 2015; Oberlander et al. 2016). Il a récemment été suggéré que la vraisemblance d'établissement de nouveaux polyploïdes sur leur site d'origine est faible et dépend de nombreux facteurs tels que la séparation de niche écologique avec leurs géniteurs diploïdes, la taille de la population, la fécondité et l'auto-fertilisation (Fowler and Levin 2016).

Pour pouvoir ne serait-ce qu'engendrer une descendance, amenant au maintien à très court terme des polyploïdes, ceux-ci doivent se reproduire avec des polyploïdes de même

ordre afin d'éviter l'exclusion du cytotype minoritaire (Van de Peer et al., 2017). Or, dans l'environnement des polyploïdes, cohabitent des diploïdes avec lesquels ils ne peuvent se reproduire et engendrer une descendance. L'avantage des plantes est qu'elles peuvent développer des mécanismes d'autofécondation alors que ce n'est pas le cas pour la grande majorité des animaux, ainsi que se reproduire de manière végétative. Il a été observé que la polyploïdisation chez les plantes s'accompagne le plus souvent d'une transition à l'autopollinisation ou d'un passage d'une reproduction sexuée à une reproduction asexuée (Comai, 2005). Ces mécanismes de reproduction s'affranchissant du besoin d'un partenaire sexuel permettent d'assurer la pérennité des polyploïdes chez les plantes. Empêcher la fécondation par des diploïdes en renforçant des barrières pré-zygotiques paraît être le premier point crucial pour l'établissement d'une espèce polyploïde en sympatrie (avec d'autres espèces diploïdes) (Husband et al. 2016).

Pour pouvoir s'adapter et s'imposer à plus long terme, il faut être capable de coloniser un écosystème de s'y reproduire et d'y prospérer. Or, l'autopollinisation apporte des changements dans le génome et une variabilité importante chez les polyploïdes. Ces variabilités sont vectorisées par des changements dans l'expression de gènes et le remodelage épigénétique (Doyle et al. 2008; Lavania et al. 2012; Soltis et al. 2014; Shi et al. 2015; Song and Chen 2015; Schoenfelder and Fox 2015). Ces changements peuvent affecter la morphologie, la physiologie et l'écologie des nouveaux polyploïdes et donc affecter les interactions inter-espèces, ce qui peut favoriser la spéciation et l'établissement des polyploïdes, même dans un environnement où ils sont en compétition avec des diploïdes très adaptés (te Beest et al. 2011; Soltis et al. 2014; McCarthy et al. 2016). Par exemple, il a été montré que la couleur et l'odeur des fleurs est différente chez les orchidées, selon que la plante soit diploïde ou polyploïde (Gross and Schiestl 2015). La préférence de certains types de fleurs par certains types de pollinisateurs permet d'éviter que les gamètes des diploïdes n'interfère trop avec celles des polyploïdes dans une population mixte, soit d'isoler la reproduction des polyploïdes afin qu'ils puissent s'établir (Segraves and Anneberg 2016). En même temps, une sélection s'applique également sur les insectes (Labandeira and Sepkoski 1993). Les notions de duplications/polyploïdisation, de spéciation et de co-évolution, moteurs de l'évolution des espèces et des génomes peuvent donc être intimement connectées.

Une étude propose le modèle de WGD lag-time pour expliquer que les taux de diversification des polyploïdes sont meilleurs que ceux des diploïdes mais uniquement après un délai de plusieurs Ma (Tank et al. 2015; Schranz et al. 2012). Le modèle LORe (Robertson

et al. 2017), suggère en effet que la diversité fonctionnelle des gènes responsables des adaptations spécifiques et de la diversification peut être repoussée de 10 Ma et aboutit au retour à la diploïdie (Furlong and Holland 2002). Des polyploïdes ayant survécu à plus de 10 Ma sont peu connus chez les animaux et les champignons. Ils sont beaucoup plus nombreux en revanche chez les plantes. Même chez les plantes, une faible part de polyploïdes survit à court terme et sont établis sur le long terme.

Il a été argumenté que le seul moyen vraiment nécessaire à la survie des polyploïdes à long terme est le changement de niche écologique (Van de Peer et al. 2009). Les polyploïdes, 20% plus invasives que les diploïdes (Pandit et al. 2011), sont en compétition avec les diploïdes dans les environnements stables (Oberlander et al. 2016). Aussi, le potentiel des évènements de WGD à augmenter la diversité phénotypique et génotypique est moins utile lorsqu'aucune niche écologique n'est disponible pour l'installation d'organismes ayant développé des caractères intéressants pour la survie dans ce type de niche (Van de Peer et al., 2017).

La figure 7, représente les évènements de WGD majeurs ayant eu lieu chez les plantes, ainsi que les grands évènements d'extinction d'espèces dus à l'instabilité environnementale (Van de Peer et al., 2017). La distribution des évènements de WGD chez les paléopolyploïdes (espèces ayant subi dans le passé des évènements de polyploïdie) sur cet arbre n'est pas aléatoire et supporte la théorie, selon laquelle la survie est associée à des périodes géologiques spécifiques, durant lesquelles des bouleversements environnementaux ont eu lieu. Pour expliquer ceci, exemple très marquant du rôle des WGD dans l'évitement de l'extinction pouvant être utilisé est celui des Angiospermes. Une vague de WGD a eu lieu entre le Crétacé et le Paléogène (K-Pg) (Fawcett et al. 2009; Van de Peer et al. 2009; Vanneste et al. 2014; Huang et al. 2016; Yu et al. 2017), période marquée par des évènements cataclysmiques (impacts de météorites à Chicxulub au Mexique et impact induit par le flux issu du volcanisme du Deccan en Inde)(Renne et al. 2015). Ces évènements ont été causés par des changements climatiques, notamment un réchauffement climatique global (Petersen et al. 2016) et ont résulté en l'extinction de 60 à 70 % des plantes et animaux, incluant les dinosaures non aviaires (Mable et al. 2011). En effet, sur la figure 7 on remarque un groupe d'évènements de WGD partagé par de très nombreuses lignées chez les plantes, ayant eu lieu entre les périodes du Crétacé et du Paléogène. Chez les Gymnospermes, bien qu'il n'y ait pas eu de WGD pendant la période K-Pg, il a été suggéré que certains anciens évènements de WGD aient eu lieu en même temps que l'extinction massive s'étant déroulée entre le Permien

et le Triassique (Li et al. 2015). Chez un conifère aujourd'hui éteint (état de fossile), l'augmentation du niveau taux de pollen non-réduit a été attribuée à la période à la jonction entre Triassique et Jurassique, correspondant au 4^e des cinq grands évènements d'extinction ayant eu lieu sur Terre. De plus, du pollen atypique (Foster and Afonin 2005) et des spores atypiques de lycophytes ont été retrouvés sur des fossiles datant de la liaison Permien-Triassique, c'est-à-dire dont la formation a eu lieu dans une période correspondant au 3^e grand évènement d'extinction. Ceci traduit très probablement la survenue d'évènement de WGD chez les conifères durant la période entre le Triassique et le Jurassique et la survenue d'évènement de WGD chez les lycophytes durant la période entre le Permien et le Triassique. L'augmentation de la formation de gamètes non réduits a pu jouer un rôle important également dans l'apparition chez les plantes de toutes les WGD mises en évidence à la jonction K-Pg (figure 7), représentant le 5^e grand évènement d'extinction, et le plus récent (Vanneste et al. 2014).

La survie des polyploïdes serait fortement corrélée avec les grands changements climatiques et météorologiques. Les polyploïdes peuvent être retrouvés dans des habitats anciennement glacés et représentent le résultat d'hybridation allospécifiques d'espèces proches, anciennement séparées par la glace qui formait une barrière (Stebbins 1984; Theodoridis et al. 2013) Les grandes périodes de changement climatique et d'extinction ont permis l'émergence de nouvelles niches écologiques pouvant être envahies par les polyploïdes.

Une étude réalisée sur vingt espèces de plantes ne supporte pourtant pas l'hypothèse d'un décalage de niche écologique basé uniquement sur le climat, comme cela peut être supposé au vu des périodes bien précises d'apparition de polyploïdes conservés chez les plantes. En réalité, dans cette étude, des conversions ou contractions de niches écologiques ont plutôt été observées (Glennon et al. 2014). L'ampleur avec lequel les polyploïdes s'établissent sur le long terme à travers la différenciation de niches et comment cela est lié à un changement écologique restent des interrogations à éclaircir.

Récemment, une étude sur la distribution géographique, la taille et le chevauchement des niches écologiques de 13 allopolyploïdes et de leurs parents diploïdes aboutit à l'hypothèse que c'est la diversité allélique des allopolyploïdes qui aboutirait à l'occupation de plus larges niches écologiques distinctes de celles de leurs géniteurs (Blaine Marchant et al. 2016). Ceci a déjà été proposé dans une étude antérieure (Theodoridis et al. 2013). Toutefois,

la plupart des niches écologiques d'allopolyploïdes montrent un chevauchement important avec au moins celle d'un de leurs géniteurs.

Chez les plantes, certains évènements de WGD ne correspondent pas à des périodes d'extinction massive. C'est le cas des WGD ayant eu lieu tôt dans l'évolution des Angiospermes (Jiao et al., 2011), avant la divergence des monocotylédones (Ming et al. 2015) ou des eudicotylédones (Vekemans et al. 2012). Nous pouvons imaginer qu'à ces moments-là les polyploïdes ont pris possession de niches écologiques inoccupées car les caractères nécessaires à la survie dans ces niches n'avaient pas encore été développés. Certaines innovations clefs ont en effet été attribuées à la diversité génétique des polyploïdes ayant permis leur radiation et l'invasion de niches écologiques inoccupées jusqu'alors. C'est le cas par exemple de l'apparition et l'évolution des fleurs (Jiao et al., 2011, Soltis and Soltis, 2016).

Enfin, la diversité et les changements génétiques apportés par la polyploïdie peuvent également influencer sur l'augmentation de la tolérance à un large spectre de conditions abiotiques et biotiques. La résistance des polyploïdes aux pathogènes ou aux prédateurs herbivores a notamment été démontrée (Oswald and Nuismer 2007; Oberlander et al. 2016; Vergara et al. 2016). En effet, ces changements peuvent entraîner des changements du métabolisme secondaire et donc de production de composés secondaires différents de la population de diploïdes en place (Lavanaia et al., 2012 ; Vergara et al., 2016). A plus long terme, la néo-fonctionnalisation des gènes suivant un événement de WGD chez les Angiospermes de l'ordre des Brassicales a probablement eu une grande influence sur l'échappement aux ravages causés par les herbivores (Edger et al. 2015; van den Bergh et al. 2016). La polyploïdie aurait également des effets bénéfiques sur la tolérance à des conditions environnementales rudes. Cela est particulièrement difficile à montrer mais quelques études y ont contribué. Pour des plantes d'accessions tétraploïdes naturelles d'*A.thaliana*, la polyploïdie confère une meilleure résistance au stress salin en régulant le niveau de potassium dans les feuilles (Chao et al. 2013). Une meilleure résistance au stress salin et à la sécheresse a aussi été déterminée chez des tétraploïdes naturels de riz et citrus par le biais de l'expression de gènes impliqués dans les voies de réponses aux hormones de stress (Yang et al. 2014).

4 Etat des lieux de l'évolution des transporteurs de sucres chez les plantes

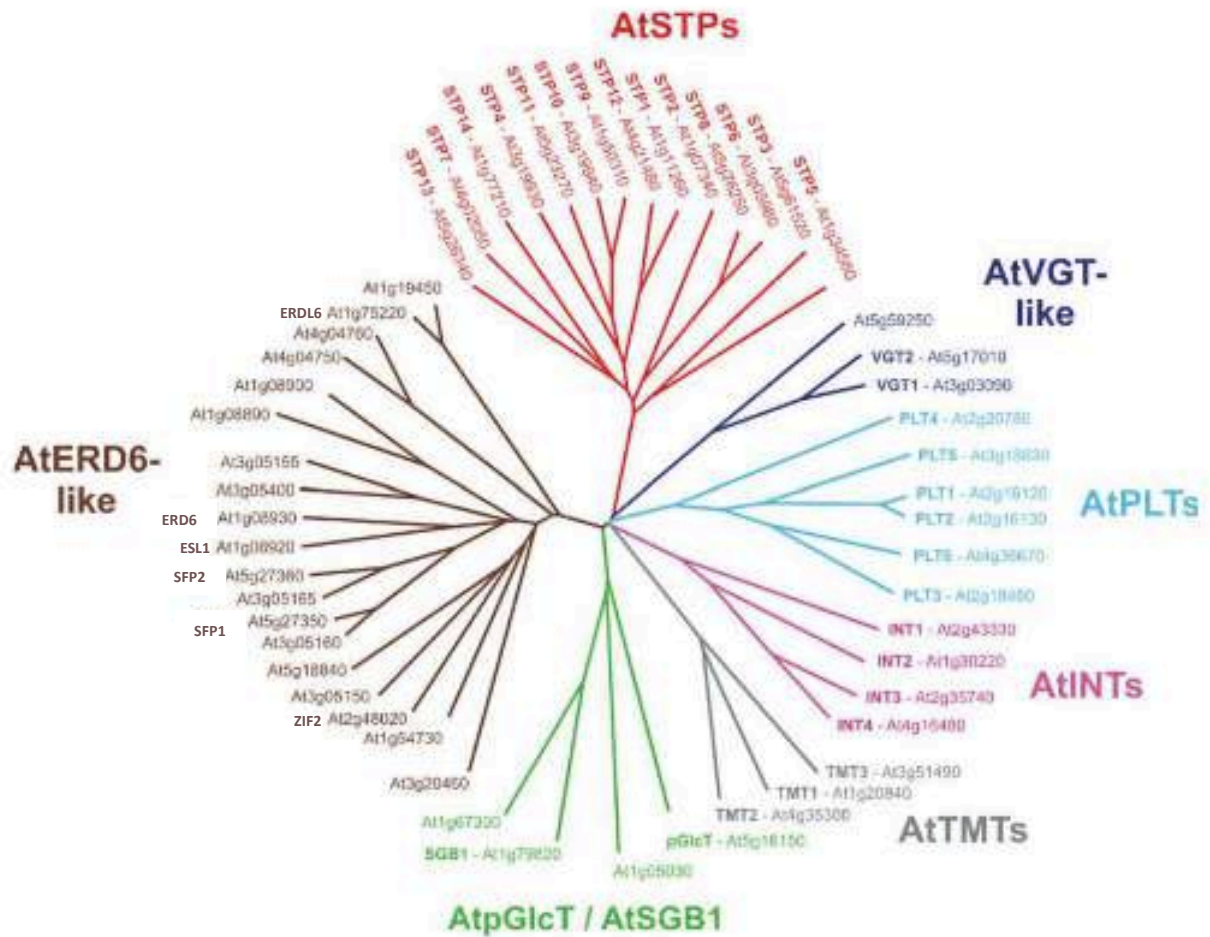


Figure 12 : représentation de l'évolution des 7 sous-familles de transporteurs de monosaccharides chez *Arabidopsis thaliana*. D'après Büttner et al., 2007.

4.1 Evolution des transporteurs de disaccharides chez les plantes

Cinq groupes de SUC/SUT ont été décrits d'après des analyses phylogénétiques (Sauer et al. 2007 ; Kuhn et Grof 2010 ; Ayre, 2011 ; Reinders et al. 2012 ; Peng et al. 2014).

La recherche de transporteurs SUC/SUT dans les génomes complets de Bryophyte (*Physcomitrella patens*) de Lycophyte (*Selaginella moellendorffii*) de Chlorophytes (*Chlamydomonas reinhardtii*, *Volvox carterii*) et dans les génomes partiels d'algues rouges (*Galdieria sulphuraria*, *Cyanidioschyzon merolae*) ainsi que dans des séquences EST de Charophytes (*Chlorokybus Atmosphyticus*) a permis de suggérer que les transporteurs de saccharose des plantes terrestres pourraient dériver de ceux des Charophytes puisqu'un transporteur (CaSUT1) identifié dans le génome de *Chlorokybus Atmosphyticus* apparaît à la base de tous les clades de SUT des plantes terrestres (Reinders et al. 2012) et qu'aucun transporteur n'a pu être identifié pour les Chlorophytes. Cependant, il est intéressant de noter que 6 transporteurs homologues aux SUC/SUT des plantes terrestres ont été identifiés dans les génomes d'algues rouges, 5 chez *G. sulphuraria* et un dans le génome de *C. merolae*. De plus, grâce à une étude plus approfondie, Peng et al., 2014 ont pu identifier deux transporteurs de saccharose dans les génomes de deux chlorophytes (*Ostreococcus lucimarinus* et *Ostreococcus tauri*) tout en confirmant l'absence de transporteurs pour *Chlamydomonas reinhardtii* et *Volvox carterii*. Ces résultats indiquent la présence dans le génome de certaines algues vertes et algues rouges de transporteurs apparentés aux transporteurs de saccharose et suggèrent donc une origine ancienne pour les transporteurs de saccharose.

4.2 Evolution des transporteurs de monosaccharides chez les plantes

Plusieurs études phylogénétiques relatent l'évolution des transporteurs de monosaccharides chez *A. thaliana* (Johnson et al. 2006; Büttner 2007) ainsi que chez le riz (Johnson and Thomas 2007). La figure 12 (Büttner 2007) montre l'arbre phylogénétique des transporteurs de monosaccharides chez *A. thaliana* et met en évidence que la sous-famille ERD6-like est bien représentée au sein de la MST. Des protéines de séquences homologues à des transporteurs d'hexoses sont retrouvées chez l'algue unicellulaire *Chlorella kessleri* (Sauer and Tanner 1989; Johnson and Thomas 2007). Néanmoins, elles ne peuvent être classées dans aucune sous-famille de la famille des MST. Il existe bien un système de protéines permettant le transport d'hexoses chez les algues.

En recherchant dans des bases de données d'EST de diverses espèces reflétant l'ensemble des plantes terrestres, Johnson et al., (2006) ont pu identifier des orthologues pour 6 sous-familles de transporteurs de monosaccharides chez la mousse *Physcomitrella patens*. La sous-famille des PLT est la seule à ne pas être retrouvée chez cette espèce. Des EST de PLT sont détectées uniquement à partir des Ptéridophytes (*Ceratopteris richardii*) qui ont divergé il y a 400 million d'années. Ces observations suggèrent que la famille des transporteurs de monosaccharides est ancienne et était présente il y a au moins 400 millions d'années. Cette étude a également montré que les niveaux d'expression varient selon les lignées avec une expression plus forte pour les STP, ERD6-like, INT et PLT dans les plantes vasculaires et que l'expansion des sous-familles les plus larges semblent être due à de multiples duplications de gènes. La comparaison de la famille MST chez le Riz et chez *Arabidopsis* (Johnson et Thomas, 2007) a mis en évidence que cette famille est beaucoup plus grande chez le Riz que chez *Arabidopsis*. Cette différence s'explique par des duplications en tandem qui auraient conduit d'une part à l'expansion des sous-familles de STP et de PLT chez le riz et d'autre part à l'expansion de la sous-famille des ERD6-like chez *A. thaliana*. En effet, 14 des 29 STP de riz sont dupliqués en tandem contre seulement 2 des 14 AtSTP, 10 des 15 PLT de riz sont dupliqués en tandem contre 2 des 6 AtPLT et à l'inverse 13 des 16 AtERD6-like sont dupliqués en tandem chez *Arabidopsis* contre seulement 4 des 6 ERD6-like de riz. Chez le riz, le fait que les duplications d'*ERD6-like* soient moins nombreuses, pourrait expliquer que cette sous-famille soit moins représentée dans cette espèce. Enfin, chez *A. thaliana*, il y aurait eu, en plus des duplications d'*ERD6-like* en tandem dans le génome, trois duplications segmentales ayant conduit à des duplications de copies *ERD6-like*. D'après Johnson et al., 2006, c'est le cas des paires *At1g75220- At1g19450* ; *At3g05155-At3g0150* et *At5g27350-At5g27360*. Les duplications en tandem sont donc très nombreuses chez les ERD6-like par rapport aux duplications en tandem visibles chez les autres membres de la MST.

5 Objectifs de la thèse

Les travaux de recherche de l'équipe SEVE sont dédiés aux transporteurs de sucres chez les plantes et à leur implication dans les réponses aux stress biotiques et abiotiques,

notamment le stress hydrique. Avant mon arrivée en thèse, l'identification des transporteurs de sucres dans le génome de *Vitis vinifera* (vigne) et la cartographie de leur expression ont été réalisées dans l'équipe (Afoufa-Bastien et al. 2010). Vingt-deux ORFs de transporteurs ERD6-like potentiels avaient été identifiés dans cette étude. Cette sous-famille semble donc être très représentée chez la vigne, tout comme chez *A. thaliana* (19 gènes ERD6-like). De plus, au cours de cette étude, il est apparu que 14 *ERD6-like* étaient dupliqués en tandem dans une région de 150 Kpb du chromosome 14. Cette observation nous a interpellés quant à la raison ou la nécessité pour la plante d'un tel nombre d'*ERD6-like* dupliqués aussi bien dans le génome de la vigne que dans celui d'*A. thaliana* (Johnson et al. 2006). De plus, alors que de très nombreuses études ont été réalisées sur les transporteurs de saccharose et sur la plupart des sous-familles des transporteurs de monosaccharides, notamment la sous-famille des STP chez *A. thaliana*, très peu de travaux ont été publiés à propos de celle des ERD6-like qui est pourtant, chez la Vigne et chez Arabidopsis, une des deux plus importantes sous-famille de transporteurs de monosaccharides, du moins en nombre de gènes. Il nous a donc paru important de caractériser ces transporteurs afin d'obtenir une vision plus large de la répartition des sucres dans la plante.

Ainsi, notre volonté d'étudier de façon exhaustive cette famille de gènes *ERD6-like* nous a conduits à développer, dans un premier temps, une approche de génomique évolutive. Cette approche a pour objectif premier d'identifier des protéines ERD6-like chez un maximum d'espèces, en couvrant au mieux le règne végétal et pour second objectif d'établir une phylogénie de ces transporteurs nous permettant d'inférer nos observations sur l'arbre du vivant récent (Time Tree of Life) (Hedges et al. 2006 ; Kumar and Hedges 2011 ; Hedges et al. 2015). A partir de l'arbre phylogénétique obtenu, l'enjeu a été d'analyser la possibilité de faire un lien entre l'évolution des transporteurs ERD6-like, la structure introns/exons des gènes codant pour ces transporteurs, et les niveaux d'expression de cette famille de gènes, chez la plante modèle *A. thaliana*.

Etant donné que les quelques ERD6-like ayant été étudiés sont a priori tous régulés par des stress abiotiques variés, nous avons dans un deuxième temps réalisé une cartographie de l'expression des gènes *ERD6-like* d'*A. thaliana* dans les différents organes de la plante en condition normale de culture et dans les feuilles de plantes soumises à une carence en eau par arrêt d'arrosage. L'ensemble des résultats obtenus, grâce aux deux approches, a permis de sélectionner des gènes *ERD6-like* dont l'expression est induite en condition de carence en eau et pour lesquels des mutants d'insertion ont été étudiés dans un contexte de stress hydrique.

Matériel et Méthodes

Tableau 1 : récapitulatif des lignées mutantes d'insertion d'ADN-T commandées

Si une lignée a déjà été étudiée dans la littérature, la publication d'origine est mentionnée

Gène	Salk/Gabi-Kat	NASC	position de l'insertion	publication d'origine
<i>At1g19450</i>	SALK_116041	N616041	exon 1	
	GK131B11-013050	N412503	exon 2	
<i>At1g75220</i>	SALK_106049	N656841	exon 17	<i>Poschet et al., 2011</i>
<i>At3g05150</i>	SALK_104265	N604265	exon 11	
<i>At5g18840</i>	SALK_095136	N595136	exon 4	
<i>At1g54730</i>	GK-132c04	N412604	exon 2	
<i>At4g04750</i>	SALK_032258	N532258	exon 18	
<i>At4g04760</i>	SALK_132009	N656991	exon 14	
<i>At1g08890</i>	SALK_047351	N547351	exon 15	
<i>At1g08920</i>	SALK_025646	N661901	exon 5	<i>Yamada et al., 2010</i>
<i>At1g08930</i>	SALK_132824	N664046	exon 1	
<i>At3g05155</i>	SALK_066578	N656600	exon 7	
<i>At3g05400</i>	SALK_009846	N656150	exon 2	
<i>At3g05165</i>	SALK_023685	N523685	exon 5	

1 Matériel végétal et conditions de culture des plantes

1.1 Matériel végétal

Des graines de l'écotype sauvage Columbia 0 (Col-0) d'*Arabidopsis thaliana* et de 14 lignées mutantes d'insertion d'ADN de transfert (ADN-T), chacune affectée dans un gène *AtERD6-like*, ont été utilisées pour cette étude. Les lignées mutantes ont été identifiées à l'aide du site SIGnAL (SALK Institute Genomic Analysis Laboratory – <http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>) et du site GABI-Kat (Genomanalyse im Biologischen System Pflanze – Kölner Arabidopsis T-DNA lines - <https://www.gabi-kat.de>) et ont été fournies par le NASC (The European Arabidopsis Stock Center : <http://arabidopsis.info/>). Un récapitulatif de l'ensemble des lignées mutantes est présenté dans le tableau 1.

1.2 Culture des plantes en condition normale d'arrosage

Les graines d'*Arabidopsis thaliana* écototype Col-0 sont semées dans un mélange de terreau et de vermiculite (3/1 v/v). Après une période de 48 h à 4°C pour synchroniser les germinations, le semis est transféré dans une chambre de culture dont l'environnement est contrôlé au niveau de la photopériode (jours courts : 10 h de jour à une intensité lumineuse de 60 -70 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), de l'hygrométrie (50% le jour et 90% la nuit) et de la température (22°C jour et 18°C nuit). Une fois les jeunes germinations suffisamment développées (12 jours après le semis), les plantules sont repiquées dans des ArasystemTM (BETATECH bvba, Belgique) contenant 50 \pm 2 g du même mélange terreau / vermiculite (3/1 v/v) afin que la quantité de substrat soit identique pour chaque plante. Les plantes sont maintenues dans la chambre de culture à raison de 15 plantes par plateau. Jusqu'au 35^{ème} jour de culture les plantes sont arrosées une fois par semaine par bain d'eau enrichi en engrais [PETERS (20/20/20 ; N/P/K] pendant 1 h.

Pour identifier des lignées d'*A. thaliana* mutantes homozygotes, les lignées mutantes commerciales ont été cultivées dans les mêmes conditions que précédemment décrit à la seule différence que les graines ont été semées directement dans les ArasystemTM dans un mélange de terreau/vermiculite (3/1 ; v/v) à raison de 20 graines par lignée mutante Gabi-Kat, 10 graines par lignée mutante définie comme hétérozygote par SALK et 5 graines par lignée mutante préalablement identifiée comme lignée homozygote par SALK. Les semis ont ensuite

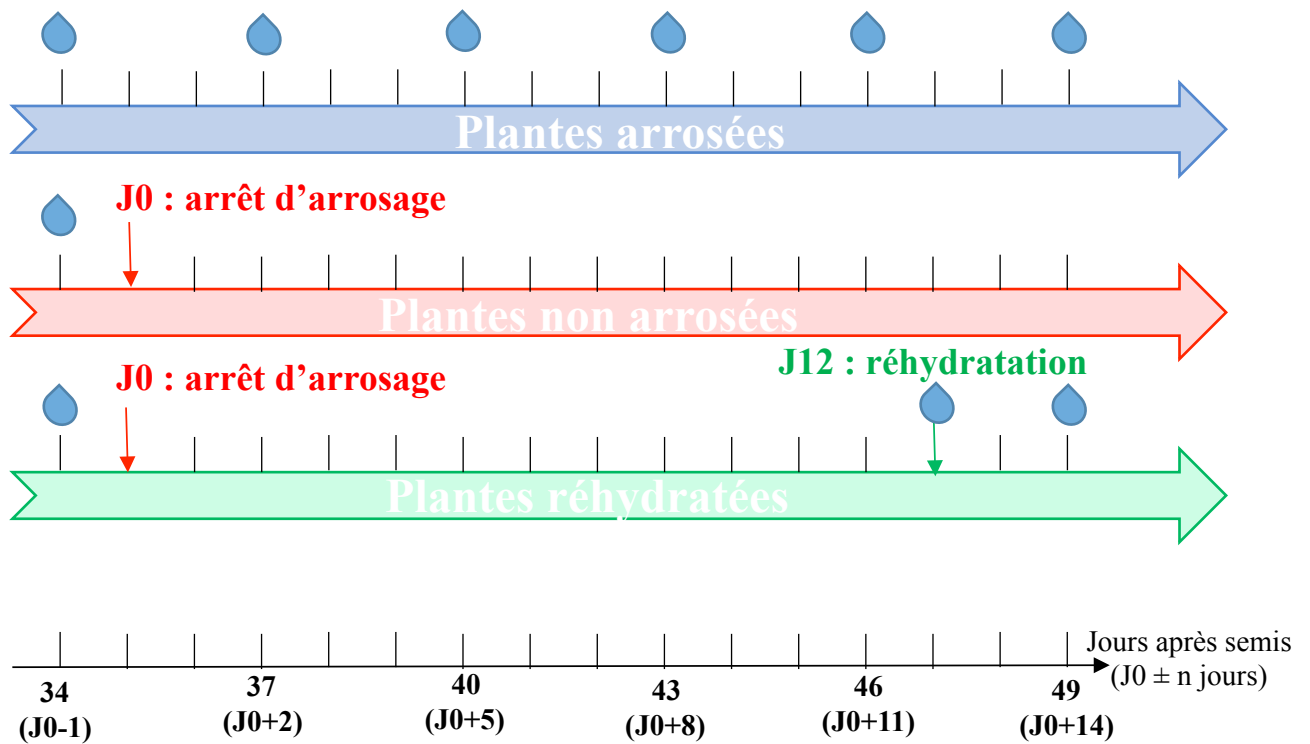


Figure 13 : représentation schématique de la fréquence et des dates d'arrosage des plantes durant les cinétiques de stress hydrique. Les plantes arrosées sont représentées par la flèche bleue, les plantes non arrosées par la flèche rouge et les plantes réhydratées par la flèche verte. Chaque goutte bleue représente un arrosage à l'eau (sans engrais). Le nombre de jours après semis (ou par rapport à J0 = arrêt d'arrosage) est indiqué en bas par la flèche noire. Chaque jour est représenté par une barre verticale.

été placés en chambre froide à 4°C pendant 48 h avant d'être transférés en chambre de culture (photopériode : 10 h de jour, température: 18°C jour - 22°C nuit, hygrométrie : 50% jour - 90% nuit). Au moment de la floraison, les plantes ont été transférées en serre aux normes S2 (serre OGM) pour la production de graines.

Pour la lignée mutante *Salk_032258 (at4g04750)*, incapable de germer directement sur mélange terreau/vermiculite, une germination en condition de culture *in vitro* a été réalisée. Pour cela, des graines ont été semées sur différents milieux gélosés en boîte de Pétri : un milieu Murashige et Skoog (MS) dépourvu de sucre, un milieu MS supplémenté avec 1% de glucose, un milieu MS supplémenté avec 1% de saccharose et un milieu commercial (Milieu Arabidopsis, Kalys, USA, Duchefa (<https://www.duchefa-biochemie.com/>)). Après germination, les plantules ont été transférées dans des Arasystem™ dans un mélange de terreau/vermiculite (3/1 ; v/v) placés dans une mini-serre. Les mini-serres sont ensuite transférées dans une chambre de culture (photopériode : 10 h de jour, température: 18°C jour - 22°C nuit, hygrométrie : 50% jour - 90% nuit) pendant 15 jours au cours desquels les fenêtres de la mini-serre ont été ouvertes progressivement. Après 15 jours, les plantes retirées des mini-serres, sont arrosées régulièrement avec une solution d'engrais PETERS™ (20/20/20 ; N/P/K). De la même manière que pour les autres lignées mutantes, les plantes ont été transférées dans une serre aux normes S2 dès les étapes précoces de la floraison pour la production de graines.

Pour les analyses phénotypiques, les graines des mutants *at4g04760*, *at1g75220 (atERDL6)* et *at1g08920 (atESL1)* ont été semées en parallèle de la lignée sauvage Col-0 et les plantes cultivées dans les mêmes conditions que celles décrites pour Col-0 précédemment. Toutes les plantules sont cultivées pendant 35 jours et arrosées, une fois par semaine, par capillarité dans une solution d'engrais [PETERS™ (20/20/20 ; N/P/K)] pendant 1 h.

Culture des plantes en conditions de carence en eau

Pour analyser l'impact du déficit hydrique des plantes de l'écotype sauvage et des lignées mutantes [*at4g04760*, *at1g75220 (AtERDL6)* et *at1g08920 (atESL1)*] ont été cultivées, pendant 35 jours, comme mentionné au paragraphe 1.2. Au 35^e jour après le semis, la moitié des plantes a été privée complètement d'arrosage. L'autre moitié a été arrosée, tous les 3 jours avec de l'eau ; les plantes arrosées n'ont dès lors plus été supplémentées en engrais. La figure 13 montre le schéma d'arrosage utilisé au cours de chaque cinétique de carence en eau, pour les plantes arrosées, non-arrosées pendant 15 jours, et réhydratées au bout de 12 jours de

Tableau 2 : Amorces utilisées afin de cribler les mutants homozygotes. T_m = température d'hybridation de l'amorce. Quatorze lignées mutantes ont été identifiées sur le site du SALK ou Gabi-Kat (GK) et commandée sur le site du NASC. Des couples d'amorces spécifiques de chaque gène à amplifier ont été commandés chez Eurogentec, ainsi que les amorces spécifiques de l'insertion de l'ADN-T du SALK (LBb1.3) et du GK (08409). En rouge les mutants pour lesquels aucune lignée homozygote n'a été mise en évidence : *at4g04750* = problème de germination, *at3g05400* = problème d'amplification de l'amorce gauche, *at3g05150* : lignées hétérozygotes et *at1g08890* : lignées hétérozygotes.

Gène	SALK/GK	NASC	amorces	séquences	T _m (°C)	Taille du fragment amplifié (bp)
<i>At1g19450</i>	SALK_116041	N616041	116041LP	TTGCAAATGATATCGAAAAGCC	59.83	1253
			116041RP	ATATGTGAGCGAACATGGGAC	59.86	
	GK131B11	N412503	131B11F	AACAAAACCTATTATACCCCTTTCCG	59.93	
			131B11R	AATAACTCGAAAACGACAATCAGA	59.22	
<i>At1g75220</i>	SALK_106049C	N656841	106049LP	GCAACAAATCCAAGATTCGAC	59.57	1082
			106049RP	TATCCCCAAGTTTTGTTTCC	60.04	
<i>At4g04760</i>	SALK_132009C	N656991	132009LP	ACAGGTCGTTTCATCCTTTTTG	59.09	1159
			132009RP	ATTGATCCCATACCAGAACCG	60.94	
<i>At4g04750</i>	SALK_032258	N532258	32258LP	ATGCAAGTAAATGCGCTTACG	60.29	1134
			32258RP	TGCTTCAATGGAGTTCTACAGG	59.38	
<i>At3g05155</i>	SALK_066578C	N656600	66578LP	TCTGCTGATGAATGAAATCCC	60.03	1147
			66578RP	GCCAAGGTTTTCTCACTACCC	59.99	
<i>At3g05400</i>	SALK_009846C	N656150	9846LP	CATTGTCTCTGCCTCCTTAC	59.86	1027
			9846RP	TTTTATGACCGAAGGCACTTG	60.12	
<i>At1g08890</i>	SALK_047351	N547351	47351 LP	TGCTCTTGCAACAATTTTGTG		1022
			47351 RP	TTTACCGAAAGCACTCCATTG		
<i>At1g08930</i>	SALK_132824C	N664036	132824LP	GTCAGCAAAAAGGCAAACGAC	59.77	1147
			132824RP	ACACAGTTTGATTTGCCCAAG	60.02	
<i>At1g08920</i>	SALK_025646C	N661901	25646LP	AGAACC AAAACGACATCAACG	60.02	1230
			25646RP	TCCCCATTTTCCCTATAACCC	59.90	
<i>At3g05165</i>	SALK_023685	N523685	23685LP	AAAAAGTTAGCAAACAGCATGC	57.14	1098
			23685RP	CAGGGAAACTCCACTGTTTTG	59.62	
<i>At5g18840</i>	SALK_095136	N595136	95136LP	GAGGAGATTCGGGTATGAAGC	60.05	1180
			95136RP	CTTTGTGCGAAATTTTGGACATC	58.60	
<i>At3g05150</i>	SALK_104265	N604265	104265LP	AGACCTGGAAATTTGGGTTTTG	60.21	1114
			104265RP	TGGCTGGTAAGATCAACGATC	60.09	
<i>At1g54730</i>	GK-132C04	N412604	132C04F	TTTTCAAGAGAGATTTACCCGTTT	60.00	1170
			132C04R	TTTGGAGTAGGACCAGTACGTCTA	59.25	
			LBb1.3	ATTTTGCCGATTTTCGGAAC		410 + N
			08409	ATATTGACCATCATACTCATTGC		

carence en eau. La première récolte correspond au J0 et six récoltes par expérimentation sont effectuées (J3, J6, J7, J8, J9, J10, J11, J12, J13, J14 et J15).

2 Identification de mutants d'insertion homozygotes pour l'insertion

2.1 Extraction d'ADN génomique

Les quatorze lignées mutantes d'insertion et la lignée d'écotype sauvage Col-0 ont été cultivées selon le protocole décrit dans le paragraphe 1.2. Dès que le stade rosette est établi, une petite feuille de chaque plante est prélevée, immédiatement congelée dans l'azote liquide et l'ADN génomique est extrait grâce à l'utilisation du kit Nucleospin Plant II ® (Macherey-Nagel, Allemagne).

Amplification d'ADN génomique

Afin de discriminer les plantes dont le gène d'intérêt est muté sur les deux allèles (mutant homozygote), sauvage sur les deux allèles (homozygote sauvage) ou muté sur l'un des allèles uniquement (hétérozygote), des réactions de PCR classiques ont été menées. Le mix PCR comprend pour une réaction : 4 µl de tampon 5 X promega, 1,6 µl de MgCl₂, 0,4 µl de dNTP (10 µM), 0,64 µl de chaque amorce d'un même couple (amorce sens et amorce antisens ; 10 µM), 0,3 µl de GoTaq et 7,42 µl d'eau MilliQ. Trois types de mix sont utilisés : le mix contenant les amorces sens et antisens du gène d'intérêt, le mix contenant l'amorce sens du gène d'intérêt et l'amorce spécifique de l'ADN-T ainsi que le mix contenant l'amorce antisens du gène d'intérêt et l'amorce spécifique de l'ADN-T. Chaque réaction PCR a été effectuée avec 20 ng d'ADNg. A l'issue de l'amplification, les échantillons ont été déposés sur un gel d'agarose à 1 % et mis à migrer dans un bain de tampon TAE 0,5 X dans une cuve à électrophorèse. Le tableau 2 donne les séquences de toutes les amorces utilisées lors de l'identification de mutants homozygotes.

3 Caractérisation physiologique des rosettes des plantes cultivées Col0 et mutantes cultivées en condition normale et en condition de carence en eau

3.1 *Suivi des plantes et prélèvements*

L'arrêt d'arrosage est effectué à partir du 35^e jour après semis. L'intégralité des plantes est arrosée 24 h avant le prélèvement, soit au 34^e jour après semis. Le 35^e jour après semis correspond au J0, soit au premier jour de prélèvement et de suivi des plantes arrosées et non arrosées. A J0, les prélèvements n'ont eu lieu que sur 5 plantes pour chaque lignée étudiées, puisque les lots de plantes arrosées et non arrosées n'ont pas encore subi de différence d'arrosage. A partir de J0, les prélèvements ont lieu à J3, J6, J7, J8, J9, J10, J11, J12, J13, J14 et J15. Le dernier prélèvement (J15) correspond au 50^e jour après semis et à un arrêt d'arrosage d'une durée de 15 jours pour le lot de plantes non arrosées. La réhydratation d'un lot de plante par arrosage à l'eau a lieu à J12. Les prélèvements et mesures pour les plantes réhydratées ont été effectués trois jours après la réhydratation, soit à J15. De J3 à J14, 10 plantes sont prélevées à chaque fois, soit 5 plantes arrosées et 5 plantes non arrosées et à J15, 15 plantes sont prélevées soit 5 plantes arrosées, 5 plantes non arrosées et 5 plantes réhydratées. Pour Col-0, quatre répétitions biologiques ont été effectuées et pour chacune des 3 lignées mutantes, 3 répétitions biologiques ont été effectuées :

- Répétition 1 (Col-0 uniquement) : les prélèvements à J13 et J14 n'ont pas été effectués
- Répétition 2 (l'ensemble des 4 lignées : Col-0, *at1g75220*, *at4g4760* et *at1g8920*) : tous les prélèvements ont été effectués, néanmoins, l'écotype Col-0 a été éliminé des analyses subséquentes en raison d'un retard d'une semaine du semis ayant entraîné des différences de stade de développement trop importants par rapport aux autres répétitions biologiques
- Répétitions 3 et 4 (l'ensemble des 4 lignées : Col-0, *at1g75220*, *at4g4760* et *at1g8920*) : tous les prélèvements ont été effectués.

De ce fait, pour chacun des paramètres physiologiques mesurés, 3 répétitions biologiques ont pu être analysées à chaque jour de prélèvement pour les lignées mutantes et Col-0. Cependant, à J13 et J14 seules 2 répétitions biologiques ont été analysées pour Col-0.

3.2 *Mesure des masses fraîches, turgides et sèches et détermination de la teneur en eau et de la teneur relative en eau*

Pour les pesées de masses fraîche (MF), turgide (MT) et sèche (MS) et les calculs de TE et TRE subséquents, 5 demi-rosettes par jour de prélèvement et par traitement (arrosées, non arrosées et réhydratées) ont été prélevées pour chaque lignée en découpant les plantes à la base de la rosette avec une lame de rasoir puis en redécoupant les rosettes en deux parties égales. Les 5 demi-rosettes restantes ont été immédiatement congelées dans l'azote liquide pour être utilisées pour les analyses d'expression des gènes *AtERD6-like* ainsi que pour les dosages de sucres. La masse fraîche (MF) est mesurée immédiatement après récolte, puis la demi-rosette est plongée dans de l'eau osmosée pendant 24 h à 4°C à l'obscurité. La masse turgide est déterminée par pesée après avoir éliminé l'excédent d'eau, enfin la demi-rosette est séchée pendant 24 h à 80°C, afin d'obtenir la MS. A partir des données de MF, MT et MS, la teneur en eau (TE) et la teneur relative en eau (TRE) sont calculées.

La TE (en %) qui représente la teneur en eau nette dans les rosettes est calculée comme suit :

$$TE = \frac{MF - MS}{MF} \times 100$$

La TRE (en %) représente la quantité d'eau présente dans les rosettes par rapport à la valeur maximale qui lui serait physiquement possible d'acquérir. Elle est une estimation de l'état hydrique des rosettes et est calculée comme suit :

$$TRE = \frac{MF - MS}{MT - MS} \times 100$$

3.3 *Mesure de la surface foliaire projetée*

A chaque prélèvement, un lot de 5 plantes par lignées et par condition a été photographié afin de suivre visuellement l'aspect des rosettes et de déterminer la surface foliaire projetée (SFp) à l'aide du logiciel ImageJ (<http://rsweb.nih.gov/ij/>). Pour chaque prise de photo une règle a été utilisée pour permettre de calibrer une échelle. La présence d'un cache de couleur rouge, positionné sous la rosette, a permis de faciliter l'analyse des images. L'analyse est réalisée avec les 3 étapes suivantes :

- i) Mise en place d'une échelle de mesure (correspondance pixels/cm²) à l'aide des graduations de la règle.

Tableau 3 : concentrations de saccharose des solutions utilisées pour estimer la pression osmotique des cellules de feuilles et correspondance de la pression osmotique associée à chaque solution de saccharose

<u>Concentration de la solution de saccharose (M)</u>	<u>Pression osmotique de la solution (Mpa)</u>
0	0
0,0625	0,2
0,125	0,3
0,188	0,5
0,25	0,6
0,3125	0,8
0,375	0,9
0,4375	1,1
0,5	1,2
0,5625	1,4
0,625	1,5
0,6875	1,7
0,75	1,8
0,8125	2
0,875	2,1
0,9375	2,3
1	2,4



Figure 14 : illustration de l'allure des morceaux de feuilles lors de la pesée après 24 heures dans des solutions croissantes de saccharose. De gauche à droite : morceaux de feuilles ayant trempé dans des solutions de saccharose de plus en plus concentrées. Trois répétitions techniques (3 morceaux de feuilles de 3 plantes différentes) sont représentées pour un même jour de prélèvement et une même lignée (Col-0, J10 + 24 H). Ces trois répétitions sont alignées les unes sous les autres. Les concentrations vont de 0 M à 1 M de gauche à droite, selon le tableau 3 M4.

- ii) Transformation de l'image couleur en image noir et blanc à l'aide des plug-ins « segmentation » et « colour based thresholding ». Le fait d'avoir placé un cache rouge sous la rosette verte permet d'avoir des images avec un fond homogène et de faire apparaître facilement la rosette en blanc sur un fond noir.
- iii) Délimitation du contour des surfaces blanches, correspondant à la surface des rosettes, par un simple clic et estimation de la surface foliaire par transformation des pixels contenus dans la surface délimitée en cm^2 grâce à l'échelle déterminée dans l'étape 1.

3.4 Mesure de la conductance stomatique

La conductance stomatique (CS) est mesurée sur un lot de 5 plantes par lignées et par condition tout au long de la cinétique. La CS (en $\text{mmol/m}^2/\text{s}$) est mesurée à l'aide d'un poromètre SC-1 (Decagon Devices, USA) et représente la conductance gazeuse à travers les stomates à l'instant où elle est mesurée. Pour chaque plante, la mesure a été réalisée sur une feuille mature, ce qui correspond à 5 mesures par point de prélèvement et par condition. Les mesures de conductance stomatique sont effectuées en début d'après-midi, ce qui correspond à une période d'éclairement d'environ à 5 h. Les plantes ayant servi aux mesures de CS ne sont pas les mêmes que les plantes prélevées et les plantes photographiées. Pour la troisième répétition biologique, les plantes ayant servi à mesurer la CS paraissaient moins flétries jusqu'à J13 par rapport aux plantes prélevées et par rapport aux autres répétitions biologiques. Lors de cette répétition la plus forte densité de plantes dans la chambre de culture a pu provoquer une rétention d'humidité dans le terreau plus importante et ainsi retarder la vitesse de perte d'eau dans les pots.

3.5 Estimation de l'équilibre osmotique et analyse microscopique des feuilles

3.5.1 Estimation de l'équilibre osmotique des cellules des feuilles

Pour estimer l'équilibre osmotique des cellules de feuilles, des fragments de feuilles sont prélevés, puis pesés immédiatement et incubés pendant 24 h à 4°C dans des solutions de saccharose de concentrations différentes comprises entre 0 et 1M (tableau 3 et figure 14).

Après 24h, les fragments sont de nouveau pesés, ce qui permet de calculer une différence de masse (Δ masse) :

$$\Delta \text{ masse} = \text{masse}(24\text{h}) - \text{masse}(T0)$$

Cet écart de masse est ensuite reporté sur un graphique en fonction de la pression osmotique de chaque solution de saccharose. La pression osmotique des différentes solutions est calculée à partir de la concentration des solutions de saccharose en utilisant l'équation suivante :

$$\pi = R \times T \times Cs$$

(où R est la constante des gaz parfaits soit 8,32 J/mol/Kelvin ; T la température absolue en Kelvin soit 293K et Cs la concentration de la solution en mol/L). L'estimation de l'équilibre osmotique des cellules d'un fragment correspond à la pression osmotique de la solution qui permet d'obtenir une valeur de Δ masses nulle.

L'équilibre osmotique a été déterminé pour l'écotype sauvage et les 3 lignées mutantes [*at4g04760*, *at1g75220* (*aterdl6*) et *at1g08920* (*ates11*)] à 3 points de la cinétique de carence en eau : à J10 correspondant à la fin de la phase 2 (carence en eau modérée) à J12 correspondant à la fin de la phase 3 (carence en eau sévère) et à J14 correspondant au milieu de la phase 4 (flétrissement, senescence). Trois plantes par condition de culture et par lignée ont été analysées individuellement. C'est-à-dire que des fragments de feuilles de chaque plante ont été répartis dans chacune des solutions de saccharose. Les fragments de feuilles ont été découpés de façon : i) à avoir des poids relativement proches pour chaque jour de prélèvement, chaque lignée et condition de culture, ii) à ne pas intégrer la nervure principale, iii) à prélever la partie apicale de la feuille afin d'avoir une homogénéité tissulaire et cellulaire au niveau de l'ensemble des fragments de feuilles.

3.5.2 Analyse de l'anatomie des cellules de feuilles par microscopie photonique

L'observation microscopique des cellules des feuilles a été réalisée avec des fragments de feuilles de 1 à 2 mm de large de quelques mm de longueur. Après avoir été découpés, les échantillons sont immédiatement fixés à 4°C pendant 1 h, dans une solution contenant du paraformaldéhyde (2%), du glutaraldéhyde (0,5%) et du tampon phosphate (0,05 M ; pH 7,2). Trois lavages successifs de 20 min dans une solution de tampon phosphate (0,2 M ; pH 7,2) et de saccharose 7,5 % permettent d'éliminer toute trace de paraformaldéhyde. L'étape de post-fixation consiste à incuber les fragments de feuilles dans une solution de tétroxyde d'osmium à 1 % pendant 5 min. Trois lavages sont effectués dans un tampon phosphate (0,2 M ; pH 7,2 ;

saccharose 7,5 % pendant 20 min), puis l'échantillon est déshydraté par des bains successifs d'éthanol de concentrations croissantes (20°, 50°, 70°, 95° et 100°). L'imprégnation est ensuite réalisée au cours de six bains successifs : les 2 premiers bains se font dans un mélange de résine (LRWhite) et d'éthanol à 100° (1 : 2, v/v) pendant 20 min, les deux bains suivants dans un mélange de résine (LRWhite) et d'éthanol à 100° (2 : 1, v/v) pendant 60 min, puis le cinquième bain a lieu dans le LRWhite pendant 60 min. Enfin, l'échantillon est laissé dans du LRWhite pur, toute la nuit. Toutes ces étapes sont effectuées à 4°C. L'inclusion dans la résine LRWhite est ensuite réalisée en prenant bien garde à l'orientation de l'échantillon dans la résine. La polymérisation de la résine est effectuée à 60°C pendant 24 h. Des coupes semi-fines (500 nm d'épaisseur environ) sont réalisées à l'aide d'un microtome (EMUC6, Leica). Les coupes, après coloration au bleu de toluidine (dilué dans du Borax à pH 9) sont observées en microscopie photonique (Zeiss Axioplan).

L'observation microscopique des cellules des feuilles a été réalisée uniquement pour la lignée Col-0 sauvage en condition arrosée et de carence en eau à trois points de prélèvement : à J10 correspondant à la fin de la phase 2 (carence modérée en eau), à J12 correspondant à la fin de la phase 3 (carence sévère en eau) et à J14, milieu de la phase 4 (flétrissement, sénescence). Une feuille a été prélevée chaque jour de prélèvement et cela a été effectué lors des répétitions 2 et 3. Seule la répétition 3 a été prise en compte pour les raisons décrites précédemment dans le paragraphe 3.1.

4 Dosage enzymatique des sucres solubles (glucose, fructose et saccharose) dans les feuilles

La teneur en glucose, en fructose et en saccharose a été déterminée dans les feuilles des plantes arrosées, non arrosées et réhydratées de l'écotype sauvage et des 3 lignées mutantes [*at4g04760*, *at1g75220* (*AtERDL6*) et *at1g08920* (*atESL1*)].

Les 5 demi-rosettes récoltées par jour, par lignée et par condition de culture sont broyées à l'aide d'un broyeur à billes (TissueLyser, Quiagen) en évitant toute décongélation des échantillons. Chaque broyage a une durée de 30 secondes à une vitesse de 30 secousses/sec. Une partie du broyat est utilisée pour l'analyse de l'expression des gènes *AtERD6-like* et l'autre partie est lyophilisée (-30°C pendant 5 jours) pour extraire ensuite les sucres solubles.

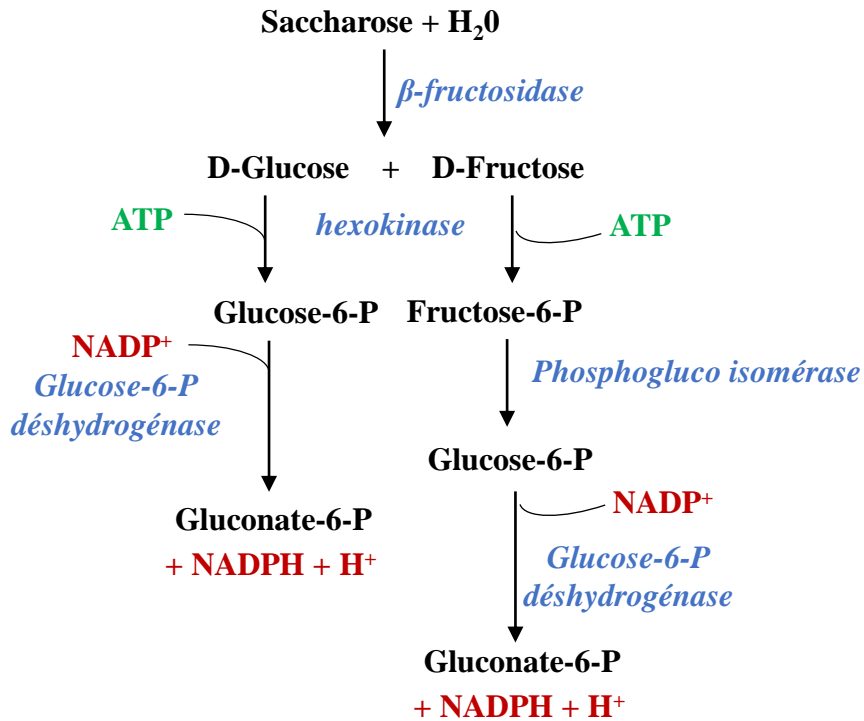


Figure 15 : principe du dosage enzymatique de glucose, fructose et saccharose
Schéma des réactions enzymatiques utilisées.

Tableau 4: protocole de dosage enzymatique des sucres solubles

Les réactions 2 et 3 sont menées simultanément, dans la même cuve. DO = densité optique (absorbance). G6PDH (Glucose-6-phosphate déshydrogénase).

	Réaction Saccharose : réaction 1		Réactions Glucose/Fructose : réactions 2 et 3	
	Blanc	Echantillon	Blanc	Echantillon
Echantillon	-	25	-	25
Eau	25	-	75	50
β fructosidase (4000 u/ml)	50	50	-	-
VORTEX puis incubation 5 min				
H2O			475	
Tampon			25	
NADP ⁺ /ATP			25	
VORTEX puis incubation 3 min- Lecture DO à 340 nm (lecture 1)				
Hexokinase/G6PDH (420/210u/ml)			5	
VORTEX puis incubation 15 min - Lecture DO à 340 nm (lecture 2)				
Phosphogluco isomérase (1000 u/ml)	-		5	5
VORTEX puis incubation 15 min - Lecture DO à 340 nm (lecture 3)				

Après lyophilisation des échantillons, 10 à 20 mg de poudre sont mélangés à 1,5 ml de MCE (Méthanol 60 %, Chloroforme 25 % et Eau 15 %) puis le mélange est soumis à deux séries d'ultrasons de 20 secondes, avec agitation par retournement entre les 2 séries. S'ensuivent 2 séries de centrifugation à 1200 g pendant 10 min à 20°C (centrifugeuse Eppendorf 5404R rotor swing) et lavage du culot avec 600 µl de MCE. Le culot est ensuite repris avec de l'eau, à hauteur de 60 % du volume du surnageant issu de la première centrifugation. Une dernière centrifugation à 1200 g (15 min à 20°C) (centrifugeuse Eppendorf 5404R rotor swing) permet de récupérer la phase aqueuse qui sera ensuite concentrée par évaporation complète de l'eau (MiVac Quattro, Genevac, 30°C, sous vide, 12h). Le culot contenant les sucres solubles totaux est repris dans 200 µl d'eau stérile. Les extraits sont soit stockés à -20°C soit directement utilisés pour le dosage des sucres.

Le dosage des sucres solubles est effectué par dosage enzymatique à l'aide du kit « Sucrose/Fructose/D-Glucose Assay Kit » (Megazyme, USA). Trois réactions enzymatiques sont effectuées en parallèle (figure 15), chaque réaction permettant de calculer soit la teneur en saccharose, soit la teneur en glucose, soit la teneur en fructose. Au final, c'est le NADPH produit lors de chacune des 3 réactions enzymatiques qui est dosé par spectrophotométrie à 340 nm. Le détail du protocole est présenté dans le tableau 4.

Pour la première réaction, la β -fructosidase, l'hexokinase et la glucose-6-phosphate déshydrogénase sont utilisées. Lors de cette réaction, le saccharose est converti en glucose et en fructose par la β -fructosidase, puis après phosphorylation du glucose et du fructose par l'hexokinase, le glucose-6-P est converti en gluconate 6-P par la glucose-6-P déshydrogénase en présence de NADP^+ . De ce fait, pour chaque molécule de glucose, une molécule de $\text{NADPH}+\text{H}^+$ est libérée et peut être dosée par spectrophotométrie à 340 nm. Cette réaction permet de déterminer la teneur en glucose totale c'est-à-dire le glucose constitutif du saccharose plus le glucose libre dans la cellule.

Pour la deuxième réaction, seules l'hexokinase et la glucose-6-phosphate déshydrogénase sont ajoutées à l'extrait de sucres. Après phosphorylation du glucose et du fructose par l'hexokinase, le glucose-6-P est converti en gluconate 6-P par la glucose-6-P déshydrogénase en présence de NADP^+ . De ce fait, pour chaque molécule de glucose, une molécule de $\text{NADPH}+\text{H}^+$ est libérée. La mesure à 340 nm du NADPH permet de déterminer uniquement la teneur en glucose libre.

Pour la troisième réaction, l'hexokinase, la glucose-6-déshydrogénase et la phosphoglucoisomérase sont utilisées. Après phosphorylation du glucose et du fructose par

l'hexokinase, le glucose-6-P est converti en gluconate 6-P par la glucose-6-P déshydrogénase en présence de NADP⁺. La phosphoglucose isomérase convertit le fructose-6-P en glucose-6-P, qui est converti en gluconate 6-P par la glucose-6-P déshydrogénase en présence de NADP⁺. Pour chaque molécule de glucose-6-P, une molécule de NADPH+H⁺ est libérée. Le dosage à 340 nm du NADPH permet de déterminer la teneur en glucose libre plus la teneur en fructose libre, sans discriminer entre les 2 sucres.

Les teneurs en saccharose et en fructose peuvent être déduites de ces 3 réactions et la teneur en glucose libre est directement déterminée à partir de la réaction 2.

La teneur en glucose, en fructose et en saccharose dans les feuilles exprimée en g/100 g de masse sèche, est calculée à l'aide de la relation de Beer-Lambert :

$$A_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda} \times l \times C$$

où A est l'absorbance mesurée par le spectrophotomètre (à 340 nm), ε est le coefficient d'extinction molaire 6300 L/mol/cm, C est la concentration de NADPH (mol/l) et l le trajet optique (1 cm). En connaissant le poids moléculaire de chacun des trois sucres dosés (saccharose = 342,3 g/mol, glucose et fructose = 180,16 g/mol) et la masse sèche de chaque échantillon, la teneur en glucose, fructose et saccharose peut être exprimée en g pour 100 g de Matière sèche.

5 Traitement des plantes à l'acide abscissique

Des plantes de l'écotype Col-0 et des lignées mutantes [*at4g04760*, *at1g75220* (*AtERDL6*) et *at1g08920* (*atESLI*)] cultivées en condition normale d'arrosage (condition décrite précédemment dans le paragraphe 1.2) pendant 43 jours après semis ont été traitées par pulvérisation foliaire à l'acide abscissique (ABA). Pour cela, les plantes sont séparées en trois lots de 15 plantes : un premier lot de plantes témoins non pulvérisées, un deuxième lot de plantes témoins pulvérisées avec une solution de DMSO (H₂O, DMSO 0,75%, Triton X100 0,02%) sans ABA et un lot de plantes pulvérisées avec une solution d'ABA 750 μM (H₂O, DMSO 0,75 %, ABA 750 μM, Triton X100 0,02%). La pulvérisation est effectuée sur toute la surface des rosettes le matin puis 5 rosettes de plantes témoins sont immédiatement récoltées pour chacune des lignées, ce qui constitue le point T0. Des prélèvements sont ensuite réalisés toutes les 2h jusqu'à 8h (prélèvements T2, T4, T6, T8). A chaque prélèvement, 5 rosettes entières sont collectées par condition et par lignées et sont immédiatement congelées dans

l'azote liquide. Cette expérimentation a été effectuée trois fois, ce qui a donné lieu à trois répétitions biologiques.

6 Analyse de l'expression de gènes

6.1 Analyses *in silico* de l'expression des gènes *AtERD6-like*

Les données d'expression *in silico* des gènes *AtERD6-like* obtenues par des analyses transcriptomiques par microarrays ont été collectées et analysées à partir de la base de données Genevestigator (<https://genevestigator.com/gv/>) (Hruz et al. 2008).

6.2 Analyses de l'expression des gènes *AtERD6-like* par qRT-PCR

Pour l'analyse de l'expression des gènes *AtERD6-like* dans les différents organes d'*A. thaliana* sauvage Col-0, des feuilles, racines, hampes florales, boutons floraux, fleurs, siliques jeunes et matures ont été collectés et broyés comme décrit pour le dosage des sucres solubles (voir paragraphe 5). Pour l'analyse de l'expression des gènes *AtERD6-like* dans les feuilles des plantes arrosées, non arrosées et réhydratées les mêmes échantillons qui ont servis aux dosages des sucres solubles ont été utilisés.

6.2.1 Extraction et quantification des ARN totaux

Les ARN totaux de différents organes (feuilles, racines, hampes florales, boutons floraux, fleurs, siliques jeunes et matures) ont été extraits suivant le protocole de (Kay et al. 1987). Il s'agit d'une extraction au REB (Tris-HCl 25 mM, pH 8, EDTA 25 mM, NaCl 75 mM, SDS 1 %, β -mercaptoéthanol 1 M) suivie d'une précipitation au chlorure de lithium (2 M) sur environ 100 mg de matière fraîche.

La concentration des ARN totaux extraits a été mesurée grâce à un spectrophotomètre Microdrop (Thermo scientific, France), puis, 1 μ g de chaque échantillon d'ARN a été déposé sur un gel d'agarose 2 %. Après migration des échantillons dans un tampon TAE 0,5 X, il a été possible de vérifier l'état des ARN extraits.

6.2.2 Synthèse des ADN complémentaires

Un traitement à la DNase (Sigma) a été effectué avec 1 μ g de chaque échantillon d'ARN. Un μ l de tampon 10 X (Tris-HCl 200 mM, pH 8,3, MgCl₂ 20 mM) ainsi qu'1 μ l de DNase (1

Tableau 5 : Amorces utilisées pour les études de niveau d'expression des *AtERD6-like* par RT-qPCR. Le Tm correspond à la température d'hybridation des amorces (en °C). F = amorce sens ; R = amorce anti-sens.

Gènes	Séquence des amorces	Tm des amorces	Taille des amorces (nt)	Taille de l'amplicon (bp)	Efficacité	Observations
<i>At1g19450</i>	F : TAAGCCTCGTGATTGTAGCA	58	20	121	90	-
	R : CAAGAAATAACCATAGCCACA	58	21			
<i>At1g75220</i>	F : GTGGAGGAACTTCACTCTGTA	64	22	99	90	-
	R : GTTCTCAAGAGTTTGCCTT	58	21			
<i>At2g48020</i>	F : CTGAGATATTCCATAAACAT	58	21	139	93	-
	R : AAGATTGCAATTTATGTCCCAG	58	21			
<i>At3g05150</i>	F : TTCTTTTGAAGGCTCATGGTT	58	21	200	-	-
	R : GACAAGCCATGAACTTAGCCA	62	19			
<i>At5g18840</i>	F : CTGAGATATTCCGATAAACGTA	62	23	177	114	-
	R : TCTTCGCCACAAATATTATCGTC	64	23			
<i>At1g54730</i>	F : AATCCGGCAGGAACGTTTTATG	64	22	179	100	-
	R : CGTTATAATTAGGGACTGATAT	58	22			
<i>At4g04750</i>	F : TACAGGAACGTTATGATGTTT	58	22	203	90	-
	R : CATGAAATATAAAGAGATCTGA	56	22			
<i>At4g04760</i>	F : CAGAGATTTATCCAGTAGATGT	60	22	174	100	-
	R : TGGCTATGAACACAAATCCAA	58	21			
<i>At3g05400</i>	F : CTTCTATGACTTCAGCGTTGG	64	22	148	100	-
	R : CAATTGCGAACATCATCGT	54	19			
<i>At1g08890</i>	F : TGGAGTGCTTTCGGAACATATT	60	22	150	109	-
	R : GAGTAAAGAATCAACTTTGGAT	58	22			
<i>At1g08900</i>	F : GTAGCCTGTAACGATGTCA	58	20	99	97	-
	R : ATATGAAATATGTTCCGGAAGC	60	22			
<i>At3g20460</i>	F : ACGCTATGCAATTTAACTAGCTG	64	23	89	97	-
	R : AACACACCAGAAGAGCTCCACT	66	22			
<i>At1g08920</i>	F : TCGGTCTCATTCATGTGCG	62	20	131	97	-
	R : TGCATCATCTCCGCGAAGAC	62	20			
<i>At1g08930</i>	F : ATAATGGCTGAGATATTTCCG	58	21	176	95	-
	R : ATAAATACGATCGAACTGGC	60	20			
<i>At3g05155</i>	F : GTGGTACAAAAGCTATATTGG	62	22	164	-	pas d'amplification
	R : CCGATGCCTGCAAAATTTGTACA	64	22			
<i>At3g05160</i>	F : GCACAAGGAACCTTTTACATAT	60	22	101	90	-
	R : AATTCTTCAAGCGACTGTCC	58	20			
<i>At3g05165</i>	F : AAGGAACATTTTACATATTTGC	56	22	167	-	non utilisables : pas assez spécifiques
	R : TTTATTATTTGCAATGCGACT	54	21			
<i>At5g27350</i>	F : TATGTCGGAGATATTTCCAATA	58	22	269	97	-
	R : CAAATTAAGTTTGATTTCTTTC	54	22			
<i>At5g27360</i>	F : AGTGGAGCACTCAAGGAACATT	64	22	149	95	-
	R : TTGATTTATCTATCGGGCTC	60	22			

U/mL dans du glycérol, Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, CaCl₂ 10 mM, MgCl₂ 10 mM) ont été ajouté à 1 µg d'ARN dans un volume final de 10 µl (q.s.p 10 µl avec de l'eau). Après 30 min d'incubation à 37°C, l'activité DNase est inhibée par ajout d'1 µl de tampon stop, puis les échantillons sont placés 10 min à 70°C pour dénaturer la DNase et linéariser les ARN. La rétro-transcription des ARN est effectuée dans 14 µl de mélange réactionnel contenant 1 µg d'ARN, 5 µl de tampon 5X, 1,25 µl de dNTP (10 µM), 2 µl d'oligo dT (10 µM), 1 µl de Reverse Transcriptase (MMLV, Promega) et 4,75 µl d'eau (q.s.p 14 µl avec l'eau). L'ensemble est incubé 1h30 à 37°C. Les ADNc ainsi obtenus sont dilués 10 fois avec de l'eau milliQ stérile.

La rétro-transcription est vérifiée par PCR : pour chaque échantillon il faut 7,2 µl H₂O, 4 µl tampon 5X (Promega), 1,6 µl de MgCl₂, 1 µl de dNTP (10 µM), 0,5 µl de chaque amorce (10 mM) (sens et anti-sens) du gène *AtERD6* et 0,2 µl de Go Taq Polymerase (Promega, France). Après centrifugation, le programme de PCR suivant est réalisé : 2 min à 95 °C, (30 sec. à 95 °C, 30 sec. à 60 °C, 30 sec. à 72 °C) sur 35 cycles et 5 min à 72 °C. Les amplifications ont été visualisées sur gel d'agarose 1 % après migration des échantillons dans une cuve remplie de tampon TAE 0,5 X. La taille des fragments est déduite grâce à la comparaison avec un marqueur de taille (SMART Ladder, Eurogentec, Belgique).

6.2.3 Mesure de l'expression relative des gènes *AtERD6-like* par RT-qPVR (Real Time quantitative Polymeras Chain Reaction)

Des amorces qPCR spécifiques des 19 *ERD6-like* d'*A. thaliana* ont été définis à l'aide du « logiciel Oligo 7 » et commandées chez Eurogentec. Le tableau 5 récapitule les séquences de ces amorces ainsi que la température d'hybridation (situées aux alentours de 60 °C) et la taille des fragments amplifiés. Dans une plaque 96 puits (Eppendorf), 10 µl de Mix SyberGreen (Promega, France) et 5 µl d'échantillon d'ADNc sont déposés à raison de 2 ou 3 puits par échantillon et par couple d'amorces testé afin d'obtenir des duplicata ou des triplicats techniques. L'amplification et l'analyse sont effectuées dans un thermocycleur Eppendorf Realplex. La quantité relative d'ARN de départ peut être calculée par la formule : $1 + \text{EFFICACITE}^{-\Delta\text{Ct}}$, où le ΔCt représente la soustraction de la valeur moyenne de Ct du gène de ménage, *AtPP2a* (*At1g13320*) (Czechowski et al. 2005), à la valeur moyenne de Ct de l'échantillon, et ce pour chaque échantillon. L'efficacité peut être calculée comme suit : $E = 10^{-1/\text{pente}}$ après avoir tracé une courbe de tendance linéaire sur un graphique représentant le nombre de Ct en fonction de la concentration d'une gamme d'échantillon connue. Cette gamme est réalisée pour chaque série d'ADN, grâce à un mélange de chaque échantillon

d'ADNc et à la dilution de ce mélange selon une gamme de dilutions : la concentration du mélange a été divisée par 2, 2,5, 5, 10 et 20. L'efficacité d'amplification pour les couples d'amorces ERD6-like étant similaire à celle du gène de ménage *AtPP2a*, la formule de calcul de la quantité d'ARN relative de départ dans les échantillons peut être simplifiée à $2^{-\Delta Ct}$.

7 Analyses statistiques

Les analyses statistiques effectuées pour la comparaison de moyennes deux à deux avec le test de Mann Whitney et pour la comparaison de plusieurs moyennes avec le test de Kruskal-Wallis et test de Dunn, ont été réalisées grâce au logiciel XLStats 2011 (Addinsoft, France).

8 Analyses bioinformatiques

8.1 Identification des membres de la famille ERD6-like

L'identification des protéines *ERD6-like* pour *Arabidopsis thaliana*, *Brachypodium distachyon*, *Cucumis melo*, *Musa acuminata*, *Oryza sativa*, *Populus trichocarpa*, *Solanum lycopersicum*, *Vitis vinifera* et *Zea mays* a été réalisée par l'analyse de la base de données Aramemnon version 8.0 (<http://aramemnon.uni-koeln.de/>). Pour ces espèces, les séquences protéiques, génomiques et les CDS (Coding sequence) des transporteurs de monosaccharides de type ERD6-like ont été récupérés directement en format fasta sur ce serveur. Les séquences ERD6-like du génome de *Pinus taeda* ont été identifiées dans la base de données Congenie (<http://congenie.org/>), celles de *Galdieria sulphuraria*, *Chondrus crispus*, *Pyropia yezoensis*, *Chlorella vulgaris*, *Phoenix dactylifera*, *Nelumbo nucifera*, *Cicer arietinum*, *Genlisea aurea* et *Ectocarpus siliculosus* sur le site du NCBI (National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)), celles de *Lotus japonicus* sur le site spécifique de cette espèce (<http://www.kazusa.or.jp/lotus/>) et celles des 46 autres espèces étudiées dans la base de données Phytozome version 10.0 (<http://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>). Pour les 49 génomes dans lesquels les gènes *ERD6-like* n'avaient pas été identifiés auparavant, des BLASTp (Basic Local Alignment Search Tool) ont été effectués en prenant pour sujet les 18 séquences protéiques ERD6-like complètes identifiées chez la vigne (Afoufa-Bastien et al. 2010) et pour cible les protéomes déduits de ces 49 espèces. Pour chaque espèce, 18 BLASTp ont donc été réalisés. Une e-value égale à 10^{-60} a été utilisée comme valeur seuil. Les séquences protéiques identifiées avec une e-value proche de la valeur seuil ont ensuite été utilisées dans une deuxième analyse BLASTp

avec comme cible le génome d'*Arabidopsis thaliana* sur le site <https://www.arabidopsis.org/> (TAIR : The Arabidopsis Information Resource), afin de déterminer si ces séquences présentaient également la meilleure homologie avec les ERD6-like d'*A. thaliana*. Les séquences protéiques, génomiques et les CDS des transporteurs de la famille ERD6-like nouvellement identifiés ont été récupérées en format fasta. Pour chaque espèce, les séquences protéiques identifiées ont été alignées entre elles par la méthode ClustalW à l'aide du logiciel Bioedit (Ibis Therapeutics, Canada) afin de déceler d'éventuelles erreurs d'annotation. Les séquences protéines ayant trop d'erreurs ont été écartées de l'étude afin de prendre en compte uniquement les protéines ERD6-like les plus fiables.

8.2 Analyses phylogénétiques

La construction de plusieurs arbres phylogénétiques, contenant toutes ou partie des séquences protéiques ERD6-like identifiées lors des BLAST, a été réalisée à l'aide du logiciel MEGA version 6.0 (MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0) (Tamura et al. 2013) en utilisant la méthode statistique PhyML (Maximum Likelihood) et 1000 répliquats de Bootstrap. L'alignement préalable à la construction de l'arbre suit le modèle JTT (Jones-Taylor Thornton).

8.3 Détermination et modélisation des structures introns/exons des gènes ERD6-like

Les structures intron/exon des gènes *ERD6-like* ont été modélisées via le serveur GSDS 2.0 (Gene Structure Display Server 2.0 : <http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>) développé par le centre bio-informatique de l'Université de Pékin (Hu et al. 2014). Elles sont déterminées par l'alignement des séquences d'ADNg et des séquences CDS de chaque gène. Le CDS ne comportant que les exons codant la protéine, ceux-ci vont s'aligner avec l'ADNg et les positions des introns peuvent alors être déterminées.

8.4 Analyse des substitutions nucléotidiques dans les 3 génomes du genre *Arabidopsis*

L'analyse des substitutions nucléotidiques, reflétant le taux d'évolution de séquences les unes par rapport aux autres, est appelée dN/dS (ou Ka/Ks) car elle fait référence à un calcul représentant un ratio. Ainsi, pour une séquence donnée, par rapport à d'autres séquences orthologues :

$$\frac{dN}{dS} = \frac{\text{Taux de mutations non synonymes} \\ \text{(changent l'acide aminé de la protéine)}}{\text{Taux de mutations synonymes} \\ \text{(ne change pas l'acide aminé de la protéine)}}$$

Sachant que :

$$dN = \frac{\text{Nombre de codons présentant une mutation non synonyme}}{\text{Nombre de sites disponibles à l'occurrence} \\ \text{de mutations non synonymes} \\ \text{dans la séquence analysée}}$$

et

$$dS = \frac{\text{Nombre de codons présentant une mutation synonyme}}{\text{Nombre de sites disponibles à l'occurrence} \\ \text{de mutations synonymes} \\ \text{dans la séquence analysée}}$$

Si **dN/dS < 1** ; alors le taux de mutations non synonymes est inférieur au taux de mutations synonymes. On parle alors de sélection NEGATIVE (purifiante). La pression de sélection est forte au niveau des séquences et tend à la conservation de l'intégrité de la séquence et donc potentiellement à la conservation de la fonction.

Si **dN/dS > 1** ; alors le taux de mutations non synonymes est supérieur au taux de mutations synonymes. On parle alors de sélection POSITIVE (diversifiante). La pression de sélection est plus faible et favorise l'acquisition de nouvelles fonctions.

Si **dN/dS = 1** ; alors les taux de mutations synonymes et non synonymes sont égaux. On parle de sélection NEUTRE (en pratique, très peu répandue). Il y a un équilibre entre pression et relâchement de sélection.

Dans le cas de notre analyse, les séquences CDS des *ERD6-like* identifiés chez *A. thaliana*, *A. halleri*, *A. lyrata* et *C. rubella* (quatre Brassicales) ont été classées dans un fichier au format fasta puis incrémentées dans le logiciel MEGA 6.0 en utilisant la méthode statistique de Neighbor-Joining et 1000 répliquats de Bootstrap. L'alignement préalable à la construction de l'arbre suit le modèle JTT (Jones-Taylor Thornton). L'arbre phylogénétique obtenu est volontairement non enraciné. Différents groupes monophylétiques de séquences ont pu être définis en tenant compte des deux caractéristiques suivantes :

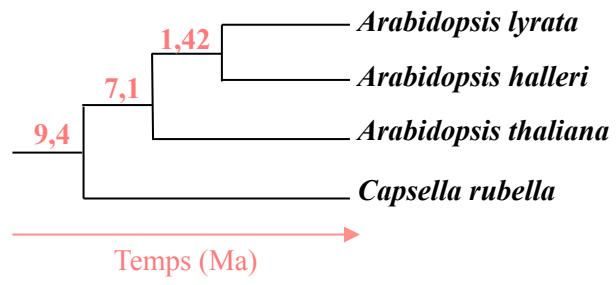


Figure 16 : Représentation simplifiée de la divergence des quatre Brassicacées : *Arabidopsis lyrata*, *A. thaliana*, *A. halleri* et *Capsella rubella*.

- i) La présence d'au moins une séquence d'*A. thaliana* (qui possède le plus grand nombre d'ERD6-like parmi les quatre espèces analysées)
- ii) La présence d'une séquence de *C. rubella*, autant que cela a été possible.

Les séquences CDS de chacun des groupes définis à l'étape précédente ont ensuite été alignées dans le logiciel BioEdit et réalignées manuellement selon les 3 critères suivants :

- i) Un alignement impératif des codons START et STOP
- ii) Un respect parfait du cadre de lecture
- iii) Toutes les séquences pour lesquelles les deux premiers critères n'ont pas pu être respectés (CDS tronquées ou ne présentant pas de codons START) ont été retirées de l'étude : *Ah04425s02* (*Arabidopsis halleri*), *Cr10000845*, *Cr10015811* et *Cr10021344* (*Capsella rubella*).

Les alignements obtenus, enregistrés en format fasta ont été analysés un par un sur le serveur en ligne en libre accès Datamonkey (<http://www.datamonkey.org>) avec la méthode GA-Branch (Kosakovsky Pond and Frost 2005; Delpont et al. 2010) et selon le modèle HKY85. L'arbre phylogénétique des quatre espèces analysées a été codé sous forme de ligne de code : ((Ah ; Al), At), Cr, et le dN/dS a été établi à partir de cet arbre imposé (user tree). Ainsi l'évolution des quatre espèces et leur divergence les unes par rapport aux autres étaient connues du serveur avant le calcul de dN/dS (figure 16).

Résultats & Discussions

1 Evolution des transporteurs de monosaccharides de la famille ERD6-like chez les plantes

1.1 Identification des gènes ERD6-like dans le génome de 59 espèces représentatives de l'ensemble du Règne Végétal

Suite aux observations faites sur le génome de la vigne et sur les arbres phylogénétiques consacrés à l'étude des 7 familles de transporteurs de monosaccharides chez *Arabidopsis thaliana* (Afoufa-Bastien et al., 2020 ; Buttner and Sauer, 2000 ; Johnson et al., 2006 ; Johnson et al., 2007 ; Slewinski, 2011), une étude phylogénétique de la famille de transporteurs ERD6-like la plus complète possible a été menée afin d'améliorer nos connaissances sur l'origine et l'évolution de ces gènes. Cette étude a constitué la première partie de mon travail de thèse.

Pour ce faire, il a fallu faire un choix des espèces candidates. L'objectif était d'inclure un maximum d'espèces représentant l'ensemble du Règne Végétal, des algues jusqu'aux Angiospermes. Le répertoire d'espèces ainsi constitué a servi de base pour l'identification des transporteurs de la famille ERD6-like potentiels, dans le protéome de chacune des espèces étudiées.

1.1.1 Recherche et choix des espèces candidates

L'objectif de ce travail a été de trouver des bases de données, consultables en ligne, permettant l'accès aux données issues du séquençage du génome de nombreuses espèces et de sélectionner celles dont les données sont issues de séquençages de génomes entiers. Les espèces dont le génome a été entièrement séquencé ont été considérées comme de bons candidats, permettant de minimiser les erreurs éventuelles pouvant être dues à une couverture insuffisante du génome (absence d'ERD6-like par exemple). Ces espèces ont été sélectionnées dans 5 bases de données.

Aramemnon version 8.0 (<http://aramemnon.uni-koeln.de>) a été la première base de données retenue et exploitée. Cette base de données constitue un répertoire de protéines membranaires, exclusivement consacré aux plantes. Sur ce site, toutes les protéines membranaires identifiées chez 9 espèces sont accessibles. Ces espèces sont : *Arabidopsis thaliana* (arabette des dames) (Haas et al. 2003), *Brachypodium distachyon* (brachypode à deux épis) (Vogel et al. 2010), *Cucumis melo* (concombre) (Garcia-Mas et al. 2012), *Musa*

acuminata (banane) (D'Hont et al. 2012), *Oryza sativa* (riz) (Kawahara et al. 2013), *Populus trichocarpa* (peuplier) (Tuskan et al. 2006), *Solanum lycopersicum* (tomate) (Tomato Genome 2012), *Vitis vinifera* (vigne) (Jaillon et al. 2007) et *Zea Mays* (maïs) (Schnable et al. 2009). Les séquences protéiques et génomiques des membres de la famille ERD6-like déjà identifiés chez ces espèces ont ainsi été collectées.

Pour élargir l'étude à d'autres espèces, dont les génomes ont été entièrement séquencés mais dont les *ERD6-like* n'ont pas nécessairement été identifiés, la base de données Phytozome version 10 (<http://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) (Goodstein et al. 2011) a été utilisée. Au moment de l'analyse, 47 versions de génomes de plantes étaient disponibles sur Phytozome v10, dont les dernières versions des 9 génomes énumérés ci-dessus et présents sur Aramemnon. Au final, et en gardant uniquement les versions les plus récentes des génomes séquencés entièrement, 38 génomes ont pu être analysés sur Phytozome.

Sur le site du N.C.B.I (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), 10 génomes ont été sélectionnés : *Ectocarpus silicosus* (algue brune, Phéophycées) (Cock et al. 2010), *Chondrus crispus* (algue rouge, Floridophycées) (Collén et al. 2013), *Cyanidioschyzon merolae* (algue rouge, Cyanidiophycées) (Matsuzaki et al. 2004), *Galdieria sulphuraria* (algue rouge, Cyanidiophycées) (Barbier et al. 2005), *Pyropia yezoensis* (algue rouge, Bangiophycées) (Nakamura et al. 2013), *Chlorella vulgaris* (algue verte, Trebouxiophycées), *Phoenix dactylifera* (palmier dattier) (Al-Dous et al. 2011), *Nelumbo nucifera* (lotus sacré) (Ming et al. 2013), *Cicer arietinum* (pois chiche) (Varshney et al. 2013) et *Genlisea aurea* (plante carnivore) (Leushkin et al. 2013).

Etant donné qu'aucun génome de Gymnospermes n'était disponible sur ces trois bases de données, le génome récemment séquencé de *Pinus taeda* (pin loblolly) (Neale et al. 2014), a été repéré sur le site Congenie (<http://congenie.org/>). Congenie est une base de données génomique, dédiée aux Gymnospermes. *Pinus taeda* a été choisi pour l'analyse en raison de la qualité du séquençage de son génome, comparé à d'autres Gymnospermes.

Enfin, la base de données spécifique du génome de *Lotus japonicus* (lotier) donnant accès à toutes les données issues du séquençage du génome de cette espèce (<http://www.kazusa.or.jp/lotus/>) (Sato et al. 2008) a permis de prendre en compte cette espèce dans notre étude.

Au total, 59 espèces ont été sélectionnées pour l'analyse bio-informatique. Chaque espèce est présentée avec une classification simplifiée dans le tableau 6. Toutes les espèces considérées appartiennent à la lignée verte à l'exception de l'algue brune *Ectocarpus*

Tableau 6 : taxonomie simplifiée des organismes étudiés. Pour chaque espèce analysée, la version de l'annotation des génomes (si connue) et l'abréviation désignant l'organisme sont indiquées. Une taxonomie simplifiée de chaque organisme est présentée mentionnant la classe, l'ordre et la famille botanique d'appartenance. Les algues étudiées appartiennent aux Rhodophytes (algues rouges), aux Chlorophytes (algues vertes) ou aux Straménopiles (algues brunes). La majorité des génomes proviennent de la base de données Phytozome version 10.0 (sans surlignage), d'autres proviennent d'Aramemnon (surlignage orange), de Congenie (surlignage vert), du N.C.B.I (surlignage violet) ou des sites spécifiques des organismes en question (surlignage jaune).

Organisme	Abréviation	Famille	Ordre	Classe	
<i>Ectocarpus siliculosus</i>	Es	Ectocarpaceae	Ectocarpales	Phaeophyceae	Straménopile
<i>Chondrus crispus</i>	Ccr	Gigartineae	Gigartinales	Florideophyceae	Rhodophytes
<i>Cyanidioschyzon merolae</i>	Cme	Cyanidiaceae	Cyanidiales	Bangiophyceae	
<i>Galdieria sulphuraria</i>	Gs	Cyanidiaceae	Cyanidiales	Bangiophyceae	
<i>Pyropia yezoensis</i>	Py	Bangiaceae	Bangiales	Bangiophyceae	
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> 5.5	Cre	Chlamydomonadaceae	Chlamydomonadales	Chlorophyceae	
<i>Volvox carteri</i> 2.0	Vc	Volvocaceae	Chlamydomonadales	Chlorophyceae	Chlorophytes
<i>Chlorella vulgaris</i>	Cv	Chlorellaceae	Chlorellales	Trebouxiophyceae	
<i>Coccomyxa subellipsoidea</i> 2.0	Csu	Coccomyxaceae	Trebouxiophyceae (<i>incertae sedis</i>)	Trebouxiophyceae	
<i>Ostreococcus lucimarinus</i> 2.0	Ol	Bathycoccaceae	Mamiellales	Mamiellophyceae	
<i>Micromonas pusilla</i> 3.0	Mp	Mamiellaceae	Mamiellales	Mamiellophyceae	
<i>Physcomitrella patens</i> 3.1	Ppa	Funariaceae	Funariales	Bryopsida	Bryophytes
<i>Selaginella moellendorffii</i> 1.0	Sm	Selaginellaceae	Selaginellales	Lycopodiidae	Lycophytes
<i>Pinus taeda</i> 1.0	Pita	Pinaceae	Pinales	Pinidae	Gymnospermes
<i>Amborella trichopoda</i> 1.0	Atr	Amborellaceae	Amborellales	-	Proto-Angiospermes
<i>Spirodela polyrhiza</i> 2.0	Spo	Araceae	Alismatales	Liliopsida	Mésangiospermes : Monocotylédones
<i>Phoenix dactylifera</i>	Pd	Arecaceae	Arecales	Liliopsida	
<i>Brachypodium distachyon</i>	Bd	Poaceae	Poales	Liliopsida	
<i>Oryza sativa</i>	Os	Poaceae	Poales	Liliopsida	
<i>Panicum hallii</i> 0.5	Ph	Poaceae	Poales	Liliopsida	
<i>Panicum virgatum</i> 1.1	Pvi	Poaceae	Poales	Liliopsida	

Organisme	Abréviation	Famille	Ordre	Classe	
<i>Setaria italica</i> 2.1	Si	Poaceae	Poales	Liliopsida	
<i>Sorghum bicolor</i> 2.1	Sb	Poaceae	Poales	Liliopsida	
<i>Zea mays</i>	Zm	Poaceae	Poales	Liliopsida	
<i>Musa acuminata</i>	Ma	Musaceae	Zingiberales	Liliopsida	
<i>Aquilegia caerulea</i> 1.1	Ac	Ranunculaceae	Ranunculales	-	Mésangiospermes :
<i>Nelumbo nucifera</i>	Nn	Nelumbonaceae	Protéales	Magnoliopsida	Paléodicotylédones
<i>Vitis vinifera</i>	Vv	Vitaceae	Vitales	Magnoliopsida	Mésangiospermes : Eudicotylédones
<i>Ricinus communis</i> 0.1	Rc	Euphorbiaceae	Malpighiales	Eurosidées I	
<i>Manihot esculenta</i> 4.1	Me	Euphorbiaceae	Malpighiales	Eurosidées I	
<i>Linum usitatissimum</i> 1.0	Lu	Linaceae	Malpighiales	Eurosidées I	
<i>Populus trichopoda</i> 3.0	Ptr	Salicaceae	Malpighiales	Eurosidées I	
<i>Salix purpurea</i> 1.0	Spu	Salicaceae	Malpighiales	Eurosidées I	
<i>Glycine max</i> 1.0	Gm	Fabaceae	Fabales	Eurosidées I	
<i>Phaesolus vulgaris</i> 1.0	Pvu	Fabaceae	Fabales	Eurosidées I	
<i>Medicago truncatula</i> 1.0	Mt	Fabaceae	Fabales	Eurosidées I	Mésangiospermes :
<i>Lotus japonicus</i>	Lj	Fabaceae	Fabales	Eurosidées I	Eudicotylédones
<i>Cicer arietinum</i>	Ca	Fabaceae	Fabales	Eurosidées I	Eurosidées I (Fabidées)
<i>Malus domestica</i> 1.0	Md	Rosaceae	Rosales	Eurosidées I	
<i>Fragaria vesca</i>	Fv	Rosaceae	Rosales	Eurosidées I	
<i>Prunus persica</i> 2.1	Ppe	Rosaceae	Rosales	Eurosidées I	
<i>Cucumis melo</i>	Cm	Cucurbitaceae	Cucurbitales	Eurosidées I	
<i>Cucumis sativus</i> 1.0	Csa	Cucurbitaceae	Cucurbitales	Eurosidées I	
<i>Eucalyptus grandis</i> 2.0	Eg	Myrtaceae	Myrtales	Eurosidées I	

Organisme	Abréviation	Famille	Ordre	Classe	
<i>Citrus clementina</i> 1.0	Cc	Rutaceae	Sapindales	Eurosidées II	
<i>Citrus sinensis</i> 1.1	Csi	Rutaceae	Sapindales	Eurosidées II	
<i>Brassica rapa</i> 1.3	Br	Brassicaceae	Brassicales	Eurosidées II	
<i>Arabidopsis halleri</i> 1.1	Ah	Brassicaceae	Brassicales	Eurosidées II	
<i>Arabidopsis lyrata</i> 1.0	Al	Brassicaceae	Brassicales	Eurosidées II	
<i>Arabidopsis thaliana</i> TAIR 10	At	Brassicaceae	Brassicales	Eurosidées II	Mésangiospermes : Eudicotylédones Eurosidées II (Malvidées)
<i>Capsella rubella</i> 1.0	Cr	Brassicaceae	Brassicales	Eurosidées II	
<i>Thellungiella halophila</i> 1.0	Th	Brassicaceae	Brassicales	Eurosidées II	
<i>Carica papaya</i> 0.4	Cp	Caricaceae	Brassicales	Eurosidées II	
<i>Gossypium raimondii</i> 2.1	Gr	Malvaceae	Malvales	Eurosidées II	
<i>Theobroma cacao</i> 1.1	Tc	Malvaceae	Malvales	Eurosidées II	
<i>Genlisea aurea</i>	Ga	Lentibulariaceae	Lamiales	Lamidées / Astéridées	Mésangiospermes : Eudicotylédones Astéridées
<i>Mimulus guttatus</i> 2.0	Mg	Phrymaceae	Lamiales	Lamidées / Astéridées	
<i>Solanum lycopersicum</i>	Sl	Solanaceae	Solanales	Lamidées / Astéridées	
<i>Solanum tuberosum</i> 3.4	St	Solanaceae	Solanales	Lamidées / Astéridées	

siliculosus qui appartient au groupe des Straménopiles (Chromoalvéolés ou lignée brune) et à l'ordre des Ectocarpales, ayant divergé il y a 1768 Ma (1502 – 2035 Ma) de la lignée verte.

Dix autres génomes d'algues ont été retenus :

- 4 Rhodophytes, communément appelées algues rouges (lignée verte) : *Chondrus crispus* (ordre des Gigartinales), *Cyanidioschyzon merolae*, *Galdieria sulphuraria* (ordre des Cyanidiales) et *Pyropia yezoensis* (ordre des Bangiales).
- 6 Chlorophytes ou algues vertes : *Chlamydomonas reinhardtii*, *Volvox carteri* (ordre des Chlamydomonadales), *Chlorella vulgaris* (ordre des Chlorellales), *Cocomyxa subellipsoidea* (Trebouxiophyceae incertae sedis), *Ostreococcus lucimarinus*, et *Micromonas pusilla* (ordre des Mamiellales). Les Chlorophytes ont divergé des Rhodophytes il y a 1660 Ma (1343 – 1713 Ma).

Parmi les 11 algues choisies, 7 sont unicellulaires, 3 sont pluricellulaires (*Chondrus crispus*, *Pyropia yezoensis*, *Ectocarpus siliculosus*) et seul *Volvox carteri*, forme des colonies. Un nombre important d'algues a été volontairement choisi pour l'analyse car elles représentent un groupe polyphylétique de végétaux aquatiques très différent des 48 autres espèces qui sont des Embryophytes, c'est-à-dire des plantes terrestres. Parmi les algues choisies, seules les Chlorophytes forment un groupe monophylétique avec les Embryophytes.

Parmi les Embryophytes, plusieurs embranchements ont été considérés :

Physcomitrella patens (Rensing et al. 2008) est une mousse (Bryophyte), c'est-à-dire une espèce parmi les plus anciennes apparues avec la vie sur Terre. Elle appartient à l'ordre des Funariales.

Selaginella moellendorffii (Banks et al. 2011) est une fougère (Lycophyte). Ces plantes sont apparues à la suite des mousses, elles possèdent des caractères primaires d'adaptation à la vie terrestre et correspondent aux premières plantes vasculaires. *Selaginella moellendorffii* appartient à l'ordre des Selaginellales ayant divergé des Funariales il y a 532 Ma (481 – 584 Ma).

Le groupe des Gymnospermes est représenté par *Pinus taeda*, de l'ordre des Pinales ayant divergé des Selaginellales il y a 431 Ma (409 – 453 Ma).

Viennent ensuite les Magnoliophytes, plus communément appelées Angiospermes, comprenant les Proto-Angiospermes et les Mésangiospermes. Il y a 45 Angiospermes dans cette étude. La Proto-Angiosperme dont le génome est ancestral à tous les génomes de Mésangiospermes est *Amborella trichopoda* (Albert et al. 2013) la seule espèce représentante

des Amborellales qui sont des Proto-Angiospermes, ayant divergé des Pinales il y a 313 Ma (289 - 337 Ma).

Parmi les Mésangiospermes, seules les Monocotylédones et les Eudicotylédones ont été considérées.

Chez les Monocotylédones, 10 espèces sont présentes dans l'étude.

- *Spirodela polyrhiza* (grande lentille d'eau) / Alismatales (Wang et al. 2014)
- *Phoenix dactilifera* (palmier datier) / Arécales
- *Brachypodium distachyon* (brachypode à deux épis) / Poales
- *Oryza sativa* (riz) / Poales
- *Panicum hallii* (panic) / Poales
- *Panicum virgatum* (panic érigé) / Poales
- *Setaria italica* (sétaire d'Italie, millet pour oiseaux) / Poales (Zhang et al. 2012)
- *Sorghum bicolor* (sorgho) / Poales (Paterson et al. 2009)
- *Zea mays* (maïs) / Poales
- *Musa acuminata* (banane) / Zingibérales

L'ordre des Alismatales a divergé de l'ordre des Amborellales il y a 181 Ma (168 - 194 Ma), et de l'ordre des Poales il y a 128 Ma (117 - 140 Ma). L'ordre des Arécales a divergé de l'ordre des Poales il y a 114 Ma (98,1 - 139 Ma). L'ordre des Zingibérales a divergé de l'ordre des Poales il y a 105 Ma (90 - 115 Ma). A partir de ces datations, nous pouvons conclure que l'ordre des Alismatales inclue les monocotylédones les plus anciennes et que *Spirodela polyrhiza* et *Phoenix dactilifera* présentent potentiellement des caractères ancestraux par rapport aux 7 espèces appartenant à l'ordre des Poales. *Musa acuminata* ferait quant à elle partie des monocotylédones analysées dans cette étude ayant divergé le plus récemment.

Deux espèces représentent des Dicotylédones archaïques. Il s'agit et d'*Aquilegia coerulea* (ancolie, Ranunculales) et de *Nelumbo nucifera* (lotus sacré, Protéales) qui appartiennent aux Paleo-dicotylédones et à un taxon d'émergence précoce, respectivement. Ces deux ordres ont divergé il y a 128 Ma (122 - 134 Ma). *Vitis vinifera* (vigne) représente l'espèce appartenant à un groupe frère des Eurosidées, le groupe des Vitales, dont l'unique famille est celle des Vitacées. Les Vitales ont divergé il y a 128 Ma (122 - 134 Ma) des Ranunculales et il y a 122 Ma (116,5 - 127 Ma) des Protéales. Vingt-sept Eudicotylédones sont des Eurosidées, ayant divergé de l'ordre des Vitales il y a 110 Ma (105 - 115 Ma), et participent à la définition de deux clades botaniques (tableau 6) : les Eurosidées I (anciennement Fabidées, 16 espèces) et

les Eurosidées II (anciennement Malvidées, 11 espèces). Enfin, 4 autres Eudicotylédones sont des Astéridées I (Lamiidées, 4 espèces).

Le clade des Eurosidées I, est le clade le plus largement représenté dans l'étude avec 16 espèces appartenant à 5 ordres différents :

- les Malpighiales : *Ricinus communis* (ricin) (Chan et al. 2010) ; *Manihot esculenta* (manioc) ; *Linum usitatissimum* (lin) ; *Populus trichocarpa* (peuplier de l'ouest) ; *Salix purpurea* (saule pourpre)
- les Fabales : *Glycine max* (soja), *Phaseolus vulgaris* (haricot commun) ; *Medicago truncatula* (luzerne tronquée) ; *Lotus japonicus* (lotier) ; *Cicer arietinum* (pois chiche)
- les Rosales : *Malus domestica* (pommier), *Fragaria vesca* (fraise) et *Prunus persica* (pêcher)
- les Cucurbitales : *Cucumis melo* (melon), *Cucumis sativus* (concombre)
- les Myrtales : *Eucalyptus grandis* (gommier rose).

Le clade des Eurosidées II, est très représenté dans l'étude : il compte 11 espèces appartenant à 3 ordres différents :

- les Sapindales : *Citrus clementina* (clémentine) ; *Citrus sinensis* (orange)
- les Malvales : *Gossypium raimondii* (coton) ; *Theobroma cacao* (cacaoyer)
- les Brassicales : *Brassica rapa* (navet/moutarde) ; *Arabidopsis halleri* (arabette de Haller) ; *Arabidopsis lyrata* (arabette de lyrée) ; *Arabidopsis thaliana* (arabette des dames) ; *Capsella rubella* (bourse-à-pasteur rougeâtre) ; *Thellungiella halophila* (retrouvée aussi sous le nom d'*Eutrema salsugineum*) et *Carica papaya* (papayer).

L'ordre des Brassicales est volontairement très représenté pour deux raisons majeures. Tout d'abord, les Brassicales ont bien souvent des génomes très proches c'est-à-dire partageant une forte identité au niveau des séquences génomiques et protéiques. Ensuite, *Arabidopsis thaliana*, espèce modèle et sur laquelle le travail de thèse est recentré par la suite, fait partie de l'ordre des Brassicales. Au sein de cet ordre, six espèces sur les sept étudiées font partie de la famille des Brassicaceae exception faite de *Carica papaya* qui fait partie de la famille des Caricaceae. La divergence des Caricaceae et des Brassicaceae date d'il y a 68 Ma (53 - 82 MA).

Le clade des Lamiidées est représenté par quatre espèces, deux Solanales (*Solanum lycopersicum* (tomate) et *Solanum tuberosum* (pomme de terre) et deux Lamiales : *Genlisea aurea* (plante carnivore) et *Mimulus guttatus* (mimule tacheté). Les Solanales et Lamiales ont

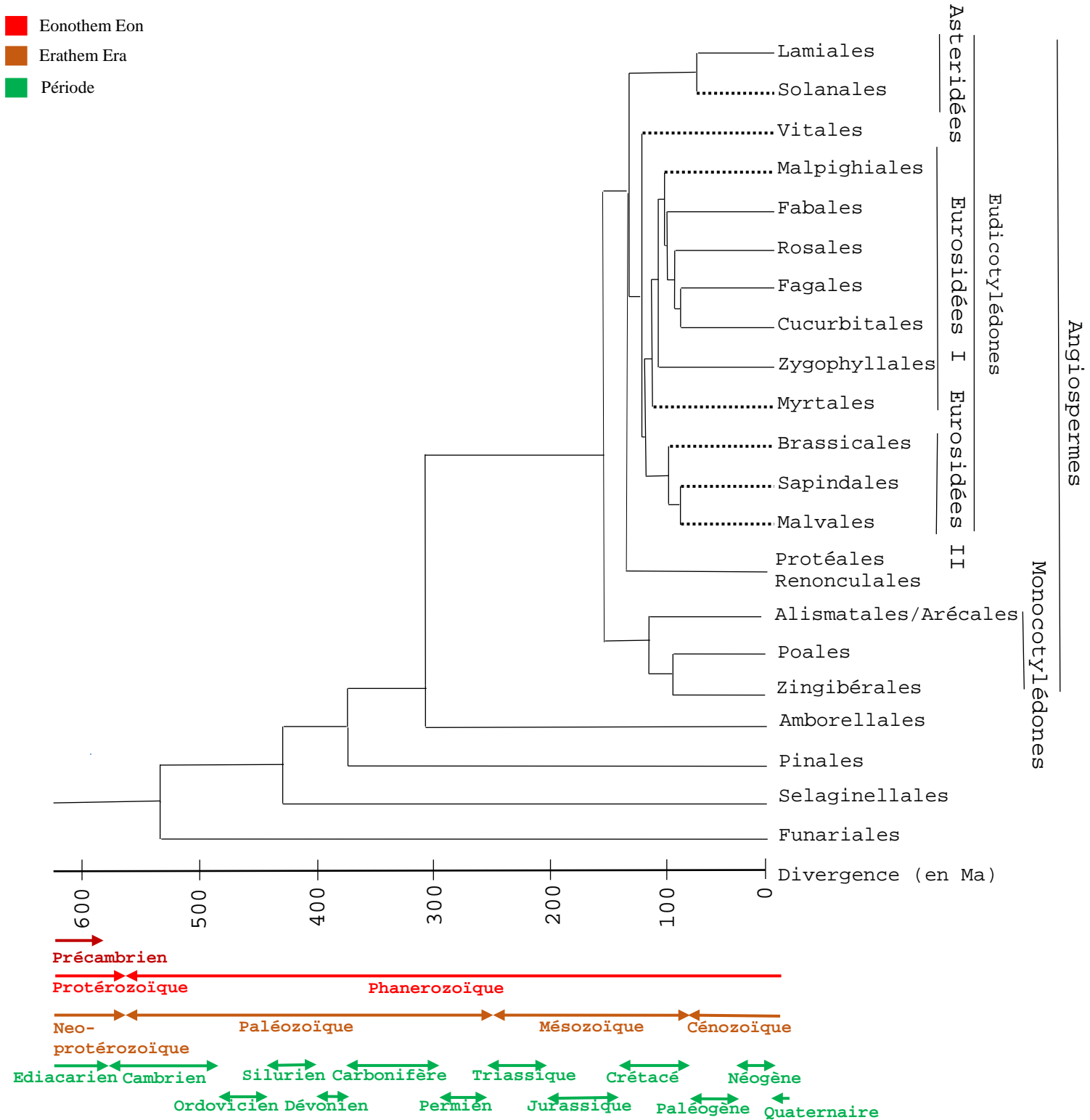


Figure 17 : Evolution des ordres d'Embryophytes représentés dans cette étude au cours du temps

Toutes les flèches ou lignes sont à la même échelle à l'exception de la flèche représentant le Quaternaire qui a été grossie dans le but d'être perçue. Sur l'échelle de temps géologique, une ligne encadrée de deux flèches représente une période géologique finie. Lorsque l'échelle de temps n'inclut pas le début ou la fin d'une période, alors une seule flèche est représentée. Les ordres des Fagales et des Zygophyllales ne sont pas représentés dans l'étude phylogénétique mais sont inclus dans cet arbre pour prendre en compte la vision actuelle de l'Evolution des Plantes.

divergés des Vitales il y a 117 Ma (110 - 124 Ma) et ont divergé entre elles il y a 84 Ma (75 - 88 Ma).

Pour avoir une idée simple de l'évolution des espèces choisies pour l'analyse, la figure 17 résume l'évolution des Embryophytes en faisant apparaître uniquement les ordres représentés dans l'étude. Les ordres des Fagales et des Zygophyllales ne sont pas représentés dans l'étude mais ils apparaissent sur la figure par souci de clarté. Cette figure est adaptée des publications du livre *Time Tree of Life*, disponible en ligne (www.timetree.org). Toutes les dates de divergence citées précédemment ont été obtenues à partir de cette base de données. Les algues ne sont pas représentées dans cette figure mais sont, de façon évidente, d'apparition antérieure aux Embryophytes.

1.1.2 Identification de protéines homologues aux ERD6-like de vigne

Afin d'identifier les protéines ERD6-like présentes dans les 59 espèces sélectionnées, l'outil BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) a été utilisé. Cet outil permet de faire des alignements de séquences protéiques ou/et génomiques, de calculer les pourcentages d'identité entre deux séquences alignées et ainsi de déterminer l'appartenance d'une séquence inconnue à une famille de gènes connue. Sur les bases de données utilisées pour la sélection des espèces, il a été possible d'effectuer des BLAST à l'aide d'une séquence d'entrée précise contre le protéome d'une espèce spécifique. Dix-huit séquences protéiques ERD6-like identifiées chez la vigne par l'équipe SEVE lors de la thèse d'Anna Medici (soutenue en 2010) et de Damien Afoufa-Bastien (soutenue en 2010) (Afoufa-Bastien et al. 2010) et disponibles sur Aramemnon ont été utilisées en tant que séquences d'entrée pour effectuer chaque BLASTp. Chaque séquence protéique ERD6-like de vigne a été comparée par BLASTp au protéome de chacune des 58 autres espèces sélectionnées pour l'étude. Cela représente 1044 BLASTp indépendants, auxquels s'est ensuit une analyse des résultats obtenus pour déterminer le seuil de stringence à adopter afin de discriminer les « vrais » des « faux » positifs. Pour chaque BLASTp, une liste de « hits », c'est-à-dire de transcrits correspondant potentiellement à des ERD6-like, est générée. A chaque « hit » correspond une valeur statistique qui intègre la longueur de la protéine, le pourcentage d'identité et la longueur sur laquelle les deux protéines sont similaires en séquence, et en restitue une valeur appréciative appelée e-value. Lors de l'analyse, le seuil des e-value a été fixé à une valeur maximale de 10^{-60} . A la suite du séquençage de l'ADN génomique d'un organisme, des étapes informatisées d'annotation protéique mènent à l'annotation de protéomes parfois incomplets

Tableau 7 : nombre d'ERD6-like identifiés dans chaque génome. Pour chaque espèce analysée, la version de l'annotation des génomes (si connue) et l'abréviation désignant l'organisme sont indiquées. Le nombre d'ERD6-like identifié dans chaque protéome est indiqué dans la troisième colonne.

Organisme	Abréviation	Nombre d'ERD6-like
<i>Amborella trichopoda</i> 1.0	Atr	5
<i>Aquilegia coerulea</i> 1.1	Ac	7
<i>Arabidopsis halleri</i> 1.1	Ah	14
<i>Arabidopsis lyrata</i> 1.0	Al	19
<i>Arabidopsis thaliana</i> TAIR 10	At	19
<i>Brachypodium distachyon</i>	Bd	7
<i>Brassica rapa</i> 1.3	Br	30
<i>Capsella rubella</i> 1.0	Cr	17
<i>Carica papaya</i> 0.4	Cp	11
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> 5.5	Cre	0
<i>Chlorella vulgaris</i>	Cv	0
<i>Chondrus crispus</i>	Ccr	0
<i>Cicer arietinum</i>	Ca	7
<i>Citrus clementina</i> 1.0	Cc	12
<i>Citrus sinensis</i> 1.1	Csi	9
<i>Coccomyxa subellipsoidea</i> 2.0	Csu	0
<i>Cucumis melo</i>	Cm	7
<i>Cucumis sativus</i> 1.0	Csa	7
<i>Cyanidioschyzon merolae</i>	Cme	0
<i>Ectocarpus siliculosus</i>	Es	0
<i>Eucalyptus grandis</i> 2.0	Eg	37
<i>Galdieria sulphuraria</i>	Gs	0
<i>Genlisea aurea</i>	Ga	6
<i>Glycine max</i> 1.0	Gm	19
<i>Gossypium raimondii</i> 2.1	Gr	19
<i>Linum usitatissimum</i> 1.0	Lu	30
<i>Lotus japonicus</i>	Lj	4
<i>Malus domestica</i> 1.0	Md	11
<i>Manihot esculenta</i> 4.1	Me	14
<i>Medicago truncatula</i> 1.0	Mt	10
<i>Micromonas pusilla</i> 3.0	Mp	0
<i>Mimulus guttatus</i> 2.0	Mg	6
<i>Musa acuminata</i>	Ma	5
<i>Nelumbo nucifera</i>	Nn	8
<i>Oryza sativa</i>	Os	6
<i>Ostreococcus lucimarinus</i> 2.0	Ol	0
<i>Panicum hallii</i> 0.5	Ph	7

Organismes	Abréviation	Nombre d'ERD6-like
<i>Panicum virgatum</i> 1.1	Pvi	12
<i>Phaesolus vulgaris</i> 1.0	Pvu	6
<i>Phoenix dactylifera</i>	Pd	4
<i>Physcomitrella patens</i> 3.1	Ppa	3
<i>Pinus taeda</i> 1.0	Pita	9
<i>Populus trichopoda</i> 3.0	Ptr	11
<i>Prunus persica</i> 2.1	Ppe	6
<i>Pyropia yezoensis</i>	Py	0
<i>Ricinus communis</i> 0.1	Rc	9
<i>Salix purpurea</i> 1.0	Spu	13
<i>Selaginella moellendorffii</i> 1.0	Sm	2
<i>Setaria italica</i> 2.1	Si	7
<i>Solanum lycopersicum</i>	Sl	10
<i>Solanum tuberosum</i> 3.4	St	11
<i>Sorghum bicolor</i> 2.1	Sb	7
<i>Spirodela polyrhiza</i> 2.0	Spo	3
<i>Thellungiella halophila</i> 1.0	Th	16
<i>Theobroma cacao</i> 1.1	Tc	10
<i>Vitis vinifera</i>	Vv	18
<i>Volvox carteri</i> 2.0	Vc	0
<i>Zea mays</i>	Zm	9

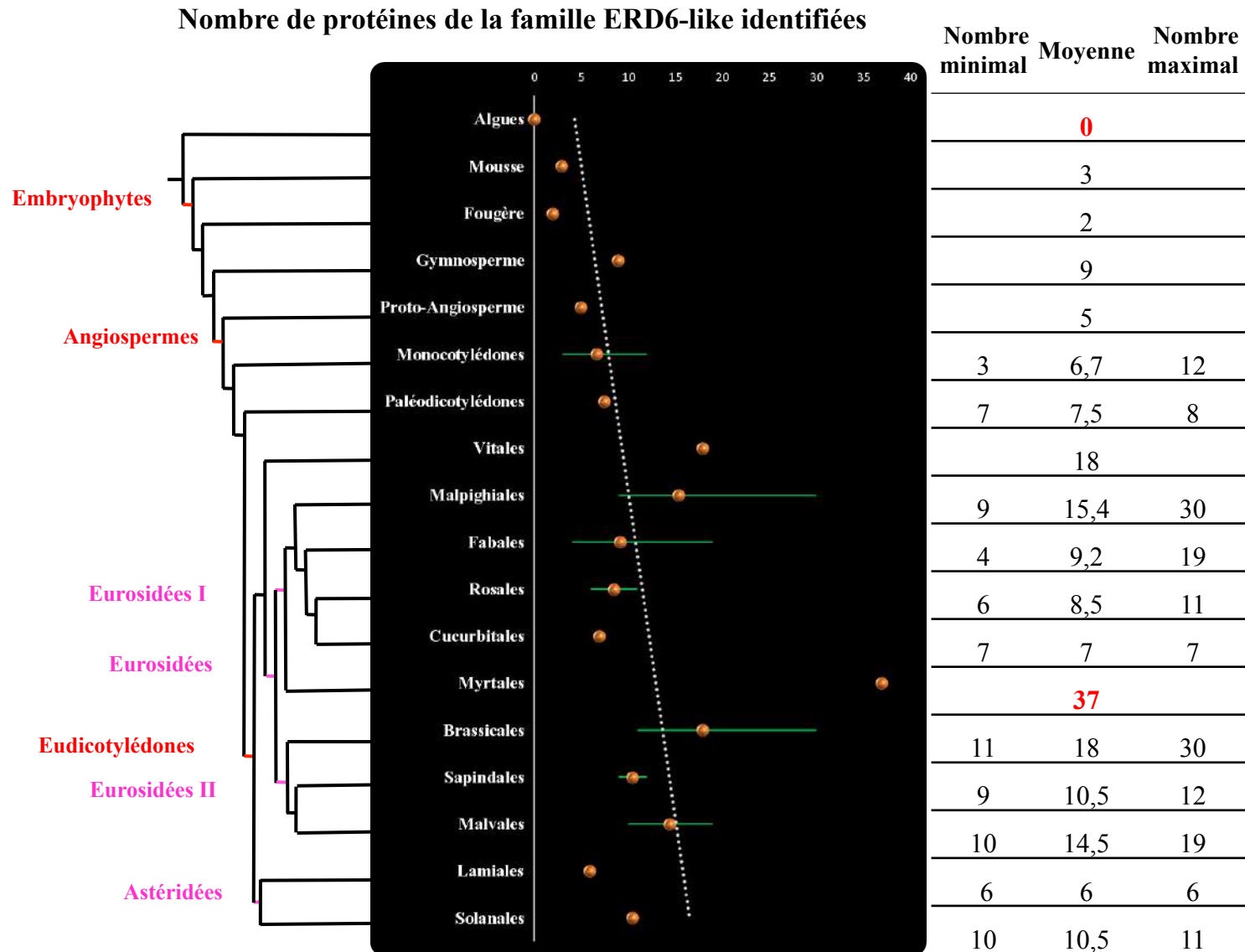


Figure 18 : représentation de l'évolution du nombre moyen d'ERD6-like moyen dans chaque groupe botanique. Pour chaque groupe, un point orange représente la moyenne du nombre d'ERD6-like. Les lignes vertes modélisent la variance du nombre d'ERD6-like. Une courbe de tendance à prévision linéaire permet de visualiser l'évolution globale du nombre moyen d'ERD6-like dans les génomes au fur et à mesure de l'évolution.

du fait de l'automatisation de l'annotation. Malgré ces inconvénients mineurs, cette étude a été menée avec les séquences protéiques et non pas avec les séquences génomiques afin de rendre l'identification plus rapide et plus aisée. En effet, les séquences protéiques d'une même famille sont plus proches entre elles que ne le sont les séquences génomiques. La présence d'introns dans les séquences génomiques renforce cette observation : en effet, selon les gènes, les introns sont plus ou moins longs, nombreux et conservés. Il est apparu nécessaire durant ce travail d'identification de protéines ERD6-like de s'assurer en priorité de la fiabilité et de la qualité des résultats. De ce fait, il est possible que les résultats ne soient pas exhaustifs. Néanmoins, ce travail d'identification massive de protéines ERD6-like est la première étude de la sorte aussi complète menée jusqu'à présent et a permis d'identifier 544 ERD6-like au sein des 59 génomes de plantes représentatives de l'ensemble du Règne végétal.

Pour les 544 séquences protéiques identifiées, seules les protéines issues des transcrits primaires pleine longueur d'un même gène ont été prises en compte pour éviter d'intégrer à l'analyse des protéines issues du même gène et de faire ainsi des déductions erronées sur le nombre de gènes *ERD6-like* identifiés. Ainsi, le principe selon lequel une protéine identifiée correspond à un gène présent dans le génome a pu être appliqué. Après l'analyse des 544 séquences grâce, notamment, à des alignements menés à l'aide du logiciel BioEdit, 8 séquences ont été écartées de l'étude : une séquence de *Brassica rapa*, 2 séquences de *Linum usitatissimum*, 4 séquences de *Malus domestica* et 1 séquence de *Pinus taeda*. De plus, l'espèce *Fragaria vesca*, pour laquelle 17 ERD6-like putatifs ont été identifiés par BLASTp, a été éliminée de l'étude. La raison de toutes ces éliminations est que les séquences présentaient une trop faible homologie avec les autres séquences ERD6-like et/ou un défaut d'annotation trop important. Ainsi, 519 séquences ERD6-like et 58 espèces ont été conservées pour le reste de l'étude. Le nombre de protéines ERD6-like identifiées chez chacune des 58 espèces est présenté dans le tableau 7 et la figure 18 visualise l'évolution du nombre moyen de protéine ERD6-like dans chacun des groupes botaniques.

Bien que 11 génomes d'algues aient été analysés, aucune séquence protéique ayant une homologie significative avec les ERD6-like n'a pu être identifiée. Ceci suggère très fortement qu'il n'y a pas d'ERD6-like chez les algues, qu'elles soient uni- ou pluricellulaires ou qu'elles appartiennent au groupe des Straménopiles, des Rhodophytes ou des Chlorophytes. Pour la mousse *Physcomitrella patens* et pour la fougère *Selaginella moellendorffi*, 3 et 2 transporteurs ERD6-like ont été identifiés, respectivement. Des copies *ERD6-like* sont donc présentes dans les génomes des premières plantes terrestres. L'ensemble de ces observations

permet d'émettre l'hypothèse que les premières copies des *ERD6-like* pourraient être apparues chez l'ancêtre des Embryophytes.

Pour la Gymnosperme *Pinus taeda*, 9 ERD6-like ont été identifiés. Pour les Angiospermes, une moyenne de $11,45 \text{ ERD6-like} \pm 7,28$ peut être calculée ce qui amène à la constatation que le nombre moyen d'ERD6-like dans le génome des plantes est plus important chez les Angiospermes, plantes ayant divergé plus récemment, que chez les Bryophytes, Lycophytes et Pinales. A la base des Angiospermes, *Amborella trichopoda* posséderait 5 copies *ERD6-like* dans son génome. A partir des Monocotylédones, des moyennes ont pu être déterminées par le fait qu'un groupe botanique est généralement représenté par au moins deux espèces. Chez les Monocotylédones, 6,7 ERD6-like en moyenne ont été identifiés avec le nombre le plus faible chez *Spirodela polyrhiza* (3 ERD6-like) et le nombre le plus important chez *Panicum virgatum* (12 ERD6-like). Chez les paléodicotylédones *Nelumbo nucifera* et *Aquilegia coerulea*, à la base des Eudicotylédones, 8 et 7 ERD6-like ont pu être identifiés, respectivement. A partir des Vitales, représenté par *Vitis vinifera* dans cette étude, une augmentation du nombre moyen d'*ERD6-like* dans les génomes est à noter. En effet, chez la vigne, 22 ERD6-like avaient déjà été identifiés (Afoufa-Bastien et al. 2010). Néanmoins, dans la présente étude, uniquement les transcrits pleine longueur ont été considérés soit 18 ERD6-like identifiés dans le génome de la vigne. On dénombre également en moyenne 15,4 ERD6-like chez les Malpighiales ; 9,2 chez les Fabales ; 8,5 chez les Rosales ; 7 chez les cucurbitales ; 18 chez les Brassicales ; 10,5 chez les Sapindales ; 14,5 chez les Malvales ; 6 chez les Lamiales et 10,5 chez les Solanales. Chez les Myrtales, une seule espèce (*E. grandis*) est incluse dans l'analyse ce qui ne permet pas de faire d'observation quant au nombre moyen d'ERD6-like dans cet ordre. Cependant, il est intéressant de noter que pour cette espèce, 37 ERD6-like ont pu être identifiés et indique que *E. grandis* est l'espèce qui possède le plus d'ERD6-like. Comme le montre la figure 18, le nombre moyen d'ERD6-like identifiés chez les plantes augmente au fur et à mesure de l'évolution avec une expansion importante du nombre d'ERD6-like chez les Eurosidées (I et II). Le nombre moyen d'ERD6-like pour les Eurosidées, toutes espèces confondues (14,29) est nettement supérieur aux moyennes calculées pour les Monocotylédones (6,7), pour les Astéridées (8,25) et pour les autres Angiospermes. Ceci laisse à penser que cette expansion des ERD6-like est spécifique aux Eurosidées. De plus, chez les Eurosidées, certaines espèces contiendraient un nombre très important et très largement supérieur à la moyenne de protéines ERD6-like, comme chez *Eucalyptus grandis* (37 ERD6-like), *Linum usitatissimum* (30 ERD6-like) et *Brassica rapa* (30 ERD6-like).

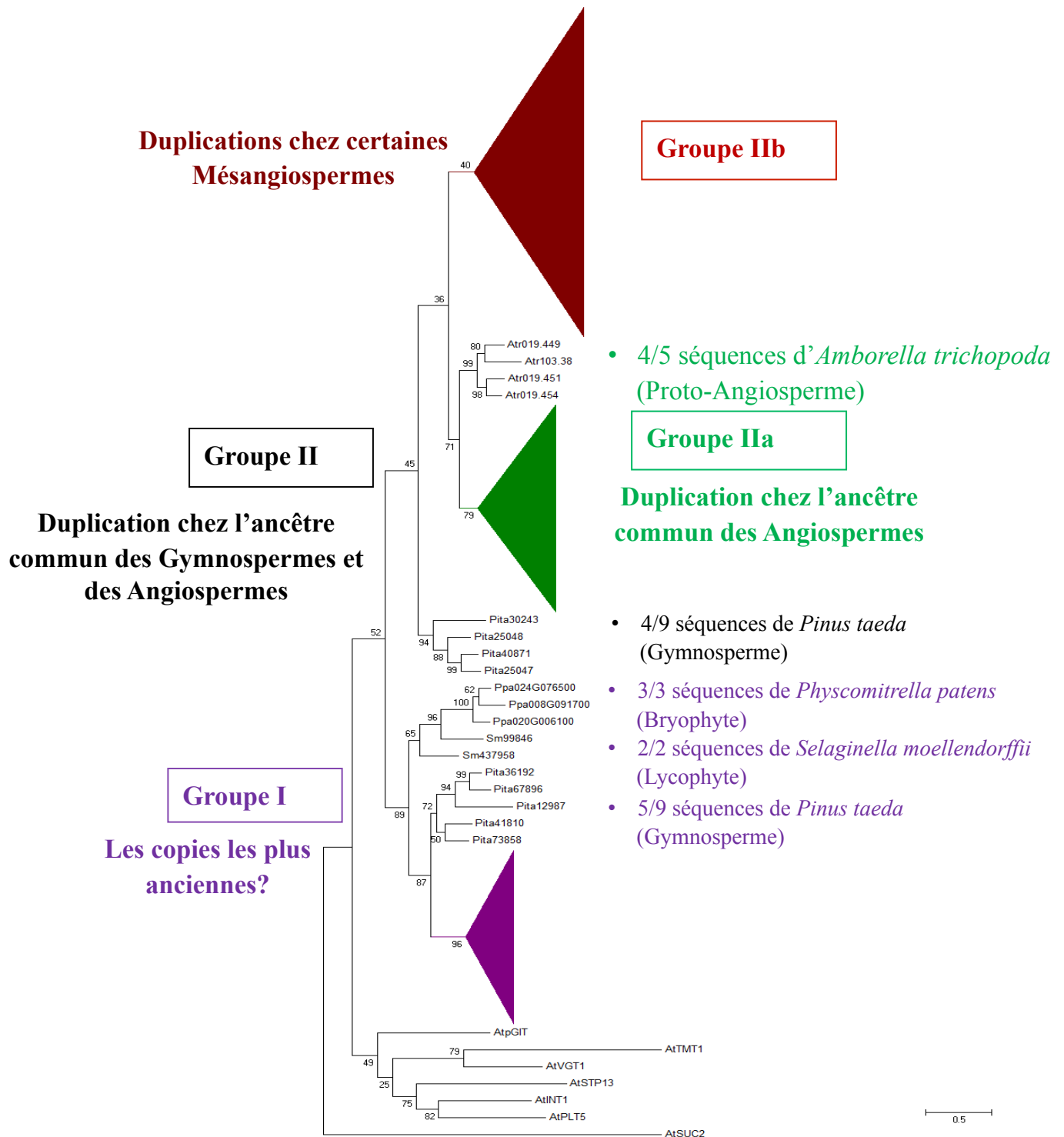


Figure 19 : arbre phylogénétique des séquences protéiques des transporteurs de la famille ERD6-like. L'arbre phylogénétique construit sur la base des 519 séquences protéiques ERD6-like identifiées chez les 47 espèces a été obtenu grâce au logiciel MEGA 6. L'alignement a été réalisé avec la méthode Clustal W et l'arbre phylogénétique a été construit selon la méthode de Maximum Likelihood, avec 1000 Bootstrap. Le modèle de substitution utilisé est le JTT (John Taylor Thornton). L'arbre initial a été optimisé par la méthode de maximum de parsimonie. L'enracinement de l'arbre a été permis par l'insertion de 7 séquences protéiques : AtSUC2 (*Arabidopsis thaliana* Sucrose Carrier 2), un transporteur de saccharose, AtPLT5 (Polyol Transporter 5), AtINT1 (Inositol Transporter 1), AtSTP13 (Sugar Transport Protein 13), AtVGT1 (Vacuolar Glucose Transporter 1), AtTMT1 (Tonoplasmic Monosaccharides Transporter 1) et AtpGIT (Plastidic Glucose transporter 1), chacun représentant une autre sous-famille de transporteurs de monosaccharides. Les chiffres dans l'arbre représentent les valeurs de bootstrap et l'échelle permet de visualiser la distance génétique.

1.2 Analyse phylogénétique de l'évolution des transporteurs de monosaccharides de la famille ERD6-like

Les 519 séquences d'ERD6-like identifiées ont permis d'établir un arbre phylogénétique des transporteurs de monosaccharides de la famille ERD6-like. Afin d'enraciner l'arbre phylogénétique, un set de 7 séquences protéiques d'*Arabidopsis thaliana* a été utilisé. Ces séquences ont été minutieusement choisies et sont des séquences protéiques de transporteurs de sucres appartenant à la superfamille MFS (Major Facilitator Superfamily). AtSUC2 est le transporteur de saccharose le mieux caractérisé et étudié chez *Arabidopsis thaliana*, il a donc été sélectionné en tant que représentant de cette famille de transporteurs de disaccharides (Sauer 2007). En complément, 6 séquences protéiques de transporteurs de monosaccharides caractérisés chez *Arabidopsis thaliana* ont été également utilisées pour enraciner l'arbre. Ces transporteurs représentent un membre de chaque sous-famille de la MST autre que les ERD6-like : AtPLT5 (Polyol Transporter 5), AtINT1 (Inositol Transporter 1), AtSTP13 (Sugar Transport Protein 13), AtVGT1 (Vacuolar Glucose Transporter 1), AtTMT1 (Tonoplast Monosaccharides Transporter) et AtpGIT (vacuolar Glucose transporter). L'alignement des 526 séquences a été réalisé grâce à l'algorithme ClustalW. Puis un arbre phylogénétique a été réalisé en utilisant la méthode statistique de maximum de vraisemblance et le modèle de substitution JTT (Jones Taylor Thornton) spécifique des acides aminés et la méthode de maximum de parcimonie. L'analyse a demandé plusieurs essais et une optimisation avant d'aboutir à la fixation de ces différents paramètres. Les noms des ERD6-like identifiés ont été modifiés à partir de la version d'origine. La correspondance entre le nom d'un ERD6-like dans cette étude et le nom sous lequel il apparaît dans la base de données de laquelle la séquence provient apparaît en annexe 1. La figure 19 représente l'arbre phylogénétique obtenu pour les 519 séquences de transporteurs ERD6-like identifiés. L'enracinement de l'arbre grâce à la séquence AtSUC2, démontre que les 519 transporteurs ERD6-like identifiés ne sont pas des transporteurs de disaccharides. De même, grâce à la présence des 6 séquences représentatives des 6 autres sous-familles de transporteurs de monosaccharides, nous pouvons observer que les 519 séquences protéiques ERD6-like identifiées sont regroupées dans un seul groupe monophylétique bien distinct de tous les autres transporteurs de monosaccharides. Cette observation confirme l'identification par BLASTp des séquences protéiques ERD6-like.

Le groupe des ERD6-like peut être divisé en trois grands groupes monophylétiques.

Le premier groupe, appelé groupe I (figure 19), constitué de 133 séquences ERD6-like (25,63% des séquences) est défini par la présence de toutes les séquences ERD6-like de la

Bryophyte *Physcomitrella patens* (3 séquences), de la Lycophyte *Selaginella moellendorffii* (2 séquences) ainsi que par la présence de 5 séquences sur 9 de la Gymnosperme *Pinus taeda*. Ces séquences se retrouvent à la base d'un clade contenant les séquences de toutes les Angiospermes présentes dans le groupe I, ce qui signifie qu'elles sont légèrement différentes et suggèrent que les 123 copies ERD6-like des 44 espèces d'Angiospermes du groupe I (valeur de robustesse de 96 % par la méthode bootstrap, donc, sur 1000 constructions du même arbre, 960 résultats supportent ce groupe tel qu'il est représenté dans la figure 19), pourraient dériver des 10 copies présentes dans le génome des Bryophytes, des Lycophytes et des Gymnospermes (Pinales), qui ont divergé plus tôt. De plus, le fait que chacune des espèces étudiées (47 au total) ait au moins une copie ERD6-like dans le groupe I permet d'émettre l'hypothèse que ces copies aient été conservées au cours de l'évolution des Embryophytes.

Le deuxième groupe, appelé groupe II, est un groupe monophylétique à la base duquel sont classées les 4 autres séquences (4/9) de *Pinus taeda* (supportées par une valeur de bootstrap de 94%). Ces 4 séquences se retrouvent ainsi à part des 5 séquences du groupe I. Dans ce groupe II, aucune séquence de *Physcomitrella patens* et de *Selaginella moellendorffii* n'est présente. Ceci suggère qu'à partir des premières copies apparues chez les premières plantes terrestres, telles que les mousses ou les fougères, une duplication dans le génome de l'ancêtre commun des Gymnospermes et des Angiospermes a conduit à l'apparition de nouvelles copies bien distinctes. Cela correspondrait à un premier événement de duplication chez cette famille de transporteur de sucres. Le groupe II, peut être divisé en deux sous-groupes, nommés IIa et IIb. Le groupe IIa est constitué de 150 séquences ERD6-like (28,9 % du total des séquences) et le groupe IIb de 232 séquences ERD6-like (44,70% du total des séquences). A la base du groupe IIa se positionnent 4 séquences sur les 5 d'*Amborella trichopoda* (1 séquence étant présente dans le groupe I). Le groupe IIa, est un groupe spécifique de séquences d'Angiospermes dans lequel toutes les espèces étudiées sont représentées par la présence d'au moins 1 ERD6-like. Etant donné que parmi ces espèces, *Amborella trichopoda* est celle qui aurait divergé le plus tôt au cours l'évolution, nous pouvons envisager qu'un deuxième événement de duplication ait eu lieu, dans le génome de l'ancêtre commun aux Magnoliophytes (Angiospermes) dont *Amborella trichopoda* constitue actuellement le taxon le plus basal. Le groupe IIb, forme un groupe monophylétique distinct des groupes I et IIa, mais néanmoins plus proche du groupe IIa en raison de la plus forte homologie des séquences qui le constituent avec les 4 séquences de *Pinus taeda* présentes à la base du groupe II. Dans le groupe IIb, il n'y a plus de séquence de Bryophyte, de Lycophyte,

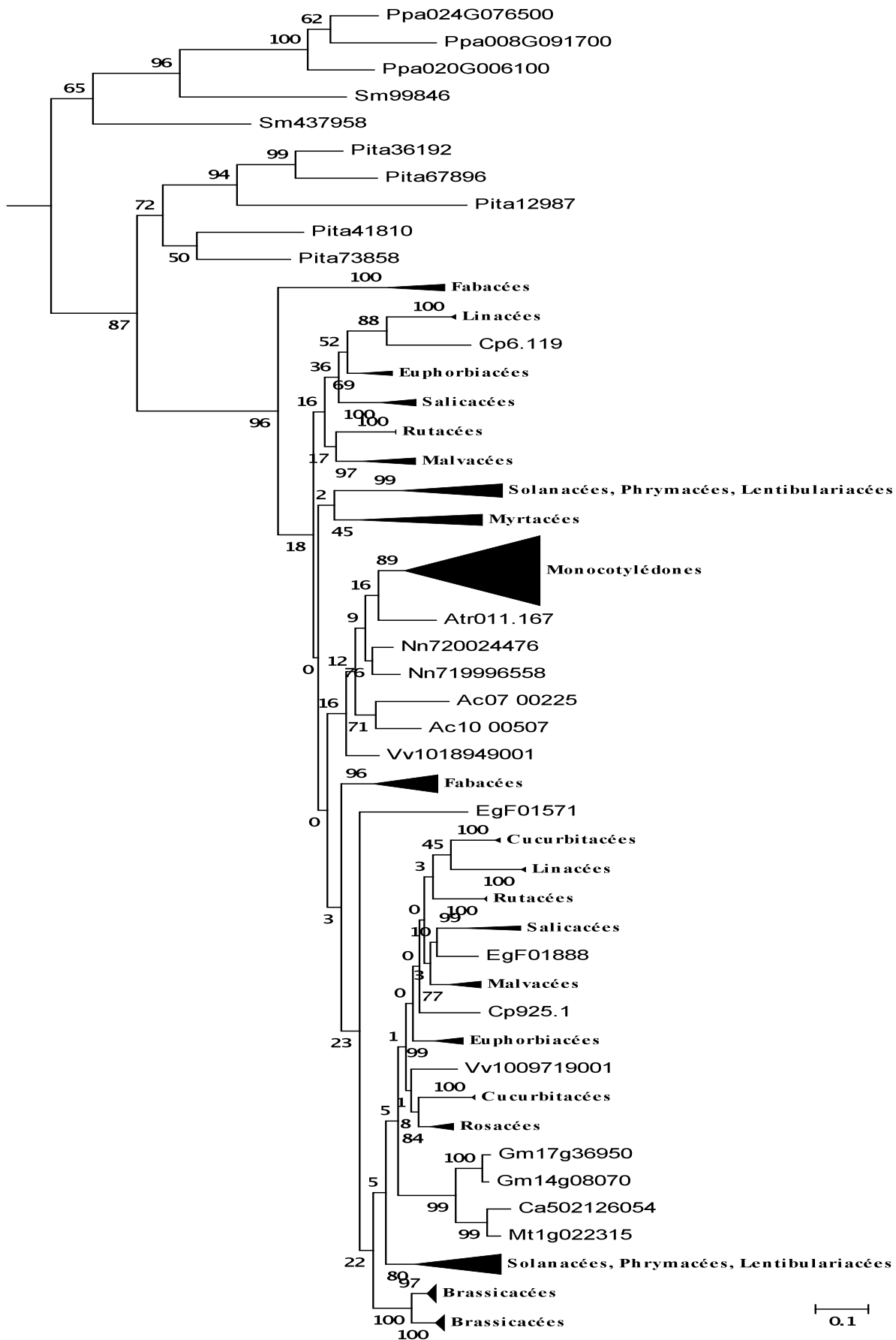


Figure 20 : sous-arbre extrait de l'arbre phylogénétique complet, représentant uniquement le groupe I. Les triangles représentent des groupes monophylétiques de séquences ERD6-like appartenant à des espèces de la même famille, du même ordre, ou d'un même groupe botanique. Les chiffres indiquent les valeurs de bootstrap (en %). La distance génétique peut être visualisée par le biais de l'échelle montrée en bas de l'arbre.

de Gymnosperme et de Proto-Angiosperme, ce groupe semble donc spécifique des Mésangiospermes. De plus, il est à noter qu'il n'y a plus de séquence de *Spirodela polyrhiza*, espèce appartenant à l'ordre des Alismatales, un ordre plutôt ancien chez les Monocotylédones. De même, il n'y a plus de séquence de *Brachypodium distachyon* et d'*Oryza sativa*, toutes deux également des Monocotylédones. En revanche, chaque Eudicotylédone est représentée dans le groupe IIb par la présence d'au moins 1 copie ERD6-like.

L'arbre phylogénétique représentant l'évolution des 519 séquences de transporteurs de monosaccharides de la famille ERD6-like des 47 plantes se subdivise donc en 3 groupes monophylétiques : le groupe I regroupant toutes les espèces, le groupe IIa spécifique des Angiospermes et le groupe IIb spécifique des Mésangiospermes.

Dans le but d'affiner l'analyse de l'arbre phylogénétique, la composition de chaque groupe a été analysée en détail.

La figure 20 représente le sous arbre correspondant au groupe I. Dans le groupe I une seule séquence d'*Amborella trichopoda*, deux séquences de *Nelumbo nucifera*, deux séquences d'*Aquilegia caerulea* et une séquence de *Vitis vinifera* se positionnent à la base d'un groupe spécifique et unique de séquences de Monocotylédones (groupe monocotylédones 1), regroupant toutes les séquences de cette classe. Les séquences ERD6-like de Monocotylédones du groupe I de l'arbre phylogénétique (soutenu par une valeur de bootstrap de 89%), sont donc toutes rassemblées dans un même groupe phylogénétique, spécifique des Monocotylédones et proches des ERD6-like de la Proto-Angiosperme *Amborella* et des Eudicotylédones les plus basales de l'étude. Pour les Mésangiospermes, il est possible de distinguer deux groupes d'Astériidées regroupant les familles des Solanacées (Solanales), des Phrymaccées et des Lenibulariacées (Lamiales) alors que pour les Eurosidiées, de nombreux petits groupes monophylétiques spécifiques des familles peuvent être observés. Il est possible de distinguer 2 sous-groupes pour presque toutes les familles d'Eurosidiées. Pour les Cucurbitacées, les deux sous-groupes semblent moins distants que pour d'autres familles. Les Brassicacées sont représentées par un seul groupe monophylétique de séquences ERD6-like qui peut toutefois être subdivisé en 2 sous-groupes bien distincts. Il est intéressant de noter que, les 2 séquences de *Carica papaya* ne se positionnent pas dans le groupe des Brassicacées et que l'une est plus proche d'un groupe de séquences de Malvacées et la seconde d'un groupe de séquences de Linacées (Malpighiales). Or, puisque les Caricacées

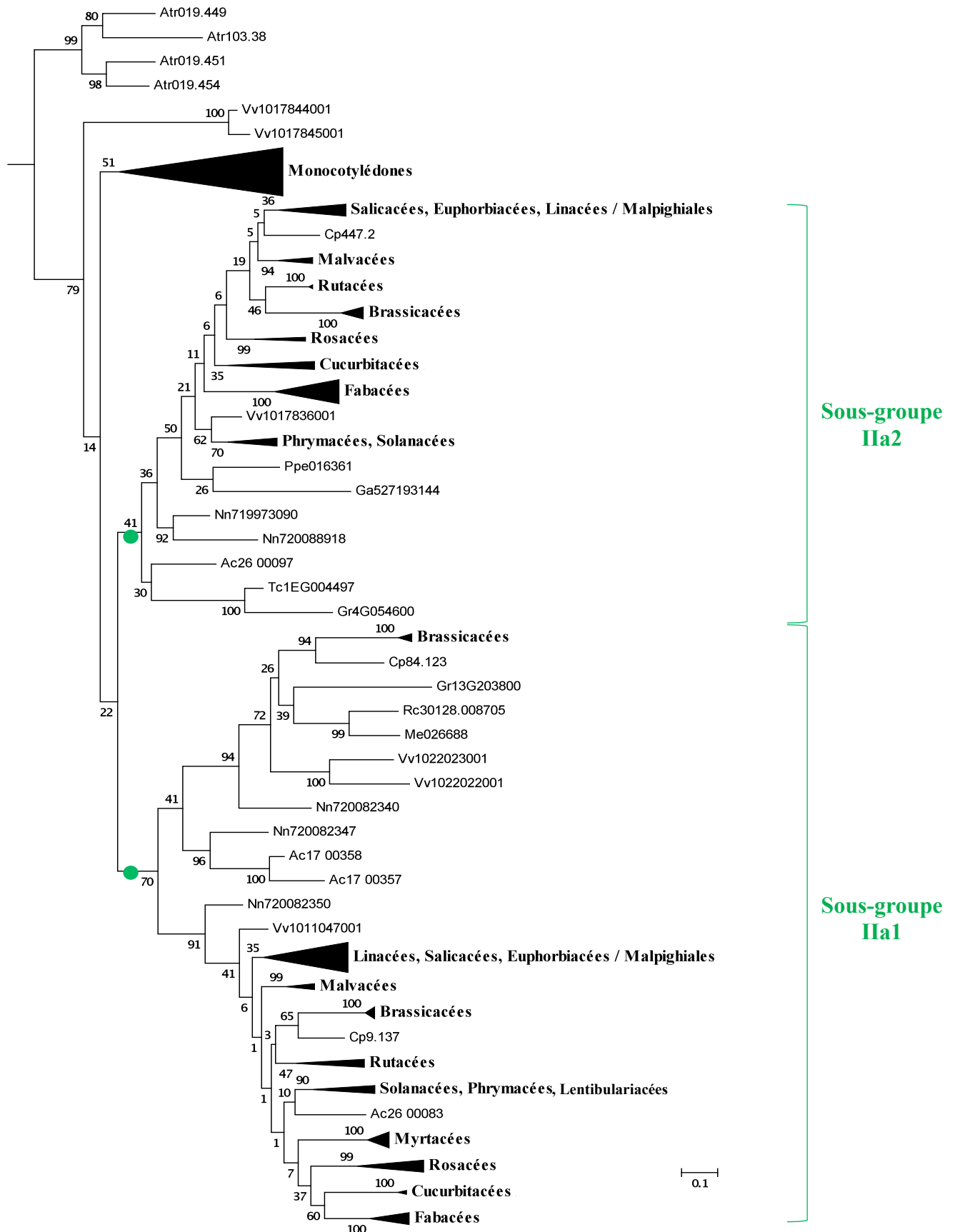


Figure 21 : sous-arbre extrait de l'arbre phylogénétique complet, représentant uniquement le groupe IIa. Les triangles représentent des groupes monophylétiques de séquences ERD6-like appartenant à des espèces de la même famille, du même ordre, ou d'un même groupe botanique. Les chiffres indiquent les valeurs de bootstrap (en %). La distance génétique peut être visualisée par le biais de l'échelle montrée en bas de l'arbre. Les points colorés indiquent la base de chaque sous-groupe monophylétique du groupe IIa (IIa1 et IIa2).

appartiennent à l'ordre des Brassicales tout comme les Brassicacées, il aurait pu être attendu que les séquences de *Carica papaya* soient proches des séquences de Brassicacées, mais ce n'est pas le cas dans le groupe I. Enfin, les séquences des Rosacées forment un seul et unique sous-groupe. Les 47 Embryophytes analysées sont toutes représentées par au moins une séquence ERD6-like présente dans le groupe I de l'arbre.

La figure 21 présente le sous-arbre correspondant au groupe IIa de l'arbre phylogénétique. Quatre séquences sur les cinq d'*Amborella trichopoda* (Atr) se trouvent à la base du groupe IIa ainsi que 2 séquences de *Vitis vinifera* (Vv). Ensuite, apparaît un groupe spécifique de séquences de Monocotylédones (groupe monocotylédone 2) clairement positionné à la base d'un groupe comprenant toutes les séquences ERD6-like des Eudicotylédones. Ce groupe d'Eudicotylédones est divisé en 2 sous-groupes monophylétiques bien distincts (sous-groupe IIa1 et IIa2). Dans le sous-groupe IIa1, on retrouve un groupe monophylétique de séquences ERD6-like pour chaque famille d'Eurosidiées, excepté pour les Malpighiales (ordre qui regroupe les Salicacées, Euphorbiacées et Linacées), dont les séquences sont regroupées dans un seul groupe pour l'ordre et non pas divisés en groupe de séquences spécifiques des familles. Les séquences de Brassicacées du sous-groupe IIa1 (4 séquences), sont divisées en 2 groupes monophylétiques séparés. Le premier est très proche d'une séquence de *Carica papaya* (Cp84.183), et forme donc un groupe de séquence de Brassicales (soutenu par une valeur de bootstrap de 94%). A la base de ce groupe monophylétique de séquence de Brassicales, il y a 1 séquence de Malvacées, 2 séquences d'Euphorbiacées et surtout 2 séquences de *Vitis vinifera*, 2 de *Nelumbo nucifera* et 2 d'*Aquilegia caerulea*, des Dicotylédones basales. Le deuxième groupe monophylétique de séquences de Brassicacées appartenant au sous-groupe IIa1 de l'arbre phylogénétique (6 séquences) est également proche d'une séquence de *Carica papaya* (Cp9.137) qui permet de former un groupe monophylétique de séquences ERD6-like de Brassicales (soutenu par une valeur de bootstrap de 65%). Ces séquences sont plus proches des séquences d'autres Eurosidiées du sous-groupe IIa1 que des séquences de Brassicales de l'autre groupe et une séquence de *Nelumbo nucifera* et de *Vitis vinifera* sont retrouvées à la base de ces groupes de séquences d'Eurosidiées. Un groupe de séquences d'Astériidées est également retrouvé dans le sous-groupe IIa1.

Une séquence d'*Acquilegia caerulea* et 2 séquences de *Nelumbo nucifera*, des Dicotylédones basales, sont retrouvées à la base du sous-groupe IIa2. Dans ce sous-groupe, il y a un groupe de séquences d'Astériidées, un groupe de séquences de Malpighiales et un

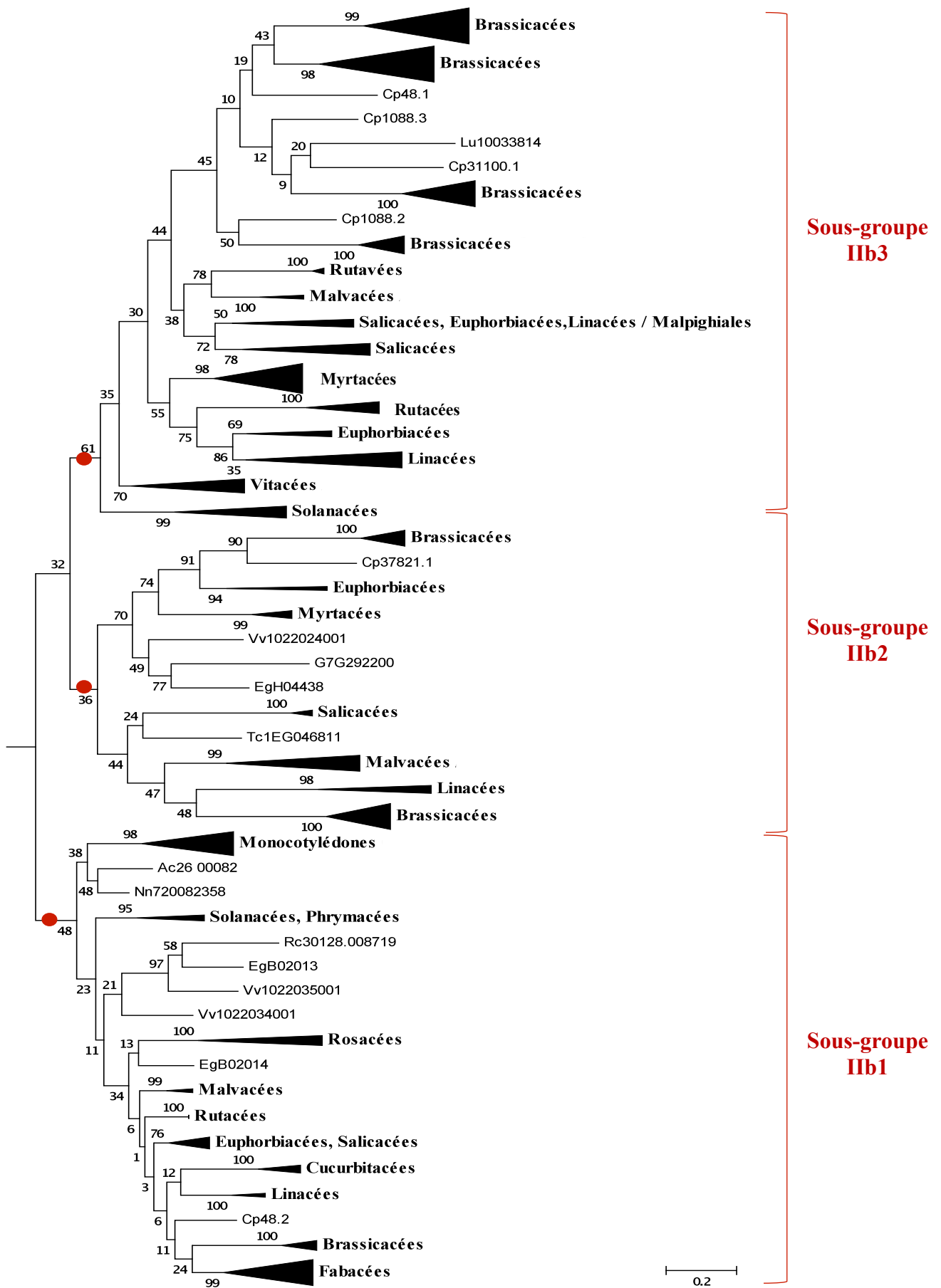


Figure 22 : sous-arbre extrait de l'arbre phylogénétique complet, représentant uniquement le groupe IIb. Les triangles représentent des groupes monophylétiques de séquences ERD6-like appartenant à des espèces de la même famille, du même ordre, ou d'un même groupe botanique. Les chiffres indiquent les valeurs de bootstrap (en %). La distance génétique peut être visualisée par le biais de l'échelle montrée en bas de l'arbre. Les points colorés indiquent la base de chaque sous-groupe monophylétique du groupe IIb (IIb1, IIb2 et IIb3).

groupe de séquences spécifique à chaque famille d'Eurosidées. Seules les Angiospermes sont représentées par au moins une séquence ERD6-like dans le groupe IIa, soit 44 espèces.

Le dernier sous-arbre présenté correspond au groupe IIb de l'arbre phylogénétique qui contient 232 séquences (figure 22). Ce groupe IIb n'est constitué que de séquences appartenant à des Mésangiospermes, ce qui traduit un évènement de duplication chez l'ancêtre commun à toutes les Mésangiospermes.

Le groupe IIb peut être subdivisé en 3 parties (sous-groupe IIb1, IIb2 et IIb3).

Dans le sous-groupe IIb1, un groupe de séquences de Monocotylédones (groupe monocotylédones 3) est retrouvé ainsi qu'une séquence d'*Aquilegia caerulea* et une de *Nelumbo nucifera*. Est également identifié dans le sous-groupe IIb1 un groupe de séquences d'Astéridées. Toutes les séquences d'Eurosidées forment un groupe unique contenant également des séquences de *Vitis vinifera*, une espèce appartenant aux Vitales, un groupe frère des Eurosidées. Parmi les séquences d'Eurosidées, des groupes uniques de séquences des familles (Fabacées, Brassicacées, Linacées, Cucurbitacées, Rutacées, Malvacées, Rosacées) sont identifiés. Le groupe de séquences des Brassicacées est proche d'une séquence de *Carica papaya* (Cp48.2). Deux groupes distincts mais spécifiques de l'ordre des Malpighiales sont également identifiés dans le sous-groupe IIb1, l'un est composé de séquences d'Euphorbiacées et de Salicacées et l'autre des séquences de Linacées.

Dans le sous-groupe IIb2, il y a une seule séquence de *Vitis vinifera*, et aucune séquence de Monocotylédones ni d'Astéridées. Ce sous-groupe de séquences ERD6-like est donc spécifique des Eurosidées. Deux groupes de séquences spécifiques des Brassicacées sont identifiés, l'un ayant à sa base une séquence de *Carica papaya* (Cp37821.1), qui en fait un groupe de séquences spécifique de l'ordre des Brassicales. Dans le sous-groupe IIb2 il y a aussi, un groupe de séquences spécifiques pour les familles Linacées, Malvacées, Salicacées, Myrtacées et Euphorbiacées.

Le sous-groupe IIb3, ne contient pas de séquence de Monocotylédones. Il contient un groupe de séquences spécifique de la famille des Solanacées (3 séquences de *Solanum lycopersicum* et 3 séquences de *Solanum tuberosum*) et un autre spécifique de *Vitis vinifera* contenant uniquement des séquences du chromosome 14 dupliquées en tandem (7 séquences). Ces deux groupes sont à la base d'un groupe d'Eurosidées dans lequel un sous-groupe pour les familles des Linacées, Euphorbiacées, Myrtacées, Malvacées, 2 groupes de séquences spécifiques de la famille des Rutacées et un groupe de séquences spécifique de l'ordre des Malpighiales sont identifiés. Au sein du sous-groupe IIb3, peut également être identifié un

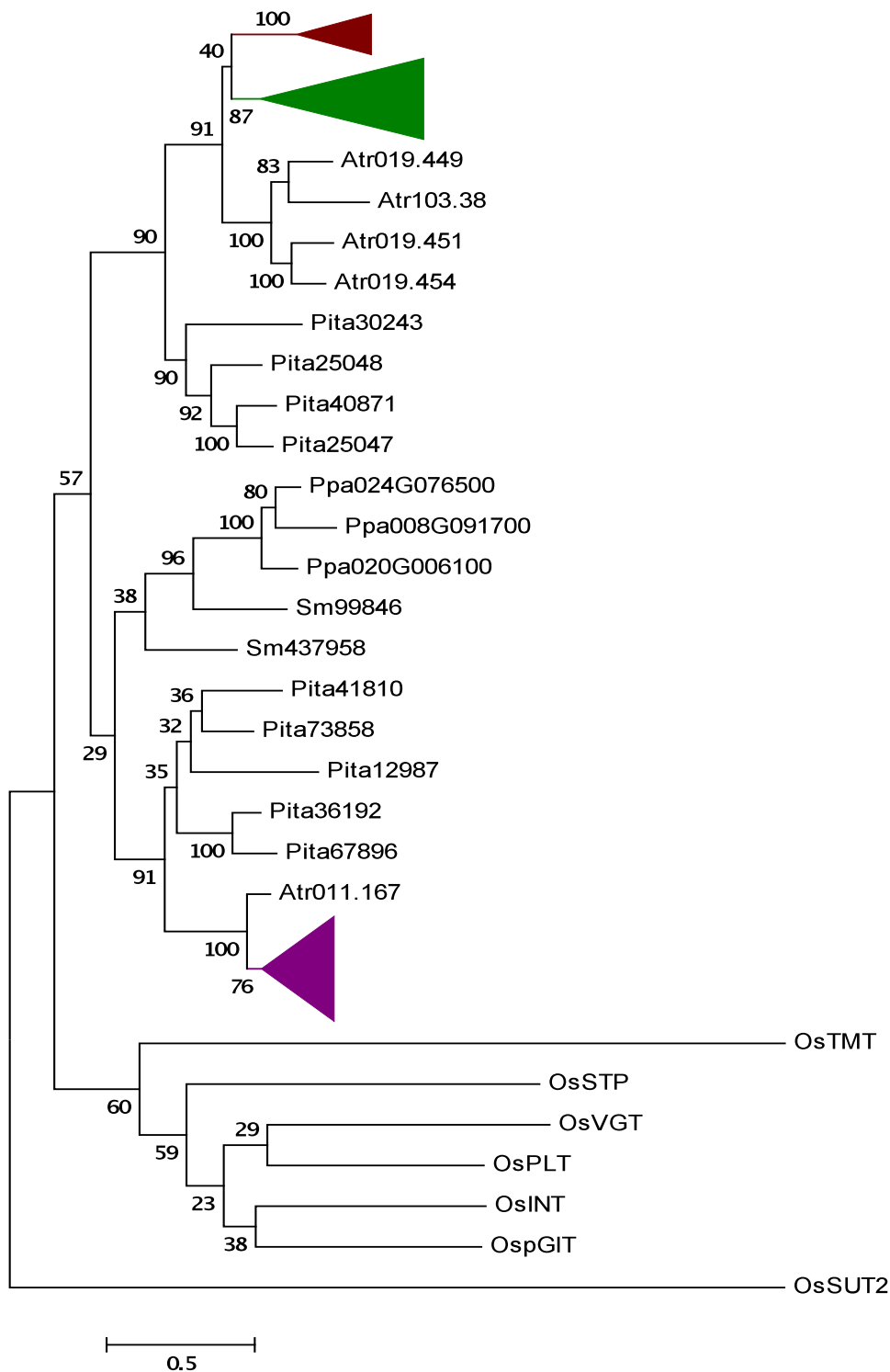


Figure 23 : arbre phylogénétique des séquences protéiques ERD6-like des Monocotylédones. Les séquences des espèces ancestrales *Physcomitrella patens* (Ppa), *Selaginella moellendorffii* (Sm), *Pinus taeda* (Pita) et *Amborella trichopoda* (Atr) sont également incluses dans cet arbre. Violet = groupe I, vert = groupe IIa, rouge = groupe IIb. Les séquences de transporteurs de sucres SUT2 (Sucrose Transporter 2), pGIT (Plastidic Glucose Transporter), INT (Inositol Transporter), PLT (Polyol Transporter), VGT (Vacuolar Glucose Transporter), STP (Sugar Transporter Protein) et TMT (Tonoplastic Monosaccharides Transporter) proviennent du génome du riz (*Oryza sativa*). L'arbre a été effectué avec les mêmes paramètres que l'arbre entier et répété à hauteur de 1000 bootstrap.

grand groupe monophylétique contenant principalement des séquences de Brassicales (61 séquences), et une seule séquence d'une autre espèce (*Linum usitatissimum*). Ce grand groupe a été divisé en 4 sous-groupes monophylétiques spécifiques de séquences de Brassicacées. A la base de ces 4 groupes, 4 séquences de *Carica papaya* (Cp1088.2, Cp31100.1, Cp1088.3 et Cp48.1) permettent de définir 3 groupes spécifiques de séquences de l'ordre des Brassicales.

Dans l'ensemble du groupe IIb, 40 espèces sont représentées par au moins 1 séquence ERD6-like. Les espèces non représentées sont *Physcomitrella patens*, *Selaginella moellendorffii*, *Pinus taeda*, *Amborella trichopoda*, *Spirodela polyrhiza*, *Oryza sativa* et *Genlisea aurea*.

Dans chacun des 3 grands groupes identifiés, il apparaît que les séquences ERD6-like des Monocotylédones, forment un groupe monophylétique parfaitement distinct des groupes des Eudicotylédones. Les valeurs élevées de bootstrap pour les groupes de Monocotylédones des groupes I (89%) et IIb (98%) supportent la cohérence de ces groupes. Dans le but d'étudier plus en détails l'évolution des ERD6-like chez les Monocotylédones, un nouvel arbre des ERD6-like a été construit avec les séquences ERD6-like de toutes les Monocotylédones étudiées, qui appartiennent à 4 ordres : les Alismatales (1 espèce), les Arecales (1 espèce), les Poales (7 espèces) et les Zingibérales (1 espèce). Les séquences de *Physcomitrella patens* (Bryophyte, Ppa), *Selaginella moellendorffii* (Lycophyte, Sm), *Pinus taeda* (Gymnosperme, Pita) et *Amborella trichopoda* (Proto-Angiospermes, Atr) ont été utilisées comme espèces ancestrales. Les séquences des transporteurs de saccharose (OsSUT2) et des autres sous-familles des transporteurs de monosaccharides (OspGIT, OsINT, OsPLT, OsVGT, OsSTP et OsTMT) de riz (*Oryza sativa*, Monocotylédones, Os) ont été utilisées, pour enraciner l'arbre.

L'arbre des Monocotylédones obtenu, confirme la présence des 3 groupes I, IIa et IIb. A la base du groupe I se positionne une séquence d'*Amborella trichopoda*, l'ensemble constitue un groupe d'Angiospermes soutenu par une très forte valeur de Bootstrap (100). Pour les groupes IIa et IIb, les 4 séquences d'*Amborella trichopoda* présentes à la base du groupe IIa dans l'arbre décrit précédemment (figure 21) se positionnent à la base des deux groupes. Cette différence peut être expliquée par le fait que toutes les séquences d'Eudicotylédones ont été supprimées de l'arbre et suggère que les séquences de Monocotylédones des groupes IIa et IIb présentent un peu moins de diversité que les séquences d'Eudicotylédones (figure 23). Cette diversité moindre peut résulter du fait que seulement 4 familles de monocotylédones sont utilisées dans l'analyse et que plus de 68% des séquences appartiennent à la famille des

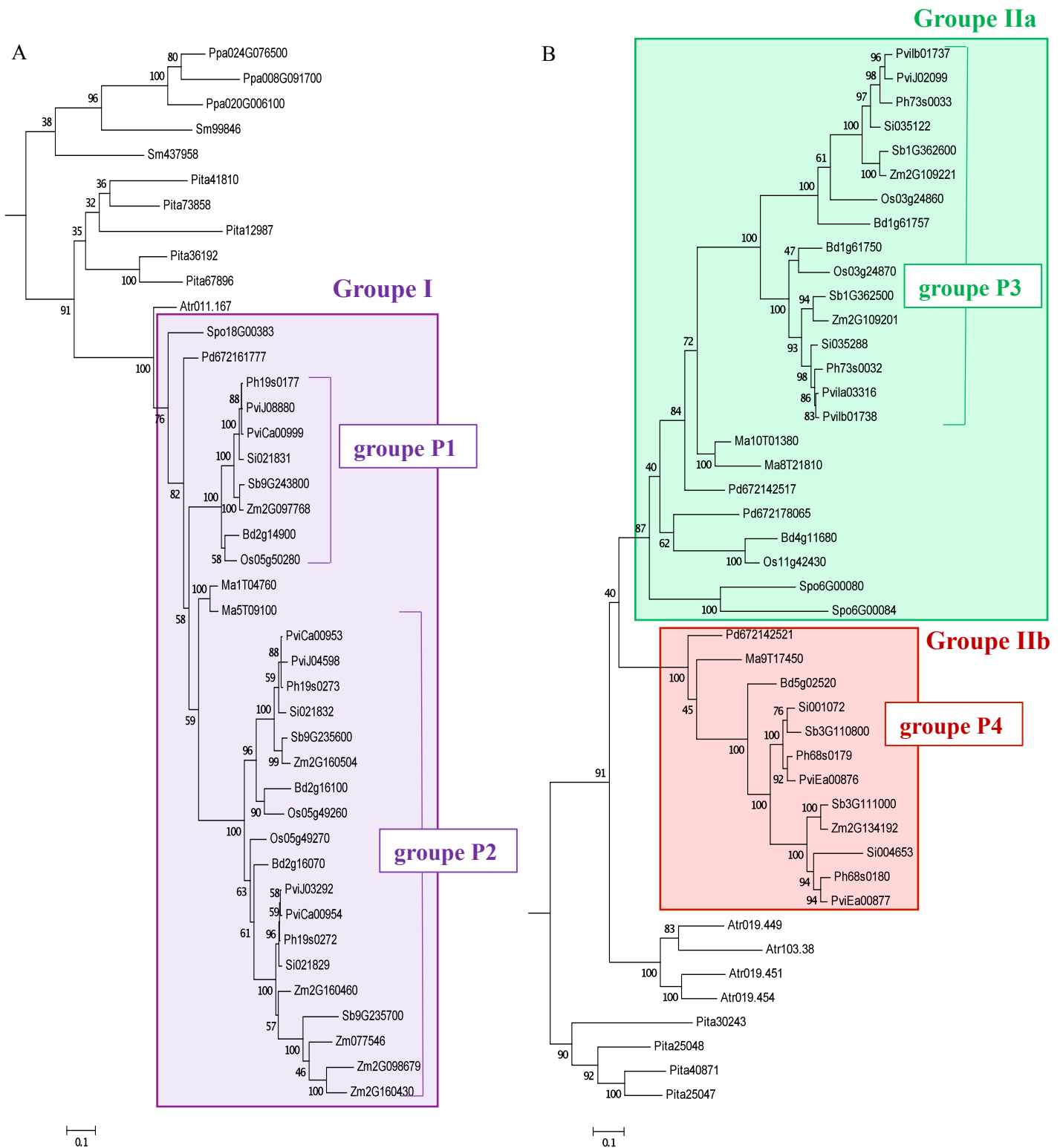


Figure 24 : arbres détaillés des séquences protéiques ERD6-like chez les Monocotylédones. Ces deux arbres sont des extraits de l'arbre entier présenté en figure 7. A : groupe I, l'encart violet comprend les séquences ERD6-like de Monocotylédones du groupe I. B : groupes IIa et IIb, les encarts verts et rouges comprennent respectivement les séquences ERD6-like de Monocotylédones des groupes IIa et IIb. Groupes P1 à P4 : groupes de séquences ERD6-like de Poacées. Les chiffres dans les arbres représentent les valeurs de bootstrap et l'échelle en bas de l'arbre renseigne sur la distance génétique.

Poacées alors que pour les Eudicotylédones 14 familles botaniques ont été utilisées et les deux familles les plus représentées ne constituent que 16 et 20% des séquences.

Dans le groupe I des séquences protéiques ERD6-like de Monocotylédones, 2 groupes spécifiques de séquences de Poacées supportés par des valeurs de bootstrap élevées (100 %) peuvent être identifiés (figure 24 A). Le groupe P1 (pour Poacées 1) est formé par 8 séquences et chaque espèce est représentée par une seule séquence à l'exception de *Panicum virgatum* (Pvi) pour laquelle 2 séquences sont présentes. Le groupe P2 est formé par 19 séquences. Chaque espèce est représentée au moins par 2 séquences se qui forme deux sous-groupes. Deux séquences de *Musa acuminata*, qui appartient à l'ordre des Musacées (Zingibérales) se retrouvent à la base des séquences de Poacées (Poales) du groupe P2. Une séquence de *Spirodela polyrhiza* et une séquence de *Phoenix dactylifera* sont à la base de l'ensemble du groupe I. *Spirodela polyrhiza* fait partie de l'ordre des Alismatales et *Phoenix dactylifera* de l'ordre des Arecales. Dans le groupe I des Monocotylédones, les séquences ERD6-like semblent donc être réparties par ordres botaniques.

Dans le Groupe IIa (figure 24 B) 16 séquences de Poacées forment un groupe (groupe P3) parfaitement soutenu par une forte valeur de bootstrap (100). Chaque espèce est représentée au moins par 2 séquences et deux sous-groupes soutenus par de très fortes valeurs de bootstrap (100%) sont clairement identifiables. A la base du groupe P3, se trouvent 2 séquences de *Musa acuminata* (Musacées, Ma), 2 séquences de *Phoenix dactylifera* (Arécacées, Pd) et 2 séquences de *Spirodela polyrhiza* (Aracées, Spo). Dans le groupe IIa la répartition par ordre botanique semble un peu moins bien respectée que dans le groupe I puisqu'une séquence d'*Oryza sativa* (Os) et 1 séquence de *Brachypodium distachyon* (Bd), qui sont pourtant des Poales, se positionnent à l'extérieur du groupe P3.

Dans le Groupe IIb, 10 séquences de Poacées (figure 24 B) sont regroupées en un seul groupe spécifique (groupe P4), soutenu par une forte valeur de bootstrap (100). A la base de ce groupe, il n'y a plus de séquence de *Spirodela polyrhiza* mais une séquence de *Musa acuminata* et une séquence de *Phoenix dactylifera*. De plus, il est à noter qu'il n'y a pas de séquence d'*Oryza sativa* dans le groupe P4. L'absence, dans le groupe IIb, de séquences pour deux espèces (*S. polyrhiza* et *O. sativa*) permet d'émettre l'hypothèse d'une divergence plus tardive des copies *ERD6-like* formant le groupe IIb de l'arbre phylogénétique. Toutefois, la possibilité que des séquences pour ces deux espèces n'aient pas été identifiées lors de l'analyse Blast ne peut pas être totalement exclue.

En observant en détail l'évolution des ERD6-like chez les Monocotylédones, des groupes spécifiques de familles botaniques peuvent être établis, tout comme chez les Eudicotylédones.

Tableau 8 : bilan du nombre de séquences protéiques de transporteurs de monosaccharides de la famille ERD6-like identifiées chez les Mésangiospermes de chaque Ordre étudié dans les groupes I, IIa et IIb de l'arbre phylogénétique

	Espèce	Nombre d'ERD6-like			IIb1	IIb2	IIb3			
		total	Groupe I	Groupe IIa				Groupe IIb		
Monocotylédones	Alismatales	Spo	3	1	2	0	0	0	0	
	Arécales	Pd	4	1	2	1	0	0	0	
	Poales	Bd	7	3	3	1	1	0	0	
		Os	6	3	3	0	0	0	0	
		Ph	7	3	2	2	2	0	0	
		Pvi	12	6	4	2	2	0	0	
		Si	7	3	2	2	2	0	0	
		Sb	7	3	2	2	2	0	0	
		Zm	9	6	2	1	1	0	0	
		Zingibérales	Ma	5	2	2	1	1	0	0
Total		67	31 (46,3%)	24 (35,8%)	12 (17,9%)	12 (100%)	0	0		
Paléodicotylédones	Renonculales	Ac	7	2 (29%)	4 (57%)	1 (14%)	1	0	0	
Fond d'émergence	Protéales	Nn	8	2 (25%)	5 (63%)	1 (12%)	1			
Groupe frère des Eurosidées	Vitales	Vv	18	2 (11%)	6 (33%)	10 (56%)	2 (20%)	1 (10%)	7 (70%)	
Eufabidées I	Malpighiales	Rc	9	2	3	4	2	0	2	
		Me	14	3	4	7	3	2	2	
		Lu	30	4	10	16	2	3	11	
		Ptr	11	2	3	6	1	1	4	
		Spu	13	3	3	7	1	2	4	
	Total		77	14 (18,2%)	23 (29,9%)	40 (51,9%)	9 (24%)	8 (20%)	23 (56%)	
Eurosidées I	Fabales	Gm	19	6	7	6	6	0	0	
		Pvu	6	1	2	3	2	0	1	
		Mt	10	4	4	2	2	0	0	
		Lj	4	1	2	1	1	0	0	
		Ca	7	3	3	1	1	0	0	
	Total		46	15 (32,6%)	18 (39,1%)	13 (28,3%)	12 (92%)	0	1 (8%)	
	Eufabidées II	Rosales	Md	11	2	5	4	4	0	0
			Ppe	6	1	4	1	1	0	0
		Total		17	3 (17,6%)	9 (52,9%)	5 (29,4%)	5 (100%)	0	0
	Cucurbitales	Cm	7	2	3	2	2	0	0	
Csa		7	2	3	2	2	0	0		
Total			14	4 (28,6%)	6 (42,9%)	4 (28,6%)	4 (100%)	0	0	
Eurosidées II	Myrtales	Eg	37	7 (18,9%)	8 (21,6%)	22 (59,5%)	2 (9%)	4 (18%)	16 (73%)	
	Sapindales	Cc	12	2	4	6	1	0	5	
		Csi	9	2	2	5	1	0	4	
	Total		21	4 (19,1%)	6 (28,6%)	11 (52,4%)	2 (8%)	0	9 (82%)	
	Brassicales	Br	30	5	3	22	1	4	17	
		Ah	14	2	3	9	1	1	7	
		Al	19	2	3	14	1	4	9	
		At	19	2	3	14	1	3	10	
		Cr	17	2	2	13	1	4	8	
		Th	16	2	2	12	0	1	11	
Cp		11	2	3	6	1	1	4		
Total		126	17 (13,5%)	19 (15,1%)	90 (71,4%)	6 (7%)	18 (20%)	66 (73%)		
Malvales	Gr	19	4	6	9	1	7	1		
	Te	10	2	3	5	1	3	1		
Total			6 (20,7%)	9 (31%)	14 (48,3%)	2 (14%)	10 (72%)	2 (14%)		
Astéridées	Lamiales	Ga	6	4	2	0	0	0	0	
		Mg	6	3	2	1	1	0	0	
	Total		12	7 (58,3%)	4 (33,3%)	1 (8,3%)	1 (100%)	0	0	
	Solanales	Sl	10	4	2	4	1	0	3	
St		11	4	3	4	1	0	3		
Total		21	8 (38,1%)	5 (23,8%)	8 (38,1%)	2 (25%)	0	6 (75%)		
TOTAL		500	122 (24,4%)	146 (29,2%)	232 (46,4%)	61 (27%)	41 (18%)	130 (56%)		

En effet, les séquences de Poacées peuvent toutes être réparties dans des groupes monophylétiques spécifiques (P1 à P4). En revanche, les séquences des 3 autres familles de Monocotylédones étudiés se retrouvent toujours à part des groupes de séquences de Poacées. Cependant, un biais à l'observation de groupes spécifiques de chaque famille de Monocotylédones est apporté par le fait que les familles des Aracées, des Arecacées et des Musacées ne sont représentées que par une seule espèce. Pour pouvoir définir de vrais groupes monophylétiques d'ERD6-like spécifiques de chaque famille de Monocotylédones étudiées, il faudrait ajouter à l'étude des génomes d'autres espèces de ces 3 familles. De plus, toutes les Poales étudiées appartiennent à la famille des Poacées. Afin de déterminer si, comme certaines Eudicotylédones (Brassicales, Malpigiales), des groupes monophylétiques spécifiques des ordres de Monocotylédones peuvent être identifiés, il faudrait ajouter des génomes d'autres familles de Poales ou des 3 autres ordres étudiés.

1.3 Analyse de la répartition des ERD6-like dans les 3 groupes de l'arbre phylogénétique

Le tableau 8 récapitule le nombre de séquences par groupe de l'arbre entier pour chaque espèce et chaque ordre de Mésoangiospermes.

Chez les Monocotylédones, sur les 10 espèces représentées (67 séquences ERD6-like), 31 séquences sont retrouvées dans le groupe I, 24 dans le groupe IIa et 12 dans le groupe IIb, représentant respectivement 46,3%, 35,8% et 17,9% des séquences de Monocotylédones. Il y a donc 1,3 fois plus de séquences ERD6-like de Monocotylédones dans le groupe I que dans le groupe IIa et 2,6 fois plus de séquences ERD6-like de Monocotylédones dans le groupe I que dans le groupe IIb. Chez les Lamiales (Astéridées), toutes espèces confondues (12 séquences ERD6-like), le même type de répartition est observé : 7 séquences sont retrouvées dans le groupe I (58,3% des séquences de Lamiales), 4 dans le groupe IIa (33,3%) et 1 dans le groupe IIb (8,3%), soit 1,75 fois plus de séquences dans le groupe I par rapport au groupe IIa et 7 fois plus de séquences dans le groupe I par rapport au groupe IIb. Chez les Monocotylédones et les Lamiales, il y a donc plus de séquences ERD6-like dans le groupe I de l'arbre que dans les 2 autres groupes.

Chez les Solanales (Astéridées), toutes espèces confondues (21 séquences ERD6-like), il y a 8 séquences pour les groupes I et IIb (38,1% des séquences des Solanales chacun) et 5 séquences pour le groupe IIa (23,8%). Il y a 1,6 fois moins de séquences de Solanales dans le

groupe IIa par rapport aux deux autres groupes. En revanche, il y a autant de séquences ERD6-like de dans les groupes I et IIb.

Chez les Fabales, Rosales et les Cucurbitales, le même type de répartition des séquences ERD6-like au sein des 3 groupes de l'arbre est observé. Il y a sensiblement plus de séquences de ces trois ordres dans le groupe IIa. En effet, pour les Fabales (46 séquences), il y a 15 séquences dans le groupe I (32,6%), 18 dans le groupe IIa (39,1%) et 13 dans le groupe IIb (28,3%). Chez les Rosales (17 séquences ERD6-like), il y a au total 3 séquences dans le groupe I (17,6%), 9 dans le groupe IIa (le double, soit 52,9% des séquences de Rosales) et 5 dans le groupe IIb (29,4%). De même, pour les Cucurbitales (14 séquences ERD6-like), il y a 4 séquences dans les groupes I et IIb (28,6%) et 6 séquences dans le groupe IIa (42,9%).

Dans les autres ordres étudiés, il y a une gradation du nombre d'ERD6-like dans chacun des groupes de l'arbre, se traduisant par une augmentation du nombre de séquences du groupe I au groupe IIa et du groupe IIa au groupe IIb. Le nombre de séquences est faible dans le groupe I, intermédiaire dans le groupe IIa et élevé dans le groupe IIb.

Pour *Vitis vinifera*, représentant l'ordre des Vitales, il y a 2 séquences dans le groupe I (11,1%), 6 dans le groupe IIa (33,3%) et 10 dans le groupe IIb (55,6%).

Chez les Malpighiales, toutes espèces confondues (77 séquences) il y a au total 14 séquences ERD6-like dans le groupe I (18,2%), 23 séquences dans le groupe IIa (29,9%) et 40 séquences dans le groupe IIb (51,9%).

Chez *Eucalyptus grandis*, représentant l'ordre des Myrtales, il y a 7 séquences dans le groupe I (18,9%), 8 séquences dans le groupe IIa (21,6%) et 22 séquences dans le groupe IIb (59,5%).

Chez les Sapindales, 4 séquences ERD6-like sont dans le groupe I (19,1%), 6 dans le groupe IIa (28,6%) et 11 dans le groupe IIb (52,4%).

Chez les Brassicales, toutes espèces confondues (126 séquences) il y a 17 séquences au total dans le groupe I (13,5%), 19 dans le groupe IIa (15,1 %) et 90 dans le groupe IIb (71,4%).

Enfin, chez les Malvales, toutes espèces confondues (29 séquences) il y a 6 séquences ERD6-like dans le groupe I (20,7%), 9 dans le groupe IIa (31%) et 14 dans le groupe IIb (48,3%).

Pour les ordres des Myrtales, des Sapindales, des Brassicales et des Malvales, près de la moitié, voire dans le cas des Brassicales près de $\frac{3}{4}$ (71,4%) des séquences protéiques ERD6-like se situent dans le groupe IIb de l'arbre phylogénétique.

Tableau 9 : nombre d'ERD6-like dupliqués en tandem chez les 47 espèces dans le protéome desquelles des séquences ERD6-like ont été identifiés dans cette étude. Les espèces sont indiquées par une abréviation, voir le tableau 1 pour le nom complet de chaque espèce. La présence d'un tiret dans une case signifie qu'il n'y a pas de séquence de l'espèce concernée dans le groupe indiqué.

		Espèce	Nombre d'ERD6-like	Nombre de duplication en tandem (pourcentage)							
				total	Groupe I	Groupe IIa	Groupe IIb	IIB1	IIB2	IIB3	
Bryophytes	Funariales	Ppa	3	0	0	-	-	-	-	-	
Lycophytes	Lycopodiales	Sm	2	0	0	-	-	-	-	-	
Gymnospermes	Pinales	Pita	9	2 (22%)	0	2 (50%)	-	-	-	-	
Proto-Angiospermes	Amborellales	Atr	5	2 (40%)	2 (50%)	0	-	-	-	-	
	Alismatales	Spo	3	2 (66%)	2 (100%)	0	-	-	-	-	
Monocotylédones	Arécales	Pd	4	0	0	0	0	0	-	-	
		Bd	7	5 (71%)	2 (66%)	3 (100%)	0	0	-	-	
	Poales	Os	6	4 (66%)	2 (66%)	2 (66%)	-	-	-	-	
		Ph	7	6 (86%)	2 (66%)	2 (66%)	2 (100%)	2 (100%)	-	-	
		Pvi	12	6 (50%)	2 (33%)	2 (50%)	2 (100%)	2 (100%)	-	-	
		Si	7	3 (43%)	3 (100%)	0	0	0	-	-	
		Sb	7	6 (86%)	2 (66%)	2 (100%)	2 (100%)	2 (100%)	-	-	
		Zm	9	4 (44%)	2 (33%)	2 (100%)	0	0	-	-	
Zingibérales	Ma	5	0	0	0	0	0	0	0		
Paléodicotylédones	Renonculales	Ac	7	4 (57%)	0	3 (75%)	1 (100%)	1 (100%)	-	-	
Fond d'émergence	Protéales	Nn	8	4 (50%)	0	3 (60%)	1 (100%)	1 (100%)	-	-	
Groupe frère des Eurosidées	Vitales	Vv	18	15 (83%)	0	5 (83%)	10 (100%)	2 (20%)	1 (10%)	7 (70%)	
Eufabidées I	Malpighiales	Rc	9	5 (55%)	0	1 (33%)	4 (100%)	2 (50%)	0	2 (50%)	
		Me	14	2 (14%)	0	0	2 (29%)	2 (100%)	0	0	
		Lu	30	20 (66%)	0	6 (60%)	14 (88%)	2 (14%)	2 (14%)	10 (72%)	
		Ptr	11	6 (55%)	0	0	6 (100%)	1 (17%)	1 (17%)	4 (66%)	
Eurosidées I	Eufabidées II	Spu	13	7 (54%)	0	0	7 (100%)	1 (14%)	2 (29%)	4 (57%)	
		Gm	19	12 (63%)	4 (66%)	2 (29%)	6 (100%)	6 (100%)	0	0	
	Fabales	Pvu	6	3 (50%)	0	0	3 (100%)	2 (66%)	0	1 (33%)	
		Mt	10	4 (40%)	2 (66%)	0	2 (100%)	2 (100%)	0	0	
	Cucurbitales	Lj	4	0	0	0	0	0	0	0	
		Ca	7	0	0	0	0	0	0	0	
		Rosales	Md	11	0	0	0	0	0	0	0
			Ppe	6	0	0	0	0	0	0	0
		Cucurbitales	Cm	7	0	0	0	0	0	0	0
			Csa	7	2 (29%)	0	0	2 (100%)	2 (100%)	0	0
Eurosidées II	Myrtales	Eg	37	33 (89%)	4 (57%)	8 (100%)	21 (95%)	2 (10%)	4 (19%)	15 (71%)	
	Sapindales	Cc	12	4 (33%)	0	2 (50%)	2 (33%)	0	0	2 (100%)	
		Csi	9	0	0	0	0	0	0	0	
	Brassicales	Br	30	12 (40%)	0	0	12 (55%)	0	2 (17%)	10 (83%)	
		Ah	14	6 (43%)	0	0	6 (66%)	0	0	6 (100%)	
		Al	19	5 (26%)	0	0	5 (38%)	0	0	5 (100%)	
		At	19	12 (63%)	0	1 (33%)	11 (79%)	0	2 (18%)	9 (82%)	
		Cr	17	5 (29%)	2 (100%)	0	3 (23%)	0	2 (66%)	1 (33%)	
		Th	16	5 (34%)	0	0	5 (42%)	0	1 (20%)	4 (80%)	
		Cp	11	4 (36%)	0	0	4 (66%)	1 (25%)	1 (25%)	2 (50%)	
		Malvales	Gr	19	9 (47%)	0	0	9 (100%)	1 (11%)	7 (78%)	1 (11%)
	Tc		10	5 (50%)	0	0	5 (100%)	1 (20%)	3 (60%)	1 (20%)	
	Astéridées	Lamiales	Ga	6	0	0	0	-	-	-	-
			Mg	6	0	0	0	0	0	0	0
Solanales		Sl	10	3 (30%)	0	0	3 (75%)	1 (33%)	0	2 (66%)	
		St	11	3 (30%)	0	0	3 (75%)	1 (33%)	0	2 (66%)	
TOTAL (pourcentage)			519 (100%)	230 (44%)	31 (23%)	46 (32%)	166 (72%)				

En résumé, il y a beaucoup plus d'ERD6-like dans le groupe I pour les Monocotylédones et les Lamiales, dans le groupe IIa pour les Fabales, les Rosales et les Cucurbitales ainsi que pour les deux Dicotylédones basales (Ac et Nn) et dans le groupe IIb pour les Vitales, les Malpighiales, les Myrtales, les Sapindales, les Brassicales et les Malvales.

En raison du fait que les *ERD6-like* font partie d'une famille multigénique, et que de nombreuses séquences ont été identifiées chez les Angiospermes, des duplications en tandem d'*ERD6-like* telles que celles observées chez *Vitis vinifera* (Afoufa-Bastien et al. 2010), sont attendues pour la plupart des Angiospermes étudiées. Ainsi, il est possible d'émettre l'hypothèse que la répartition hétérogène des séquences ERD6-like, au sein des 3 groupes de l'arbre, observée entre les ordres botaniques (tableau 8) reflète une différence dans la quantité ou la répartition des *ERD6-like* dupliqués en tandem. Ainsi pour vérifier cette hypothèse, nous avons identifié pour chacune des espèces le nombre de gènes dupliqués en tandem et leur répartition dans les 3 groupes phylogénétiques. Pour cette étude, seuls les transcrits pleine longueur ont été utilisés. Parmi les 519 gènes *ERD6-like* identifiés dans le génome des 47 espèces 227 gènes sont dupliqués en tandem. Pour chaque des espèces, le nom des gènes dupliqués en tandem est en caractère gras dans l'annexe 1. Le tableau 9 présente le nombre de gènes dupliqués en tandem pour chacune des 47 espèces et leur répartition dans les différents groupes. Le nombre de séquences *ERD6-like* dupliquées en tandem identifiées, toutes espèces confondues est de :

- i) 31 dans le groupe I, soit 23,30 % des séquences de ce groupe
- ii) 46 dans le groupe IIa soit 29,87 % des séquences de ce groupe
- iii) 150 séquences dans le groupe IIb, soit 64,65 % des séquences de ce groupe

Le groupe IIb étant celui dans lequel le plus de copies dupliquées en tandem sont dénombrées permet d'expliquer le fait qu'il soit aussi celui qui contient globalement le plus d'ERD6-like (232 séquences).

Chez les 2 espèces les plus anciennes, *Physcomitrella patens* et *Selaginella moellendorffii*, il n'y a pas de duplication en tandem d'*ERD6-like*.

Chez la Gymnosperme *Pinus taeda*, 2 séquences *ERD6-like* sont dupliquées en tandem dans le groupe IIa.

Chez la Proto-Angiosperme *Amborella trichopoda*, 2 ERD6-like sont dupliqués en tandem dans le groupe I.

Chez les Monocotylédones, il n'y a pas d'ERD6-like dupliqués en tandem chez les Arécales et les Zingibérales, toutefois, ces ordres sont représentés par une seule espèce

(respectivement *Phoenix dactylifera* et *Musa acuminata*). Chez les Alismatales, représentées par *Spirodela polyrhiza*, les 2 *ERD6-like* du groupe I sont dupliqués en tandem. Chez les Poales, pour chacune des 7 espèces de l'ordre étudiées, il y a des *ERD6-like* dupliqués en tandem dans les groupes I et IIa. Seulement trois Poales (*Panicum hallii* Ph, *Panicum virgatum* Pvi et *Sorghum bicolor* Sb) possèdent aussi des *ERD6-like* dupliqués en tandem dont les séquences se situent dans le groupe IIb. Ainsi chez les Poales, toutes les espèces ont des *ERD6-like* dupliqués en tandem dans les groupes I et IIa, représentant entre 33% et 100% des séquences de ce groupe, selon l'espèce considérée, tandis que seules 3 espèces sur 7 ont des *ERD6-like* dupliqués en tandem appartenant au groupe IIb et représentant 100% des séquences de ce groupe, pour chacune de ces 3 espèces.

Pour les Dicotylédones, des résultats très différents sont observés, tant chez les Paléodicotylédones que chez les Eudicotylédones : sur 33 Dicotylédones étudiées, seules 4 espèces ont des *ERD6-like* dupliqués en tandem dans le groupe I. Ces espèces sont *Glycine max*, *Medicago truncatula* (Fabales), *Eucalyptus grandis* (Myrtale) et *Capsella rubella* (Brassicale). Il y a 2 à 4 *ERD6-like* dupliqués en tandem par espèce, ce qui représente entre 57% et 100% des séquences de ce groupe, selon l'espèce. Dans le groupe IIa, les duplications en tandem ne sont retrouvées que dans 9 espèces et il y a entre 1 et 8 gènes dupliqués en tandem, cela représente 33 à 100% des séquences de ce groupe, selon les espèces. Dans le groupe IIb, les duplications en tandem sont observées pour 25 espèces soit 78% des espèces étudiées. Il y a entre 1 et 14 gènes dupliqués selon les espèces. Chez *Aquilegia coerulea* (Renonculales-Paléodicotylédones) et *Nelumbo nucifera* (Protéales appartenant au fond d'émergence des Eudicotylédones) le nombre de séquences (respectivement 4 et 5) et le nombre de duplications (3 pour les deux espèces) sont plus importants dans le groupe IIa que dans le groupe IIb. A l'inverse, pour *Vitis vinifera* et pour toutes les Eudicotylédones, pour lesquelles des duplications en tandem ont été identifiées (Vitales, Malpigiales, Fabales, Cucurbitales, Myrtales, Sapindales, Brassicales, Malvales et Solanales), le nombre de gènes dupliqués en tandem est toujours beaucoup plus élevé dans le groupe IIb que dans les deux autres groupes, à l'exception de *Citrus clementina*, espèce pour laquelle il est équivalent. Enfin, il n'a pas été possible d'identifier des duplications en tandem pour les Rosales, les Lamiales et certaines espèces appartenant aux Fabales et aux Cucurbitales.

Sur la base des observations précédentes (tableau 8 et tableau 9), il est donc possible d'établir un lien, comme suggéré précédemment, entre la répartition des séquences *ERD6-like* par groupe et la répartition des *ERD6-like* dupliqués en tandem, du moins pour certains

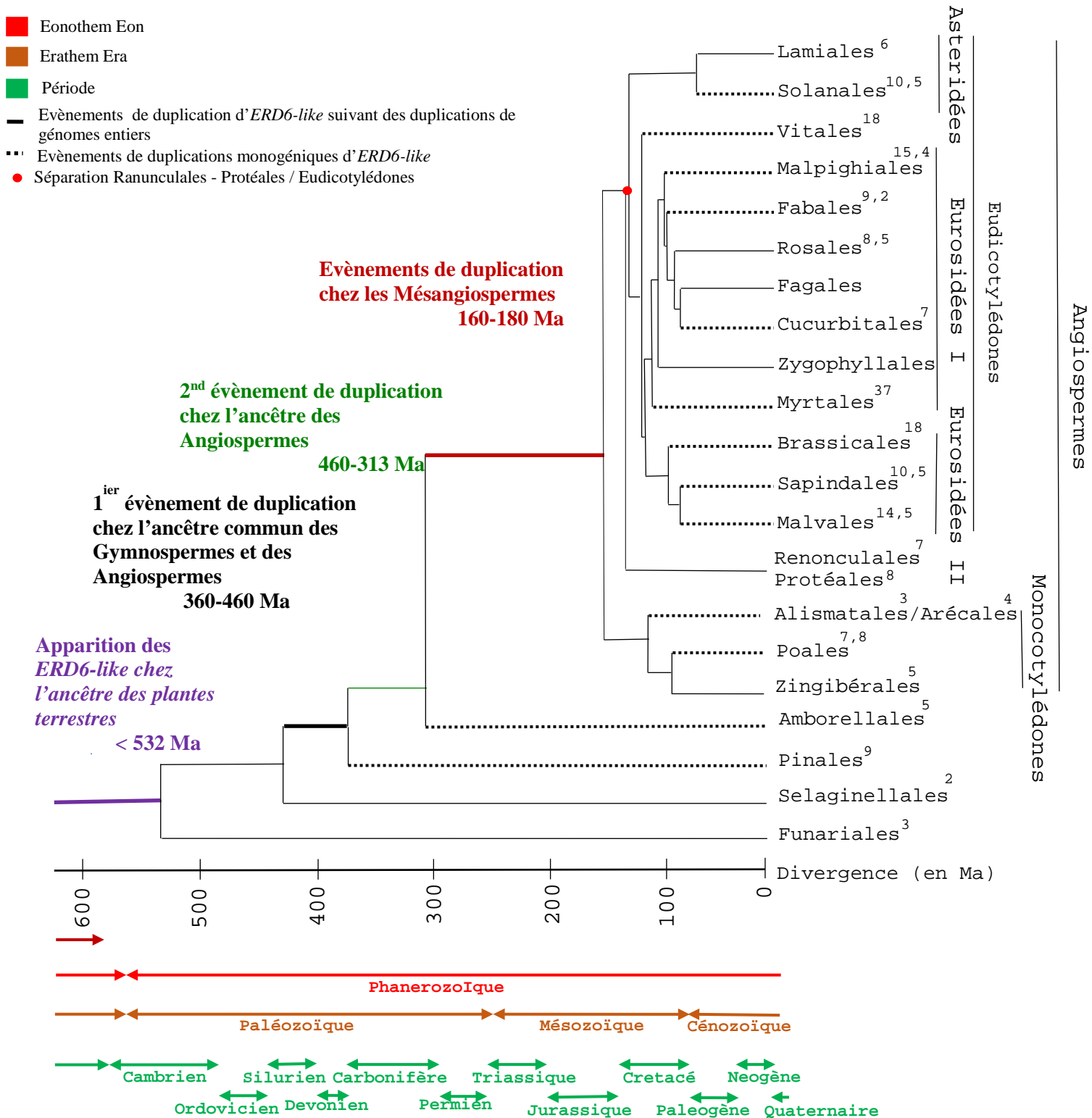


Figure 25 : Inférence de l'évolution des gènes ERD6-like dans le Règne Végétal

Toutes les flèches ou lignes sont à la même échelle à l'exception de la flèche représentant le Quaternaire qui a été grossie dans le but d'être perçue. Sur l'échelle de temps géologique, une ligne terminée par deux flèches représente une période géologique finie. Lorsque l'échelle de temps n'inclut pas le début ou la fin d'une période, alors une seule flèche est représentée. L'ordre des Fagales et des Zygophyllales n'est pas représenté dans l'étude phylogénétique mais sont inclus dans cet arbre pour prendre en compte la vision actuelle de l'Evolution des Plantes. Les nombres à côté de chaque Ordre correspondent à la moyenne des ERD6-like identifiés dans ces Ordres.

groupes botaniques. En résumé, chez les Monocotylédones, il y a plus d'ERD6-like dans le groupe I, et l'on y retrouve également plus d'*ERD6-like* dupliqués en tandem. Chez les Eudicotylédones, dans les ordres des Vitales, Malpighiales, Myrtales, Sapindales, Brassicales et Malvales il y a beaucoup plus d'ERD6-like dans le groupe IIb dans lequel est observé le plus fort pourcentage d'*ERD6-like* dupliqués en tandem. A l'inverse, la corrélation entre la présence de duplication et le nombre de séquences dans un groupe n'est pas retrouvé pour les Fabales, Rosales et Cucurbitales. Pour ces trois ordres, qui appartiennent aux groupes monophylétiques des Eufabidées II, il y a plus de séquences dans le groupe IIa alors qu'il est retrouvé plus de duplications en tandem dans le groupe IIb. L'absence de corrélation peut être liée au fait qu'il n'a pas été identifié de duplications dans plus de la moitié des espèces. Cette observation peut suggérer soit que les duplications en tandem n'ont pas été fortement à l'origine de l'évolution des gènes *ERD6-like* du groupe des Eufabidées soit que les copies dupliquées n'ont pas été conservées au cours de l'évolution de ce groupe. Chez les Astéridées (Lamiales, Solanales), il n'a été possible d'identifier des duplications en tandem que chez les Solanales alors que les deux ordres constituent des groupes proches. Cette observation est à mettre en parallèle du fait que le nombre de gènes est plus important dans le groupe I pour les lamiales qui n'ont pas de duplications alors que chez les Solanales, toutes les duplications sont retrouvées dans le groupe IIb qui contient le même nombre de séquences que le groupe I. Ces observations suggèrent que dans le groupe des Astéridées, les duplications en tandem auraient pu jouer un rôle dans l'évolution des gènes *ERD6-like* principalement dans l'ordre des Solanales mais pas dans l'ordre des Lamiales.

1.4 Histoire évolutive des *ERD6-like* chez les espèces étudiées

Sur la base de l'analyse phylogénétique décrite ci-dessus, l'histoire évolutive des gènes *ERD6-like* a pu être inférée sur l'arbre de l'évolution des plantes simplifié et présenté dans la figure 17. Grâce aux données issues d'études classiques et moléculaires d'organismes et de leurs génomes, une phylogénie moderne de tous les organismes vivants, dont les plantes, est disponible depuis 2013 (Hedges et al. 2006; Kumar and Hedges 2011; Hedges et al. 2015) dans la base de données en ligne « Time Tree Of Life ». L'étude de cette classification a permis de proposer une réconciliation des deux arbres (arbres des séquences *ERD6-like* et arbre d'évolution des plantes) en intégrant une échelle de temps géologique (figure 25). Aucun *ERD6-like* n'a été identifié dans 11 génomes d'algues. Cet argument a été

prépondérant dans la conclusion de l'apparition des *ERD6-like* chez l'ancêtre des plantes terrestres (Embryophytes). Les analyses phylogénétiques ont permis d'identifier trois grands groupes de séquences ERD6-like. Toutes les séquences des 2 espèces ayant divergé le plus tôt dans l'histoire de l'évolution des plantes terrestres (Bryophytes, Ptéridophytes), c'est à dire *Physcomitrella patens* et *Selaginella moellendorffii*, sont retrouvées dans le groupe I. Cette observation suggère que les séquences des 58 espèces contenues dans ce groupe, pourraient dériver des premières copies apparues chez l'ancêtre des plantes terrestres. La divergence des Funariales, faisant partie des Bryophytes a eu lieu il y a environ 532 Ma et pourrait simplement signifier que les *ERD6-like* seraient apparus il y a au moins 532 Ma. La moitié des séquences ERD6-like de la Gymnosperme *Pinus taeda*, est retrouvée dans le groupe I et l'autre moitié, à la base du groupe II. De plus, une seule séquence d'*Amborella trichopoda*, une Proto-Angiosperme, est située dans le groupe I alors que les 4 autres sont retrouvées à la base du groupe IIa qui contient des séquences de toutes les espèces d'Angiospermes. Ces observations suggèrent un premier événement de duplication chez l'ancêtre commun des Gymnospermes (Pinales) et des Angiospermes (Amborellales), qui aurait mené à l'apparition de nouvelles copies *ERD6-like* dans les génomes des Pinales et des Angiospermes (groupe IIa). Ceci pourrait éventuellement être dû à un événement de duplication de génomes entiers puisque des copies issues de cet événement sont retrouvées dans chaque génome d'Angiosperme étudié. Les Gymnospermes, apparus dans la période du Carbonifère (il y a entre 460 et 360 Ma), représentés dans cette étude par les Pinales, ayant divergé des Selaginellales il y a environ 431 Ma, possèdent les copies issues des copies *ERD6-like* ancestrales mais aussi de nouvelles copies *ERD6-like*, probablement issues d'un événement de duplication ayant eu lieu avant le Carbonifère, dans la période de 100 Ma entre 360 et 460 Ma. C'est le temps écoulé entre la divergence des Lycophytes et des Gymnospermes. Cette duplication aurait pu se faire soit à la fin de l'Ordovicien, soit durant le Silurien ou le Dévonien, soit au tout début de la période du Carbonifère, période pendant laquelle de nombreuses Gymnospermes ont divergé. La présence de 4 séquences d'*Amborella trichopoda* dans le groupe IIa et l'absence de séquence de cette espèce dans le groupe IIb suggère un deuxième événement de duplication chez l'ancêtre des Angiospermes, qui aurait conduit à l'apparition de nouvelles copies d'*ERD6-like* dans les génomes des plantes à fleurs (groupe IIa). Le groupe IIb lui, serait spécifique de certaines Mésangiospermes et marque la survenue d'évènements de duplications spécifiques de certaines Mésangiospermes. Il est divisé en trois sous-groupes, l'un contenant des séquences de Monocotylédones, d'*Aquilegia caerulea* et de *Nelumbo nucifera* (deux Paléodicotylédones) alors que les 2 autres en sont dépourvus

Tableau 10 : structure introns/exons (en nombre d'exons) des *ERD6-like* identifiés chez les espèces considérées comme ancestrales par rapport aux Mésangiospermes.

Nombre d'exons identifiés pour les gènes des espèces à la base du groupe I

	Nombre d'ERD6-like	Nombre d'exons					
		14	15	16	17	18	19
<i>Physcomitrella patens</i>	3	-	-	-	-	Ppa3c24 ppa3c8 Ppa3c20	-
<i>Selaginelle moellendorffii</i>	2	-	Sm437958	-	Sm99846	-	-
<i>Pinus taeda</i>	5	-	Pita12987 Pita73858	Pita36192 Pita67896	-	Pita41810	-
<i>Amborella trichopoda</i>	1	-	-	-	-	Atr011.177	-

Nombre d'exons identifiés pour les gènes des espèces à la base du groupe II

	Nombre d'ERD6-like	Nombre d'exons					
		14	15	16	17	18	19
<i>Pinus taeda</i>	4	Pita30243	-	Pita40871	-	Pita5048	Pita25047

Nombre d'exons identifiés pour les gènes des espèces à la base du groupe IIa

	Nombre d'ERD6-like	Nombre d'exons					
		14	15	16	17	18	19
<i>Amborella trichopoda</i>	4	Atr019.454	-	-	-	Atr019.449 Atr103.38 Atr019.451	-

puisqu'ils ne contiennent que des séquences de Vitales, Eurosidées et Astéridées. Cette observation suggère un ou des événements de duplication chez les Vitales, les Eurosidées et les Astéridées ou chez leur ancêtre commun. Cet événement pourrait correspondre à l'événement d'hexaploïdisation γ mis en évidence chez les Eurosidées (Jiao et al., 2012). Enfin, l'expansion du nombre d'ERD6-like dans les génomes d'Angiospermes plus particulièrement chez les Eudicotylédones peut être associé à la période du Crétacé, durant laquelle de nombreuses Eudicotylédones ont divergé (Wikström et al. 2001).

1.5 Analyse des structures des gènes codant pour les transporteurs ERD6-like

Dans le but d'identifier des spécificités structurales ou fonctionnelles pour les séquences des ERD6-like constituant les trois grands groupes de l'arbre phylogénétique, la modélisation de la structure des gènes *ERD6-like* correspondant aux 519 protéines identifiées a été effectuée. Cette analyse a donné lieu à 2 stages d'étudiants de 3^e année de Licence. Mathilde Aimé et Armand Vergnault ont ainsi participé à la modélisation des structures introns/exons des gènes codant pour les 519 transporteurs de monosaccharides de la famille ERD6-like à l'aide du logiciel en ligne GSDS v2.0 (Gene Structure Display Server version 2.0). Pour cela, les séquences CDS et génomiques correspondant aux protéines ERD6-like identifiées pour chaque espèce étudiée ont été collectées. C'est en alignant ces deux types de séquences pour un même *ERD6-like* que le logiciel GSDS modélise la structure du gène. Ce travail a permis d'obtenir la modélisation des 519 séquences *ERD6-like* identifiées, qui ont été modélisées de deux façons différentes :

- une même échelle a été utilisée pour les introns et les exons. Les introns et les exons sont représentés selon leur taille réelle (en paires de bases).
- une même échelle a été utilisée pour tous les exons mais tous les introns ont été représentés avec la même taille. Ceci a facilité l'identification de « blocs » d'exons de même taille.

Seule l'espèce *Lotus japonicus* n'a pas été incluse dans l'analyse des structures géniques parce qu'il a été impossible au moment de l'étude de récupérer les séquences CDS sur le site du génome du Lotier. Ainsi, l'analyse des structures concerne 46 espèces et 515 séquences *ERD6-like*. Le tableau 10 donne le nombre d'exons des gènes *ERD6-like* des

Tableau 11 : nombre d'exons dans les séquences ERD6-like du groupe I, chez les Mésangiospermes. En orange, les séquences de Brassicales et en bleu, les séquences de Monocotylédones. La séquence de *Lotus japonicus Lj0283.110* n'a pas été incluse dans l'analyse.

Groupe I			
Nombre d'exons	Nombre de gènes	% de séquences dans le groupe	Nombre de séquences par espèces
19	4	3,31	4 espèces : Eg, Gr, St, Tc
18	56	46,28	27 espèces : 2Ac, 2Ca, Cc, 2Cm, Cp (Caricacées, Brassicale, Eurosidées II) , 2Csa, 2Csi, 4Eg, Ga, 6Gm, 3Gr, 2Lu, Md, 3Me, 2Mg, 2Mt, 2Nn, Ppe, Ptr, Pvu, 2Rc, Spo (Alismatale, Monocotylédones) , 3Spu, 4Sl, 2St, Tc, 2Vv
17	50	41,32	20 espèces : 2Ah, 2Al, 2At, 5 Br, 2 Cr, 2 Th (Brassicacées, Brassicales, Eurosidées II) , Ca, Ga, 2Lu, Mg, 2Mt, 2 Ma (Zingibérales, Monocotylédones) , Pd, 3Bd, 3Os, 3Ph, 4Pvi, 3 Sb, 3 Si, 6 Zm (Arecales et Poales, Monocotylédones)
16	6	4,96	6 espèces : Cp , St, Eg, Md, Ptr Pvi ,
15	1	0,83	1 espèce : Cc
14	2	1,65	2 espèces : Ga, Pvi
13	1	0,83	1 espèce : Eg
12	1	0,83	1 espèce : Ga
Total	121	100	42 espèces

espèces ancestrales de l'étude : *Physcomitrella patens*, *Selaginella moellendorffii*, *Pinus taeda* et *Amborella trichopoda*.

Chez la Bryophyte (*P. patens*), les 3 séquences identifiées contiennent 18 exons.

Chez la Lycophyte (*S. moellendorffii*), une séquence contient 15 exons, l'autre en contient 17.

Chez la Gymnosperme (*P. taeda*), dans le groupe I de l'arbre phylogénétique 2 séquences contiennent 15 exons, 2 autres 16 exons et 1 seule séquence contient 18 exons. Dans le Groupe II de l'arbre phylogénétique, chacune des 4 séquences de *P. taeda* contiennent respectivement 14, 16, 18 et 19 exons.

Pour la Proto-Angiosperme (*A. trichopoda*), dans le groupe IIa, 1 séquence contient 14 exons et les 3 autres séquences en contiennent 18.

Il est difficile de déterminer parmi ces quatre espèces s'il existe une ou des structures ancestrales. Néanmoins, la structure à 18 exons est la plus fréquente (8 des 18 séquences soit 44,5%), elle est retrouvée chez la Bryophyte *P. patens* (Ppa), chez la Gymnosperme *P. taeda* (Pita) et chez la Proto-Angiosperme *A. trichopoda* (Atr).

Ces observations nous permettent d'émettre les hypothèses suivantes :

- i) les structures dont le nombre d'exons est inférieure à 18 pourraient dériver des structures à 18 exons retrouvées chez Ppa, Pita et Atr, par délétions d'introns et fusions d'exons
- ii) il est possible que les CDS aient été plus ou moins bien annotés, d'où des structures incomplètes

Le tableau 11 rend compte du détail des structures obtenues à l'aide du logiciel GSDS pour toutes les séquences ERD6-like du groupe I de l'arbre phylogénétique, chez les Mésangiospermes. Des structures formées de 19 à 12 exons sont trouvées. Les structures à 18 et 17 exons sont les plus représentées (87,6 % du total des séquences du groupe I) avec une majorité de structure à 18 exons (46,3% du total des séquences du groupe I). Les structures à 18 exons concernent 56 gènes sur les 121 ERD6-like identifiées chez les Mésangiospermes du groupe I et appartiennent à 27 Mésangiospermes sur un total de 42. Les structures à 17 exons sont également bien représentées avec 50 séquences (41,3% du total des séquences du groupe I) répartie chez 20 Mésangiospermes.

Un résultat marquant est que toutes les séquences de Brassicacées du groupe I (15 séquences) ont une structure à 17 exons. Par contre chez la Caricacée (*Carica papaya* - Cp), qui appartient, comme les Brassicacées à l'ordre de Brassicales une séquence à 18 exons et

Tableau 12 : nombre d'exons dans les séquences ERD6-like du groupe II, chez les Mésangiospermes. En orange, les séquences de Brassicales et en bleu, les séquences de Monocotylédones.

Groupe IIa			
Nombre d'exons	Nombre de gènes	% du nombre de séquences dans le groupe	Nombre par espèces
35	1	0,69	1 espèce : Md
31	1	0,69	1 espèce : Md
24	1	0,69	1 espèce : Lu
20	2	1,39	2 espèces : Gm, Vv
19	2	1,39	2 espèces : Rc, Vv
18	72	50,00	30 espèces : 3Ac, 3Ca, Cm, 2Cp (Caricacées, Brassicales, Eurosidées II), 3Csa, 3Eg, 5Gm, 4Gr, 2Me, Mg, 4Mt, 2Nn, 4Ppe, 3Ptr, 2Pvu, Rc, Pd (Arécales), 2Bd, 2Ma 2Os, 2Ph, 3Pvi, 2Sb, 2Si, Zm (Monocotylédones), Sl, St, 3Spu, 3Tc, 4Vv,
17	23	15,97	17 espèces : 2Ah, 2Al, At, 2 Br, Cp, Cr, Th (Brassicacées, Eurosidées II), 2Cc, Csi, Gr, 2Md, Me, Mg, 2Nn, Bd, Os, Zm (Poales, Monocotylédones)
16	15	10,42	13 espèces : Al, 2At, Br, Cr, Th (Brassicacées, Brassicales, Eurosidées II), Cc, Eg, Ga, Gr, Lu, Rc, Sl, 2St
15	8	5,56	7 espèces : Ac, 2Lu, Md, Me, Nn, Pd, Pvi
14	4	2,78	3 espèces : Gm, 2Lu, Spo
13	3	2,08	3 espèces : Csi, Lu, Spo
12	4	2,78	2 espèces : 2Eg, 2Lu
11	3	2,08	3 espèces : Cc, Cm, Eg
10	3	2,08	3 espèces : Eg, Ga Lu
9	1	0,69	1 espèce : Cm
6	1	0,69	1 espèce : Ah
Total	144	100	42 espèces
Groupe IIb			
Nombre d'exons	Nombre de gènes	% du nombre de séquences dans le groupe	Nombre par espèces
19	6	2,2	6 espèces : Eg, Md, Gm, Lu, Ph, Vv
18	122	54,5	34 espèces : Ac, 3Ah, 8Al, 9At, 10Br, 2Cp, 8Cr, 6Th (Brassicacées, Eurosidées II), Bd, Ma, Ph, 2Pvi, Sb, Si (Monocotylédones) Ca, 3Cc, Csi, Csa, 10Eg, 3Gm, 6Gr, 4Me, Md, Mg, Mt, Ppe, 6Ptr, 3Pvu, 4Rc, 3Sl, 5Spu, 3St, 4Tc, 7Vv
17	52	22,5	19 espèces : 5Ah, 6Al, 4At, 12Br, 2Cr, Cp, 5Th (Brassicacées, Eurosidées II), Pd, Si (Monocotylédones), Cc, Cm, Csa, 4Eg, Gm, 3Lu, Mt, St, Spu, Vv
16	21	7,8	11 espèces : Ah, Cr, Th (Brassicacées, Brassicales, Eurosidées II), Cc, 5Eg, Gr, 6Lu, Me, 2Md, Nn, Sl
15	5	2,2	4 espèces : Cc, 2Lu, Me, Tc
14	5	2,6	4 espèces : Csi, 2Gr, Lu, Sb
13	5	2,2	5 espèces : At, Cr, Eg, Gm, Lu
12	6	2,2	5 espèces : 2Csi, Eg, Lu, Me, Spu
11	3	1,7	3 espèces : Cr, Csi, Vv
10	2	0,9	1 espèce : 2Cp
9	1	0,4	1 espèce : Cp
8	3	1,3	3 espèces : Cm, Lu, Zm
Total	231	100	39 espèces

une séquence à 16 exons ont été identifiées. De la même manière, chez les Monocotylédones, presque toutes les Poales présentent des séquences à 17 exons (25 séquences/27 au total), les deux autres séquences étant respectivement à 16 et 14 exons. L'Arécale *Phoenix dactylifera* (Pd) présente 1 séquence à 17 exons et la Zingibérale *Musa acuminata* (Ma) 2 séquences à 17 exons. Seule *Spirodela polyrhiza* (Spo, Alismatale) a une séquence ERD6-like à 18 exons.

Dans le groupe I de l'arbre phylogénétique, la répartition (en pourcentage) des séquences *ERD6-like* en fonction du nombre d'exons qui les constitue, permet d'émettre l'hypothèse de l'existence de deux grands types de structures introns/exons : une structure à 18 exons (46,3%) et une structure à 17 exons (41,3%). En effet, seul 12,4 % de la totalité des séquences (15 séquences/121) de ce groupe présentent des structures différentes : 19, 16, 15, 14, 13 ou 12 exons. Ces structures minoritaires peuvent être des structures incomplètes ou erronées, ou alors des structures d'exception qui ne concerneraient qu'un faible nombre d'*ERD6-like*.

Le tableau 12 rend compte du détail des structures obtenues à l'aide du logiciel GSDS pour les séquences de Mésangiospermes du groupe II de l'arbre phylogénétique.

Dans le groupe IIa, la structure à 18 exons reste largement majoritaire, avec 72 séquences sur les 144 identifiées chez les Mésangiospermes (soit 50,0% des structures) ; ces structures concernent 30 espèces sur les 42 Mésangiospermes. Pour les Monocotylédones, 17 séquences sur 24 ont une structure à 18 exons. En revanche, aucune séquence de *Spirodela polyrhiza* (Spo, Alismatale) n'a 18 exons. Chez les Brassicales, seule *Carica papaya* (Cp, Caricacées) possède 2 séquences *ERD6-like* à 18 exons. La structure à 17 exons est comme dans le groupe I bien représentée, avec 16,0 % des structures totales (23 séquences/144). Elle est retrouvée pour 17 espèces de Mésangiospermes sur les 42 étudiées, dont toutes les Brassicales y compris certaines séquences de *Carica papaya*, (Cp, Caricacées) et dans seulement trois espèces de monocotylédones : *Brachypodium distachyon* (Bd), *Zea mays* (Zm) et *Oryza sativa* (Os), ce qui diffère par rapport à la répartition dans le groupe I. La structure à 16 exons est identifiée pour 10,4 % des structures totales (15 séquences/144). Treize espèces ont des gènes *ERD6-like* dont les structures géniques contiennent 16 exons et sur ces 13 espèces, 5 sont des Brassicacées. Le fait que le pourcentage de cette catégorie soit proche de celui de la catégorie « 17 exons » suggère que ces structures à 16 exons pourraient aussi être représentatives d'un type de structure intron/exon particulier plutôt que d'une erreur d'annotation ou d'une singularité. Les autres séquences (34 séquences/144) de ce groupe

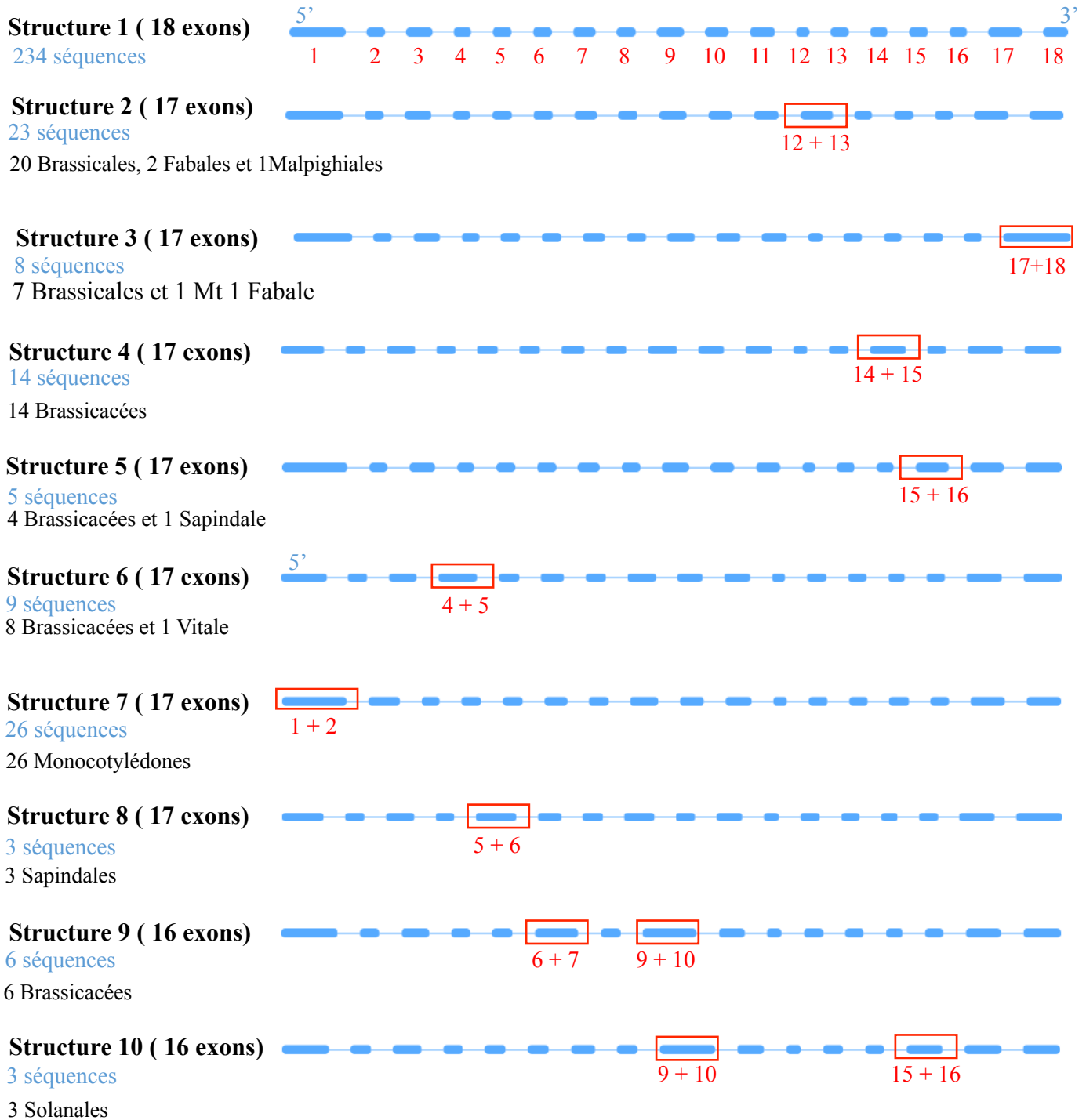


Figure 26 : les 10 types de structures introns/exons des *ERD6-like* identifiés chez 46 espèces. Les rectangles bleus matérialisent les exons et les lignes les introns. Les chiffres rouges désignent le numéro du ou des exons concernés, numérotés en partant du côté 5' du gène. Les exons sont tous dessinés à la même échelle, la longueur des introns est fixe, elle ne prend pas en compte la taille réelle. Pour chaque structure, le nombre total de séquences concernées est indiqué sous le nom donné au type de structure. Un type de structure est défini par au moins 2 séquences ERD6-like et au moins 2 espèces différentes. Sur ce schéma, la taille des gènes n'est pas représentée, seules les structures sont analysées et comparées.

présentent des structures autres plus diversifiées que dans le groupe I (structures à 35, 31, 24, 20, 19, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9 et 6 exons).

Dans le groupe IIb de l'arbre phylogénétique, la structure à 18 exons reste majoritaire, avec 54,5% du total des structures correspondant à 34 espèces de Mésangiospermes sur les 39 présentes dans ce groupe. Cette structure à 18 exons est retrouvée chez toutes les Brassicales et non plus uniquement chez *Carica papaya* (Cp) comme dans les groupes I et IIa. Ainsi, toutes les Brassicales ont des séquences à 18 exons en plus de séquences à 17 exons. De plus, dans ce groupe IIb, une majorité des espèces (87,2% contre 73,8 % et 64,3% pour les groupes IIa et I, respectivement) ont des séquences *ERD6-like* à 18 exons. La structure à 17 exons est également bien représentée avec 21,6% des séquences totales et concerne 18 espèces. Les séquences à 16 exons représentent 7,8% du total des structures et concerne 11 espèces.

Grâce à ces observations, un modèle a été établi et proposé dans la figure 26. La structure à 18 exons (structure 1) qui est retrouvée dans 234 séquences d'Embryophytes soit 45% des séquences dont les structures ont été modélisées (515 au total). La structure 1 est retrouvée chez les plantes ancestrales ayant divergé avant les Mésangiospermes et est la structure la plus répandue, qui pourrait dériver de la forme ancestrale des premières copies *ERD6-like*. Elle est la séquence retrouvée le plus souvent dans toutes les espèces à l'exception de la plupart des Brassicacées (sauf pour *Carica papaya*). A partir de cette structure, 9 autres structures sont probablement apparues aux cours de l'évolution. Chaque type de structure a été défini par la présence d'au moins 2 séquences de la même structure pour au moins 2 espèces différentes. Aussi, certaines structures à 18, 17 ou 16 exons n'ont pas été considérées comme des types de structure tels qu'ils ont été définis (types 1 à 10).

Seules les séquences à 18, 17 et 16 exons ont été considérées puisque, comme nous l'avons mentionné précédemment, les structures ayant plus de 18 exons ou moins de 16 semblent être des exceptions ou provenir d'erreurs d'annotation. Ainsi des structures à 17 exons et à 16 exons ont pu être définies sur la base de la structure 1 (à 18 exons).

Sept types de structures ont sept exons :

- la structure 2 (17 exons) proviendrait de la structure 1 dont les exons 12 et 13 auraient fusionné. Elle concerne 23 séquences réparties comme suit (nombre de séquenceEspèce) : 3At, 2Ah, 4Al, 5Br, 3Cr, 3Th (20 Séquences, soit 86,9% des

structures 2 identifiées se trouvent chez les Brassicacées), 1Ca, 1Mt (Fabales) et 1Me (Malpighiales).

- la structure 3 (17 exons) proviendrait de la structure 1 dont les exons 17 et 18 auraient fusionné. Elle concerne 8 séquences réparties comme suit : 1At, 1Ah, 1Al, 2Br, 1Cr, 1Th (7 séquences, soit 88% des structures 3 identifiées se trouvent chez les Brassicacées) et 1Mt (Fabales).
- la structure 4 proviendrait de la structure 1 dont les exons 14 et 15 auraient fusionnés. Elle concerne 14 séquences réparties comme suit : 1At, 3Ah, 3Al, 4Br et 3Th (14 séquences, soit 100 % des structures 4 identifiées se trouvent chez les Brassicacées).
- la structure 5 proviendrait de la structure 1 dont les exons 15 et 16 auraient fusionnés. Elle concerne 5 séquences réparties comme suit : 1At, 1Ah, 1Al, 1Br (4 séquences, soit 80 % des structures 5 identifiées se trouvent chez les Brassicacées) et 1Spu (Sapindales).
- la structure 6 proviendrait de la structure 1 dont les exons 4 et 5 auraient fusionnés. Elle concerne 9 séquences réparties comme suit : 1At, 1Ah, 1Al, 3Br, 1Cr, 1Th (8 séquences, soit 89 % des structures 6 identifiées se trouvent chez les Brassicacées), 1Vv (Vitales).
- la structure 7 proviendrait de la structure 1 dont les exons 1 et 2 sont fusionnés. Elle concerne 24 séquences réparties comme suit : 3Bd, 2Ma, 3Os, 3Ph, 4Pvi, 1Pd, 3Si, 2Sb, 3Zm (24 séquences Monocotylédones soit 100%).
- la structure 8 proviendrait de la structure 1 dont les exons 5 et 6 auraient fusionnés. Elle concerne 3 séquences réparties comme suit : 2Cc, 1Csi (3 Sapindales soit 100%).

Deux types de structures ont 16 exons :

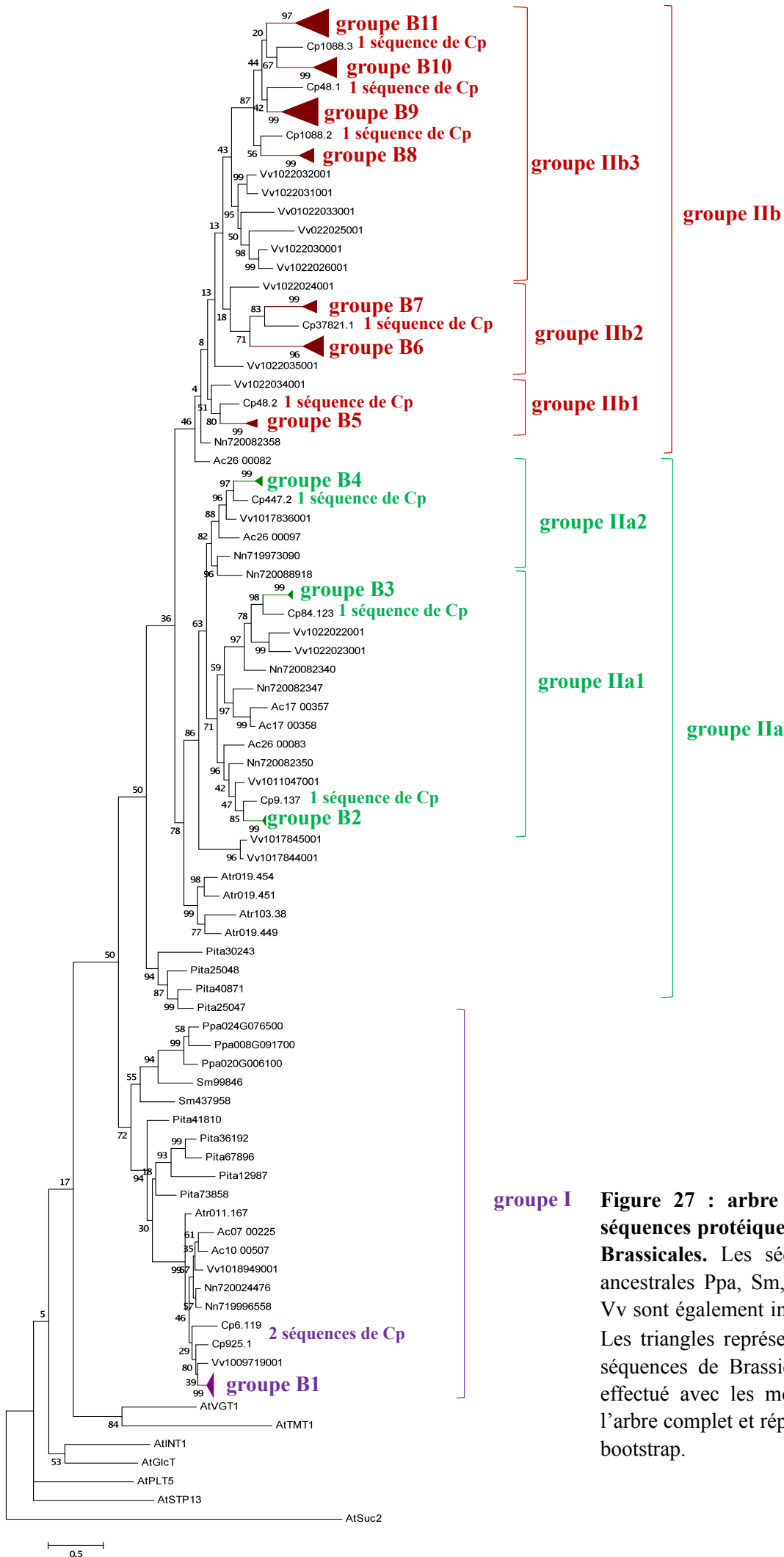


Figure 27 : arbre phylogénétique des séquences protéiques ERD6-like chez les Brassicales. Les séquences des espèces ancestrales Ppa, Sm, Pita, Atr, Ac, Nn et Vv sont également incluses dans cet arbre. Les triangles représentent des groupes de séquences de Brassicacées. L'arbre a été effectué avec les mêmes paramètres que l'arbre complet et répété à hauteur de 1000 bootstrap.

- la structure 9 proviendrait de la structure 1 dont les exons 6 et 7 auraient fusionnés ainsi que les exons 9 et 10. Elle concerne 6 séquences réparties comme suit : 1At, 1Ah, 1Al, 1Br, 1Cr et 1Th (6 séquences trouvées à 100 % chez les Brassicacées)
- la structure 10 proviendrait de la structure 1 dont les exons 9 et 10 auraient fusionnés ainsi que les exons 15 et 16 ou de la structure 5 dont les exons 9 et 10 auraient fusionnés. Elle concerne 3 séquences réparties comme suit : 1Sl et 2St (3 Solanales, soit 100%).

Certaines de ces structures sont spécifiques d'ordre ou de groupe de plantes :

La structure 7 est spécifique des Monocotylédones du groupe I.

La structure 10 est spécifique des Solanales du groupe IIa.

Les structures à 17 exons (type 3 et 4) ainsi qu'une structure à 16 exons (type 9), sont spécifiques des Brassicacées.

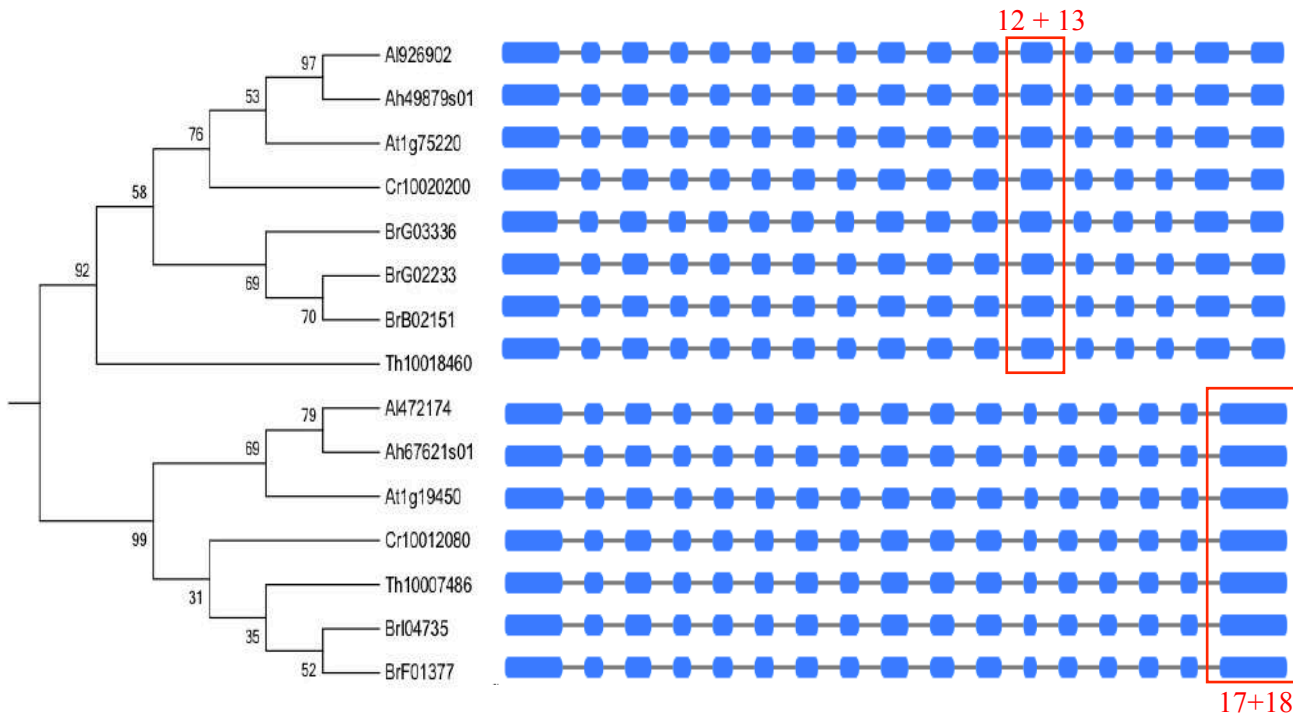
Les observations précédentes mettent en évidence qu'il existe 7 grands types de structures introns/exons (types 1, 2, 3, 4, 5, 6 à 17 exons et type 9 à 16 exons) pour les gènes *ERD6-like* de la famille des Brassicacées. Cette famille est donc celle dans laquelle il est retrouvé le plus grand nombre de types de structures. Il nous a semblé donc intéressant de déterminer s'il existait une corrélation entre les structures observées et les différents groupes de Brassicacées identifiés dans l'arbre phylogénétique. Une telle corrélation pourrait refléter l'évolution de ces transporteurs et être à l'origine de différences fonctionnelles. La figure 27 représente l'évolution des *ERD6-like* identifiés chez les Brassicacées. Ont été aussi incluses dans l'analyse les séquences de Cp (Caricacées) qui est une Brassicale et celles des espèces ayant divergé avant les Eurosidées (Ppa, Sm, Pita, Atr, Ac, Nn et Vv). L'arbre présenté dans la figure 27 ressemble à l'arbre complet en ce sens que l'on retrouve les 3 grands groupes monophylétiques de séquences *ERD6-like* I, IIa et IIb ainsi que les sous-groupes IIa1, IIa2, IIb1, IIb2 et IIb3. Le nombre de groupes monophylétiques de séquences de Brassicacées est le même que dans l'arbre complet :

- 1 groupe de séquence de Brassicacées pour le groupe I, appelé B1 pour Brassicacées 1. Il contient 15 séquences et 2 séquences de la *C. papaya* (Caricacées) sont à la base du groupe.

Groupe I

Groupe B1

**Structure 2
(17 exons)**



**Structure 3
(17 exons)**

**Structure primaire
(18 exons)**

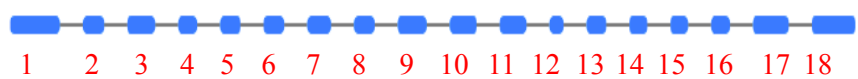
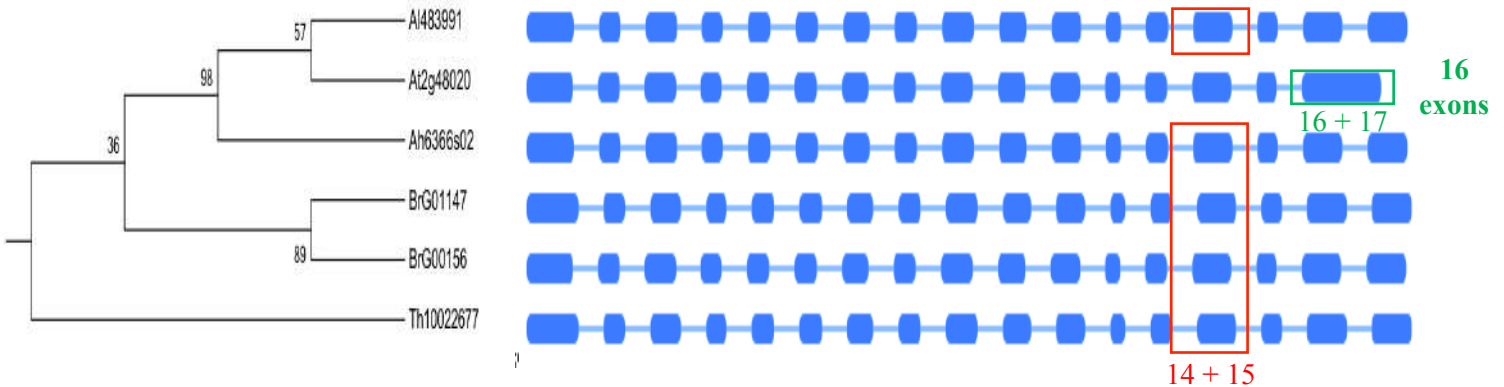


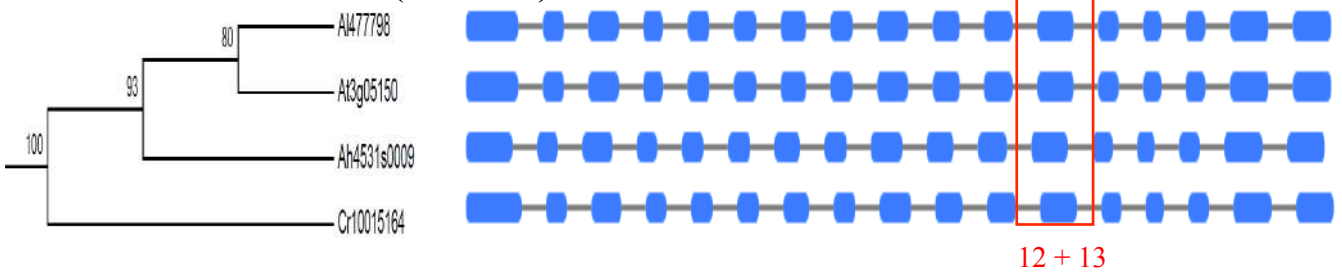
Figure 28 : les structures des ERD6-like de Brassicacées dans le groupe I de l'arbre. Les rectangles bleu matérialisent les exons et les lignes les introns. Les chiffres rouges désignent le numéro du ou des exons concernés, numérotés en partant du côté 5' du gène. Les exons sont tous dessinés à la même échelle mais pas les introns qui ont tous la même longueur sur le schéma. La structure 1 à 18 exons est rappelée lorsqu'elle n'est pas représentée dans les groupes de séquences analysés. Les arbres ont été extraits de la figure 11.

Groupe IIa1

Groupe B2 Structure 4 (17 exons)

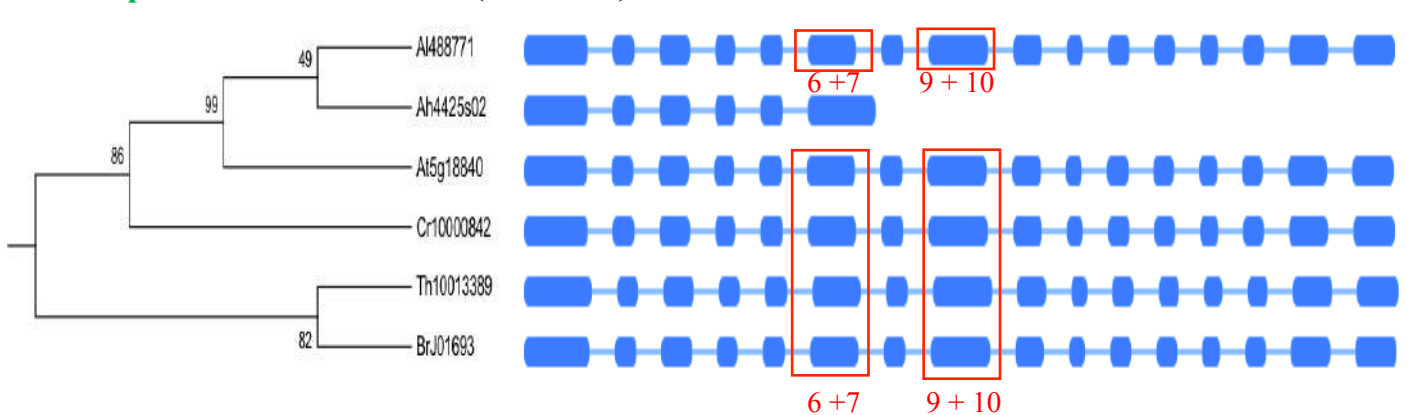


Groupe B3 Structure 2 (17 exons)



Groupe IIa2

Groupe B4 Structure 9 (16 exons)



Structure primaire (18 exons)

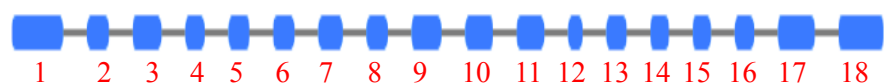
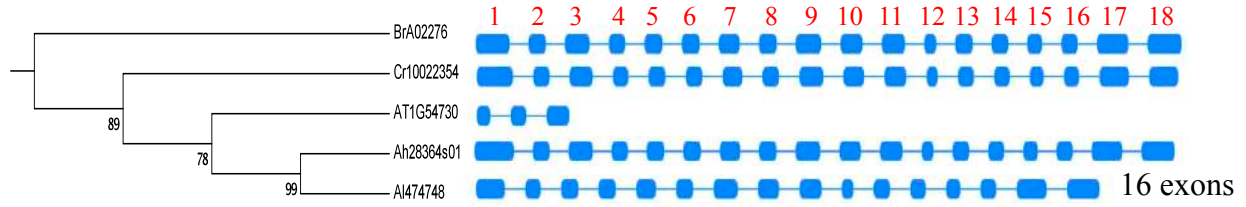


Figure 29 : les structures des ERD6-like de Brassicacées dans le groupe IIa de l'arbre. Les rectangles matérialisent les exons et les lignes les introns. Les chiffres rouges désignent le numéro du ou des exons concernés, numérotés en partant du côté 5' du gène. Les exons sont tous dessinés à la même échelle mais pas les introns qui ont tous la même longueur sur le schéma. La structure 1 à 18 exons est rappelée lorsqu'elle n'est pas représentée dans les groupes de séquences analysés. Les arbres ont été extraits de la figure 11.

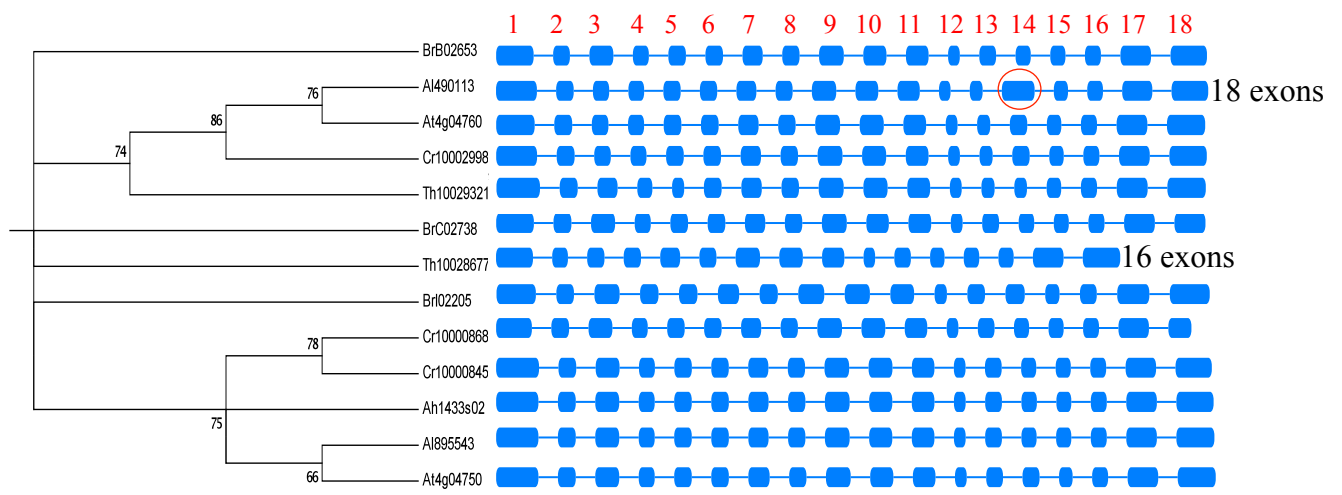
Groupe IIb1

Groupe B5 Structure 1 (18 exons)

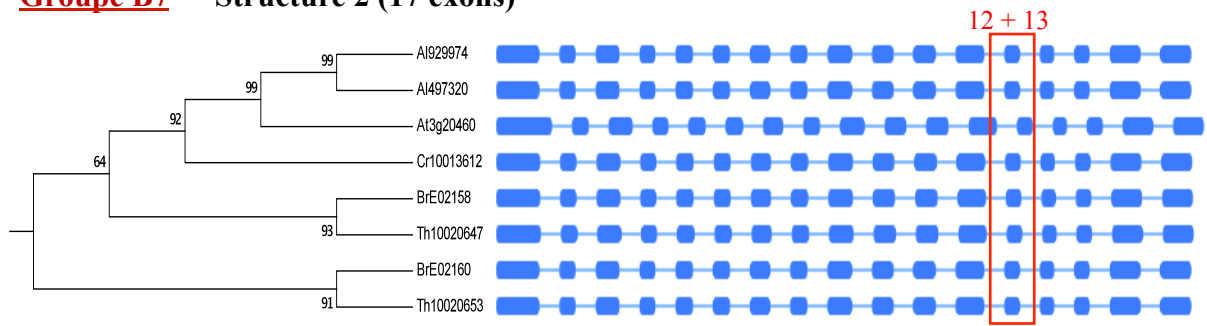


Groupe IIb2

Groupe B6 Structure 1 (18 exons)

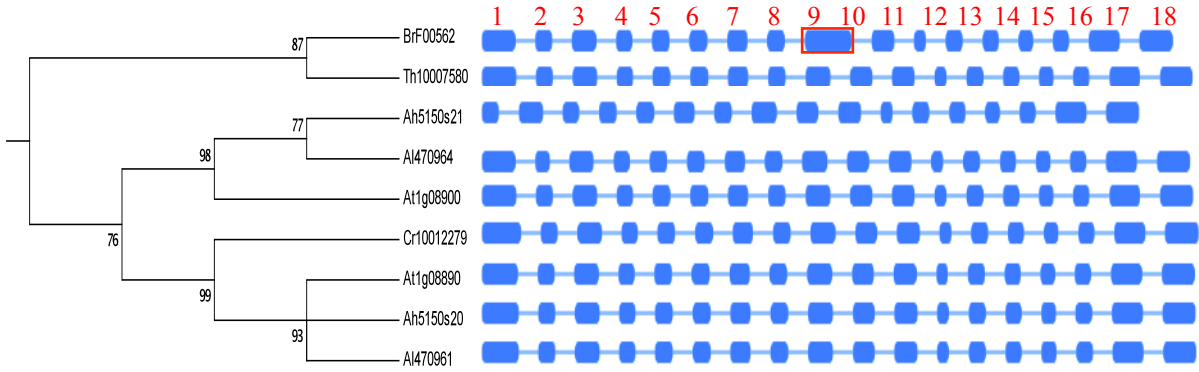


Groupe B7 Structure 2 (17 exons)

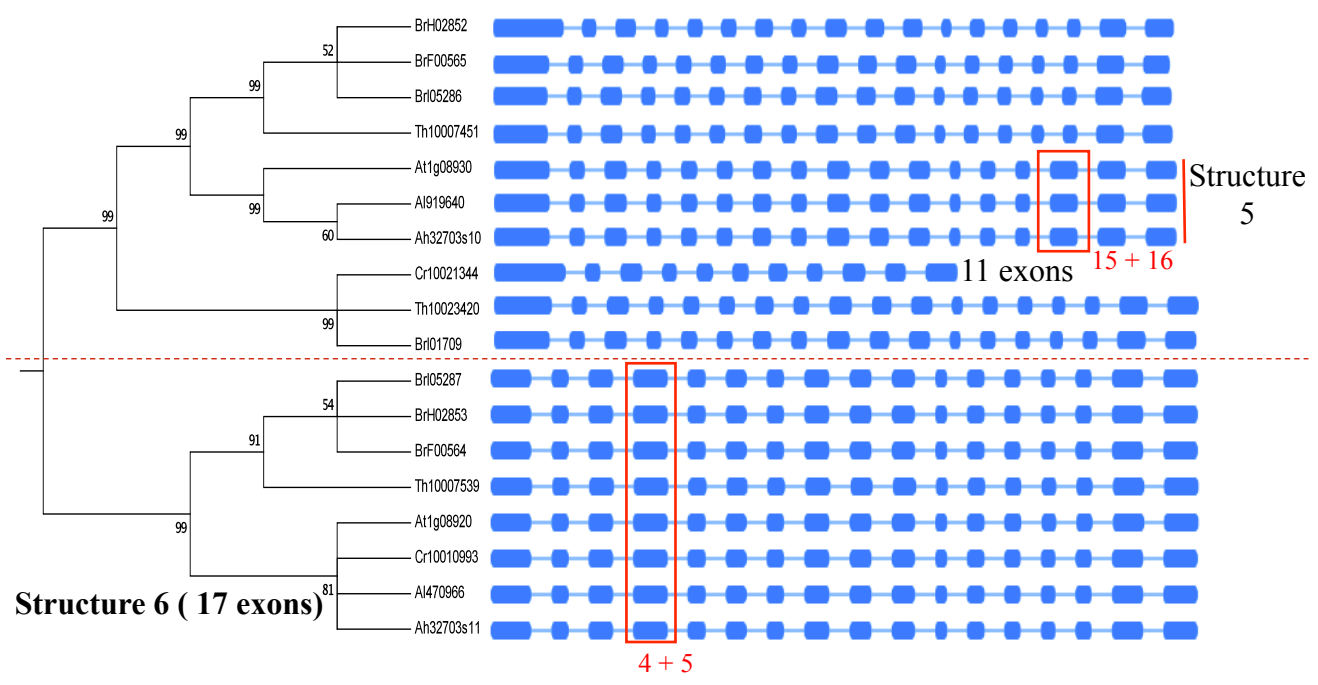


Groupe IIb3

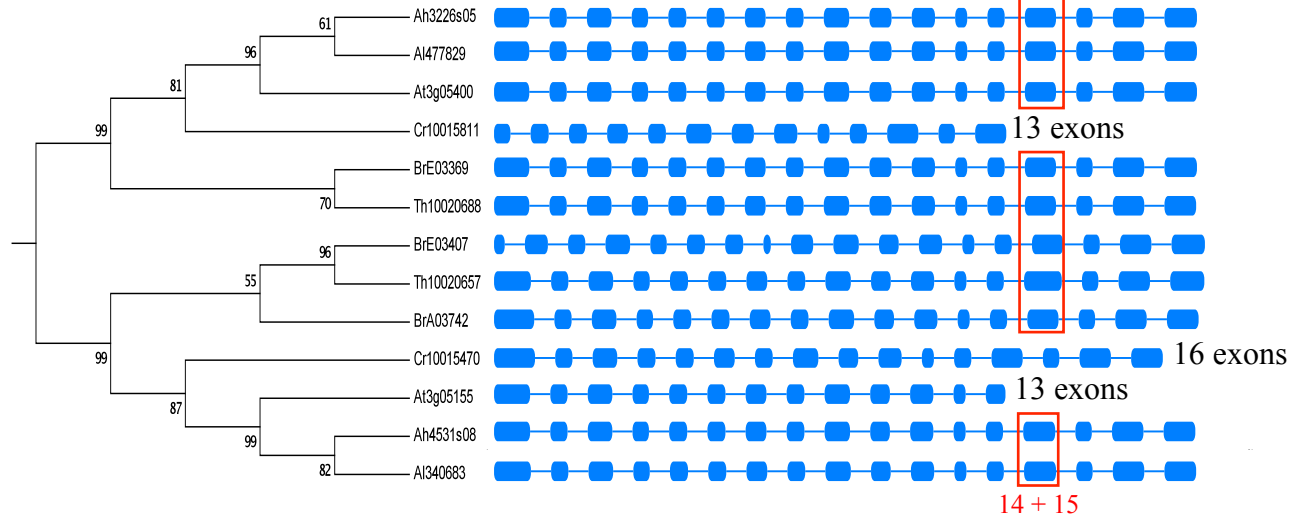
Groupe B8 Structure 1 (18 exons)



Groupe B9 Structure 1 (18 exons)



Groupe B10 Structure 4 (17 exons)



Groupe IIb3

Groupe B11

Structure 1
(18 exons)

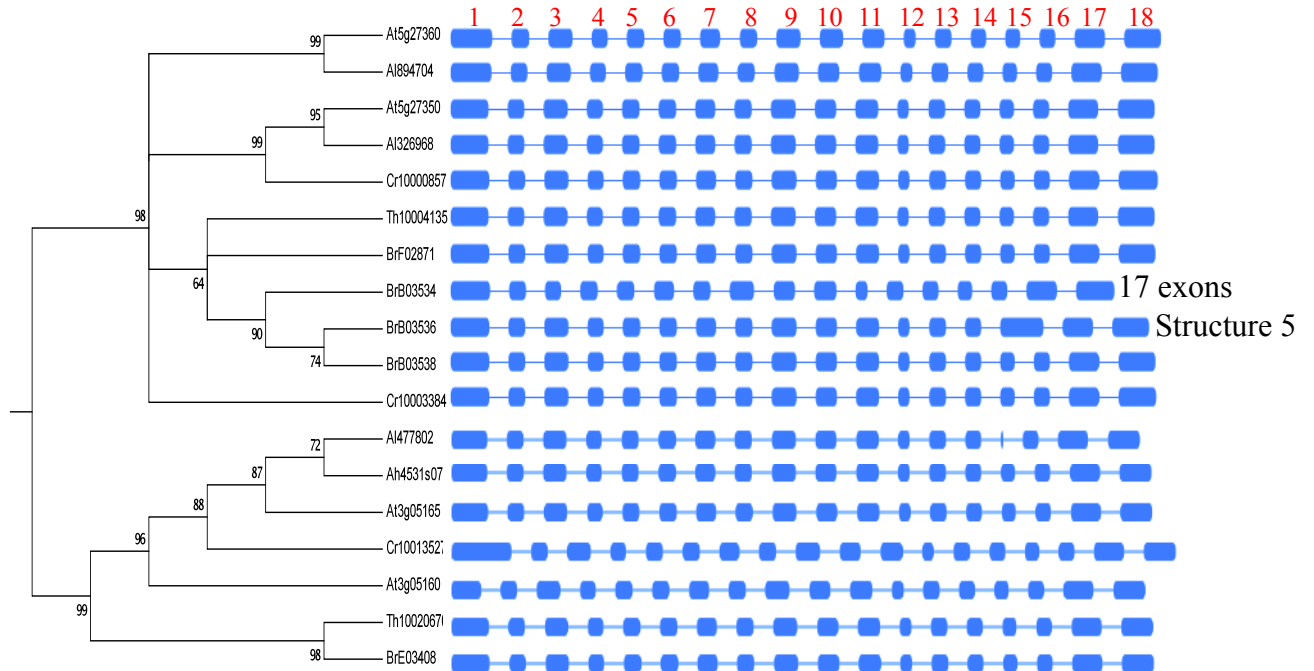


Figure 30: les structures des ERD6-like de Brassicacées dans le groupe IIb de l'arbre. Les rectangles matérialisent les exons et les lignes les introns. Les chiffres rouges désignent le numéro du ou des exons concernés, numérotés en partant du côté 5' du gène. Les exons sont tous dessinés à la même échelle mais pas les introns qui ont tous la même longueur sur le schéma.

- 3 groupes de séquences de Brassicacées pour le groupe IIa : 2 dans le groupe IIa1 (B2, 5 séquences et B3, 6 séquences) et 1 dans le groupe IIa2 (B4, 6 séquences). A la base de chacun de ces groupes se positionne une séquence de *C. papaya* (Caricacées).
- 7 groupes de séquences de Brassicacées pour le groupe IIb : 1 dans le groupe IIb1 (B5, 5 séquences), 2 dans le groupe IIb2 (B6, 13 séquences et B7, 8 séquences) et 4 dans le groupe IIb3 (B8, B9, B10 et B11 avec respectivement 9, 13, 18 et 18 séquences). A l'exception des groupes B6 et B11, une séquence de *C. papaya* (Caricacées) se positionne à la base de chacun de ces groupes.

La figure 28 présente en détail le sous-groupe B1, faisant partie du groupe I de l'arbre complet. Ce groupe se subdivise en deux groupes distincts contenant chacun au moins une séquence de chacune des 6 espèces. *B. rapa* est la seule espèce pour laquelle plusieurs séquences sont retrouvées dans les deux groupes (3 et 2 séquences). Deux types de structures sont identifiables : les structures 2 et 3 (17 exons). La structure 2 correspond un groupe monophylétique contenant la séquence protéique At1g75220 d'*A. thaliana*, La structure 3 correspond au groupe monophylétique contenant la séquence protéique At1g19450 d'*A. thaliana*,

La figure 29 présente en détail les sous-groupes de séquences de Brassicacées identifiés dans le groupe IIa. Trois types de structures y sont identifiables : les structures de types 2, 4 à 17 exons et la structure de type et 9 à 16 exons. La structure de type 2 est retrouvée dans le groupe B3 contenant la séquence protéique At3g05150 d'*A. thaliana*. La structure de type 4 est retrouvée dans le groupe B2 contenant la séquence protéique At2g48020 d'*A. thaliana*, dont la structure diffère des autres. En effet, elle ne contient que 16 exons ce qui pourrait correspondre à la fusion des exons 16 et 17 de la structure à 17 exons. Cette structure ne représente pas un type de structure défini dans la figure 26 car elle n'est identifiée que pour cette seule séquence. Dans le groupe IIa2, la structure de type 9 est retrouvée dans le groupe B4 contenant la séquence protéique At5g18840 d'*A. thaliana*. Dans ce groupe, une séquence d'Ah a une présente une structure tronquée à 6 exons.

La figure 30 présente en détail les 7 sous-groupes de séquences de Brassicacées identifiés dans le groupe IIb. Cinq types de structures y sont identifiables : les structures de type 1, 2, 4, 5 et 6. Dans le groupe IIb1, la structure 1 (18 exons) est retrouvée dans le groupe B5 contenant la séquence protéique At1g54730 d'*A. thaliana*. Dans le groupe IIb2, la structure 1 (18 exons) est retrouvée dans le groupe B6 contenant les 2 séquences protéiques At4g04750

et At4g04760 d'*A. thaliana*. De plus dans ce groupe deux séquences ont une structure différente. La séquence *Th10028677* possède une structure à 16 exons qui pourrait correspondre à la perte de l'exon 3 par rapport à la structure à 17 exons ou de la perte des exons 3 et 4 par rapport à la structure à 18 exons. LA séquence *Al490113* a 18 exons dont le 14^e paraît un peu plus long que dans la structure 1 générale, mais ceci peut être dû à des erreurs d'annotations des CDS et ne pas refléter la réalité. Ces deux structures ne représentent donc pas un type de structure défini dans la figure 26 car ne sont présentes que dans une seule séquence. La structure 2 (17 exons) est retrouvée dans le groupe B7 contenant la séquence protéique At4g20460 d'*A. thaliana*. Dans le groupe Iib3, la structure 1 (18 exons) est retrouvée dans les groupes B8 et B11. Le groupe B8 contient les 2 séquences protéiques At1g08890 et At1g08900 d'*A. thaliana*. Il contient également la séquence *BrF00562* qui ne contient que 17 exons. Cette structure pourrait provenir de la fusion des exons 9 et 10 mais ne représente pas un type de structure défini dans la figure 26 car présente dans cette seule séquence. Les structures 1, 5 et 6 sont retrouvées dans le groupe B9. La structure 5 (17 exons) peut servir à définir un groupe monophylétique spécifique du genre *Arabidopsis* contenant la séquence protéique At1g08930 d'*A. thaliana*. La structure 6 (17 exons) peut servir à définir un groupe monophylétique contenant la séquence protéique At1g08920 d'*A. thaliana*. La structure 4 (17 exons) est retrouvée dans le groupe B10 contenant les 2 séquences protéiques At3g05155 et At3g05400 d'*A. thaliana*. *At3g05155* a une structure intron/exon tronquée avec 13 exons. De ce groupe contient une séquence de *C. rubella* à 16 exons dont la structure pourrait provenir de la perte de l'exon 4. Elle ne représente pas un type de structure défini dans la figure 26 car présente uniquement dans cette séquence. Le groupe B11 contient les 4 séquences protéiques At3g05160, At3g05165, At5g27350 et At5g27360 d'*A. thaliana*. Dans ce groupe, la séquence *BrB03536* possède 17 exons. Cette structure correspond à la structure 5 (17 exons) qui pourrait provenir de la fusion des exons 15 et 16. La séquence *BrB03534* possède également 17 exons. Cette structure qui pourrait provenir de la perte de l'exon 3 ne représente pas un type de structure défini dans la figure 26 car présente uniquement dans une seule séquence.

Chez les Brassicacées, la structure 1 (à 18 exons) est retrouvée parmi les séquences du groupe Iib (sous-groupes B5, B6, B8, B11). La structure 2 est observée dans les 3 groupes I (sous-groupe B1), Iia (sous-groupe B3) et Iib (sous-groupe B7). La structure 3 est spécifique d'un sous-groupe du groupe I. La structure 4 est présente dans les groupes Iia (sous-groupe B2) et dans le groupe Iib (sous-groupe B10). Les structures 5 et 6 sont spécifiques du sous-

groupe B9 du groupe IIb dans lequel des structures à 18 exons sont également retrouvées pour les autres espèces. La structure à 16 exons (structure 9) est spécifique des séquences de Brassicacées du sous-groupe B4 faisant partie du Groupe IIa.

En conclusion, seuls deux types de structures sont conservés tout au long de l'évolution, puisque retrouvés dans les trois groupes de l'arbre phylogénétique, la structure 1 (18 exons) et la structure 2 (17 exons). Au vu de l'arrangement physique des exons dans la structure 1 et dans les autres types de structures, et compte-tenu du fait que la structure 1 est majoritairement représentée parmi les 46 espèces analysées, il paraît probable que cette structure soit le type ancestral. De ce fait, les 9 autres types de structures dériveraient de la structure 1 par la disparition de différents introns. Cependant, chez les Brassicacées la structure 1, *a priori* ancestrale, est retrouvée uniquement au niveau des séquences du Groupe IIb, dans les 3 sous-groupes (IIb1, IIb2 et IIb3) donc potentiellement dans les copies *ERD6-like* dupliquées les plus récemment. A l'inverse, les copies *ERD6-like* qui seraient les plus anciennes (Groupe I) ont une structure à 17 exons (structures 2 et 3). Ceci remet en question l'hypothèse que toutes les séquences de Brassicales aient évoluées à partir d'une structure à 18 exons et indique une évolution beaucoup plus complexe impliquant d'autres structures, comme éventuellement la structure de type 2.

1.6 Analyse des substitutions nucléotidiques (*dN/dS*) des *ERD6-like* du genre *Arabidopsis*

Etant donné que chez les espèces de la famille des Brassicacées, 11 groupes monophylétiques ont été mis en évidence (figure 27) dans l'arbre complet des séquences protéiques *ERD6-like*, que ces groupes contiennent des gènes dupliqués en tandem et que ces gènes présentent 7 structures introns/exons différentes, nous pouvons nous demander, quel type de sélection est en cours chez les Brassicacées pour les *ERD6-like*.

Pour essayer de répondre à cette question, une analyse de substitutions nucléotidiques ou *dN/dS* (appelée parfois aussi *Ka/Ks*), a été menée avec le genre *Arabidopsis* qui est le seul genre des brassicales pour lequel les gènes ont été identifiés chez 3 espèces et qui sera utilisé par la suite dans les études physiologiques et moléculaires. L'objectif est de déterminer le ou les types de sélections qui s'opèrent sur chacun des *ERD6-like* du genre *Arabidopsis*. Puisque les génomes des 3 *Arabidopsis* incluses dans l'étude (*A. thaliana*, *A. halleri* et *A. lyrata*) sont

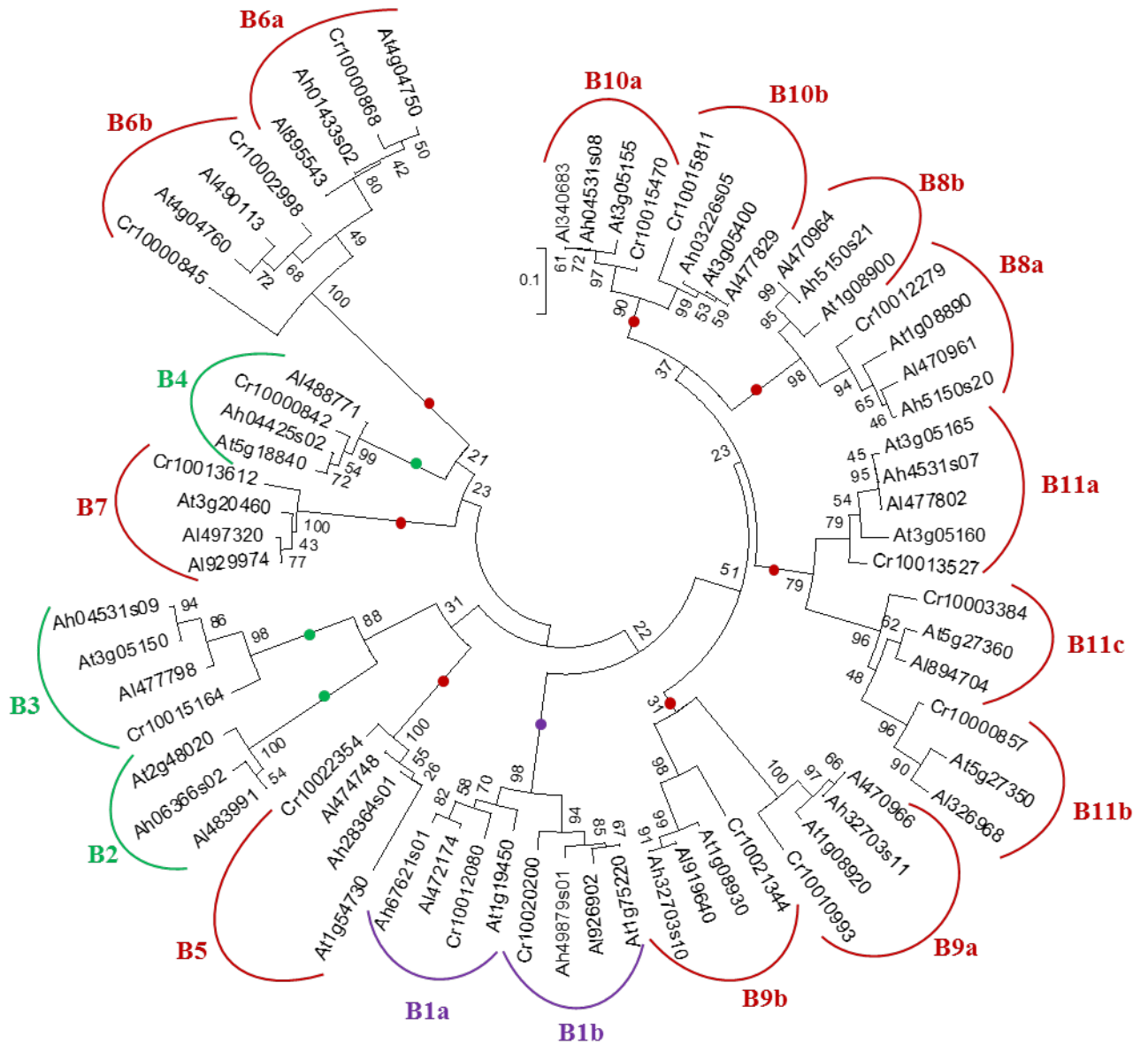


Figure 31 : arbre phylogénétique des séquences CDS (séquences codantes) des 69 ERD6-like des Brassicacées *Arabidopsis thaliana*, *A. lyrata*, *A. halleri* et *Capsella rubella*. *Capsella rubella* est utilisée en tant que outgroup. L'arbre a été réalisé à l'aide du logiciel MEGA 7 en utilisant la méthode Neighbor-Joining et 1000 répliques de bootstrap. Les points de couleurs matérialisent la branche qui détermine chacun des 11 groupes de séquences ERD6-like de Brassicacées, tout comme ils ont été identifiés dans la figure R bioinfo 18. Violet = groupe I, vert = groupe IIa, rouge = groupe IIb.

très proches, les séquences *ERD6-like* identifiées chez *Capsella rubella* (une autre Brassicacée) ont été intégrées à l'analyse de dN/dS, servant ainsi d'outgroup.

Le ratio dN/dS a été calculé sur le site Datamonkey (www.datamonkey.org/) pour chacune des séquences CDS d'*ERD6-like* des 4 espèces mentionnées ci-dessus (la méthode est décrite et expliquée dans le chapitre Matériel et Méthodes). Afin de déterminer le nombre d'alignements à effectuer avant le calcul du dN/dS, un arbre des séquences CDS *ERD6-like* des 3 *Arabidopsis* et de *Capsella rubella* a été réalisé avec MEGA 6 et est présenté en figure 31. Dix-huit groupes ont pu être définis à partir de cet arbre. Ils correspondent aux 11 groupes de séquences de Brassicacées, identifiés sur l'arbre des séquences protéiques (figure 27). Les noms des groupes ne changent donc pas fondamentalement : ils sont nommés de B1 à B11c. Pour cette analyse, un groupe de séquence est défini comme tel lorsqu'il est monophylétique, possède au moins une séquence d'*A. thaliana* (qui possède le plus d'*ERD6-like* dans le genre *Arabidopsis*) et aussi une séquence de *C. rubella*, autant que possible. Ce dernier point n'a pas été possible pour les groupes B2b et B8b. Pour chacun des dix-huit groupes de séquences CDS d'*ERD6-like*, un alignement a été effectué et cet alignement a été incrémenté sur le serveur en ligne Datamonkey afin d'analyser les substitutions de nucléotides par le calcul du dN/dS, selon l'arbre présenté en figure 16.

Le tableau 13 présente le résultat de l'analyse, groupe par groupe. Soixante-cinq séquences ont été incluses dans l'analyse de substitutions nucléotidiques. En effet, les séquences *Ah04425s02* (*A. halleri*), *Cr10000845*, *Cr10015811* et *Cr10021344* (*C. rubella*), incluses dans l'arbre des séquences CDS n'ont pas été utilisées pour les analyses de dN/dS car il n'a pas été possible de les aligner correctement aux autres séquences tout en respectant le cadre de lecture. En effet, ces séquences sont plus courtes ou ne commencent pas par un ATG. En moyenne, toutes séquences confondues, le dN/dS est de 0,205, avec des valeurs allant de 0,021 à 0,677. Pour chacune des 65 séquences, les valeurs de dN/dS sont inférieures à 1, ce qui signifie que le taux de mutations non synonymes est inférieur au taux de mutations synonymes. La pression de sélection est donc forte au niveau des 65 séquences. Elle tend à la conservation de l'intégrité de la séquence et donc potentiellement à la conservation de la fonction. Les 65 séquences sont donc en sélection purifiante (ou négative).

Les valeurs de dN/dS (en caractères gras sur le tableau) sont supérieures à la moyenne globale (0,205) pour 51 % des séquences. Ces séquences sont réparties comme suit :

- 0/8 dans le groupe I
- 2/10 dans le groupe IIa (20%)

Tableau 13 : analyse des substitutions nucléotidiques (dN/dS) des séquences *ERD6-like* identifiées chez les Brassicacées. L'analyse a été effectuée sur 18 groupes de séquences indépendamment (groupes B1a à B11 de l'arbre des séquences CDS). Les valeurs en % dans la 3^{ème} colonne correspondent à un % de longueur de l'arbre (en terme de substitutions) associé à la valeur de dN/dS indiquée.

arbres	gènes	Type de structure	dN/dS médian (intervalle de confiance de 95%)	moyenne dN/dS (% de l'arbre)	
Groupe I	groupe B1a	<i>Ah67621S01</i>	3	0,149 (0,042 -0,149)	0,149 (29%)
		<i>At1G19450</i>	3	0,149 (0,062-0,150)	
		<i>Al472174</i>	3	0,035 (0,031-0,112)	0,035 (71%)
	<i>Cr10012080</i>	3	0,037 (0,035-0,065)		
	groupe B1b	<i>Ah49879S01</i>	2	0,123 (0,026-0,155)	
		<i>At1G75220</i>	2	0,111 (0,041-0,123)	
<i>Al926902</i>		2	0,021 (0,020-0,101)		
Groupe IIa	groupe B2	<i>Cr10020200</i>	2	0,021 (0,021-0,043)	0,021 (63%)
		<i>Al483991</i>	4	0,339 (0,071-0,339)	
		<i>At2G48020</i>	4	0,060 (0,060-0,107)	
	groupe B3	<i>Ah06366S02</i>	16 exons	0,339 (0,098-0,750)	0,750 (89%)
		<i>Al477798</i>	2	0,193 (0,111-0,255)	
		<i>At3G05150</i>	2	0,153 (0,104-0,197)	
		<i>Ah04531S09</i>	2	0,104 (0,063-0,182)	
		<i>Cr10015164</i>	2	0,100 (0,093-0,125)	
		<i>At5G18840</i>	16 exons	0,145 (0,109-0,149)	
	groupe B4	<i>Al488771</i>	18 exons	0,145 (0,145-0,213)	0,145 (100%)
		<i>Cr10000842</i>	16 exons	0,145 (0,131-0,157)	
		<i>Ah28364S01</i>	16 exons	0,420 (0,315-0,502)	
groupe B5	<i>Al474748</i>	1	0,258 (0,108-0,443)	0,339 (40%)	
	<i>At1G54730</i>	3 exons	0,420 (0,306-0,502)		
	<i>Cr10022354</i>	1	0,103 (0,102-0,129)		
groupe B6a	<i>Ah01433S02</i>	2	0,309 (0,266-0,347)	0,283 (100%)	
	<i>Al895543</i>	2	0,312 (0,265-0,459)		
	<i>At4G04750</i>	2	0,266 (0,246-0,312)		
	<i>Cr10000868</i>	2	0,265 (0,246-0,288)		
	<i>At4G04760</i>	1	0,219 (0,198-0,281)		
groupe B6b	<i>Al490113</i>	2	0,281 (0,209-0,316)	0,219 (100%)	
	<i>Cr10002998</i>	18 exons	0,198 (0,185-0,219)		
	<i>Al497320</i>	2	0,218 (0,205-0,338)		
groupe B7	<i>Al929974</i>	2	0,207 (0,189-0,237)	0,210 (100%)	
	<i>At3G20460</i>	2	0,206 (0,187-0,211)		
	<i>Cr10013612</i>	2	0,210 (0,205-0,219)		
	<i>Ah5150S20</i>	1	0,137 (0,111-0,249)		
groupe B8a	<i>At1G08890</i>	1	0,121 (0,092-0,234)	0,111 (34%)	
	<i>Al470961</i>	1	0,245 (0,120-0,271)		
	<i>Cr10012279</i>	1	0,266 (0,222-0,272)		
groupe B8b	<i>Ah5150S21</i>	17 exons	0,387 (0,164-0,492)	0,395 (75%)	
	<i>Al470964</i>	1	0,395 (0,202-0,894)		
	<i>At1G08900</i>	1	0,131 (0,131-0,354)		
Groupe IIb	groupe B9a	<i>Ah32703S11</i>	6	0,059 (0,000-0,166)	0,074 (18%)
		<i>At1G08920</i>	6	0,084 (0,588-0,160)	
		<i>Al470966</i>	6	0,677 (0,664-0,682)	
		<i>Cr10010993</i>	6	0,167 (0,145-0,176)	
groupe B9b	<i>Al919640</i>	5	0,046 (0,030-0,085)	0,046 (84%)	
	<i>At1G08930</i>	5	0,053 (0,046-0,078)		
groupe B10a	<i>Ah32703S10</i>	5	0,085 (0,065-0,223)	0,223 (16%)	
	<i>Ah04531S08</i>	4	0,209 (0,161-0,296)		
	<i>Al340683</i>	4	0,176 (0,117-0,290)		
	<i>At3G05155</i>	2	0,280 (0,209-0,315)		
	<i>Cr10015470</i>	16 exons	0,296 (0,264-0,322)		
groupe B10b	<i>Ah03226S05</i>	4	0,301 (0,127-0,305)	0,301 (79%)	
	<i>At3G05400</i>	4	0,301 (0,209-0,301)		
groupe B11a	<i>Al477829</i>	4	0,045 (0,045-0,022)	0,230 (100%)	
	<i>Al477802</i>	18 exons	0,230 (0,208-0,309)		
	<i>Ah4531S07</i>	1	0,246 (0,221-0,391)		
	<i>At3G05165</i>	1	0,246 (0,223-0,362)		
	<i>AtG05160</i>	1	0,221 (0,206-0,237)		
groupe B11b	<i>Cr10013527</i>	1	0,225 (0,214-0,248)	0,172 (34%)	
	<i>Al326968</i>	1	0,197 (0,172-0,296)		
	<i>At5G27350</i>	1	0,172 (0,154-0,262)		
groupe B11c	<i>Cr10000857</i>	1	0,296 (0,254-0,314)	0,314 (56%)	
	<i>Al894704</i>	1	0,138 (0,136-0,406)		
	<i>At5G27360</i>	1	0,138 (0,113-0,136)		
	<i>Cr10003384</i>	1	0,472 (0,406-0,472)		

- 31/47 dans le groupe IIb (70%).

Il y a donc plus de séquences dont les valeurs de dN/dS sont supérieures à la moyenne globale dans le groupe IIb, et cela représente une plus large part du nombre total de séquences analysées dans ce groupe.

La figure 32 présente sous forme de graphique, les valeurs de dN/dS moyen pour chacun des 3 groupes. Dans le groupe I, le dN/dS moyen est de 0,081 avec des valeurs allant de 0,021 à 0,149. La moitié des séquences de ce groupe (4/8) ont un dN/dS plus important (tableau 13) que la moyenne du groupe. Ces séquences proviennent d'*A. thaliana* et *A. halleri*. Dans le groupe IIa, le dN/dS moyen est de 0,172 avec des valeurs allant de 0,060 à 0,339. Trois séquences sur les 10 ont un dN/dS supérieur à cette moyenne, soit 30% des séquences analysées du groupe IIa. Ces trois séquences proviennent d'*A. lyrata* et *A. halleri* (tableau 13). Dans le groupe IIb, le dN/dS moyen est de 0,233 avec des valeurs allant de 0,045 à 0,677. Vingt-et-unes séquences sur 47 ont un dN/dS supérieur à cette moyenne, soit 44,68% des séquences analysées du groupe IIb (tableau 13). Dans les groupes I et IIb, un taux similaire de séquences (46 à 50%) ayant un dN/dS supérieur à la moyenne du groupe est observé. Ce taux est légèrement plus faible dans le groupe IIa (30%). Ce résultat diffère de celui observé en considérant la moyenne globale des valeurs de dN/dS des 3 groupes confondus (voir précédemment) qui indiquait que le taux de séquences ayant un dN/dS supérieur à la moyenne est le plus élevé dans le groupe IIb et le plus faible dans le groupe I. Toutefois, la valeur du dN/dS moyen du groupe IIa est 2,1 fois plus élevée que celle du groupe I et la valeur du dN/dS moyen du groupe IIb est 2,9 et 1,3 fois plus élevée que celles des groupes I et IIa, respectivement.

Ainsi, même si le type de sélection des séquences ERD6-like au sein des 3 *Arabidopsis* et de *Capsella rubella* est de type « purifiante » dans les 3 groupes, c'est-à-dire en faveur de la conservation de la fonction, il est possible d'observer une certaine gradation dans les valeurs de dN/dS entre les 3 groupes. Les valeurs les plus éloignées de 1, retrouvées dans le groupe I, pourrait indiquer une forte conservation des protéines dans ce groupe alors que les valeurs plus proches de 1, retrouvées dans le groupe II, pourrait suggérer une sélection un peu plus relâchée et donc potentiellement un peu plus propice à l'apparition de nouvelles fonctions. Ces observations coïncideraient avec l'hypothèse que les copies ERD6-like du groupe I soient dérivées des premières copies apparues chez l'ancêtre commun des Embryophytes (plantes terrestres). Ces copies sont, de ce fait, probablement plus anciennes. De plus, elles sont moins nombreuses et seraient nécessaires aux plantes terrestres. De ce fait, il est logique d'observer une sélection négative de ce type de gène. Les copies des groupes IIa

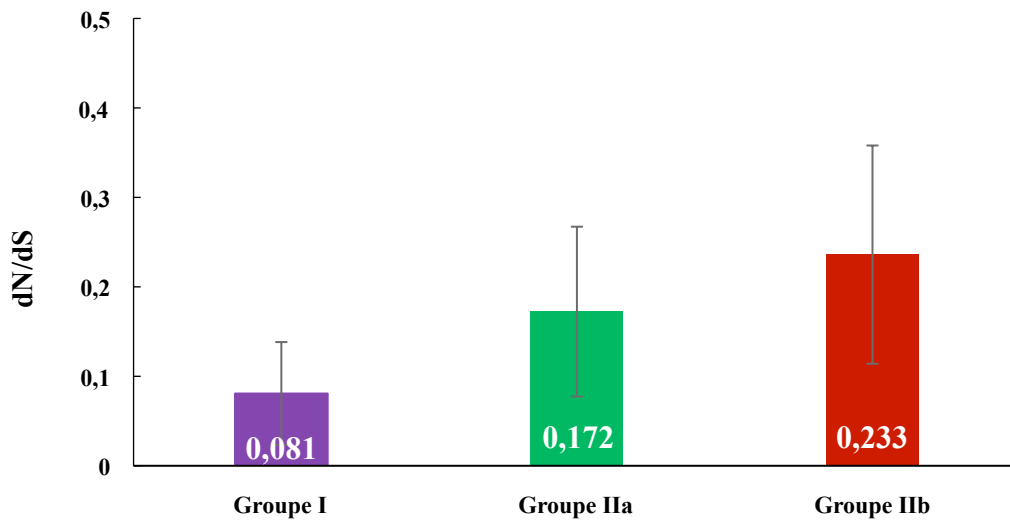


Figure 32 : analyse de la moyenne des valeurs de dN/dS dans chacun des 3 groupes de l'arbre. Le dN/dS est un ratio, il n'y a pas d'unité particulière. Groupe I : n = 8 séquences, groupe IIa : n = 10 séquences, groupe IIb : n = 48 séquences. Les nombres blancs correspondent aux valeurs moyennes observées.

et I1b seraient plus récentes et apparues à la suite d'événements de duplication de génomes. Dans le groupe I1b il y a, en plus, un taux très important de gènes dupliqués en tandem de toutes les espèces (tableau 9). Les ERD6-like dupliqués en tandem peuvent avoir des fonctions redondantes, et la pression de sélection exercée sur celles-ci peut donc être plus relâchée, étant donné que, si une copie dupliquée en tandem perd sa fonction d'origine, une autre copie peut potentiellement, la remplacer et assurer la fonction nécessaire à la plante.

Le tableau 14 rend compte du nombre d'associations d'espèces ayant le même dN/dS dans chacun des 3 groupes (I, I1a et I1b). Dans le groupe I, les séquences d'At et d'Ah sont toujours associées entre elles, lorsque ces 2 espèces sont présentes dans le groupe en question. Il en va de même pour les séquences d'Al et de Cr qui sont toujours associées à une même valeur de dN/dS.

Dans le groupe I1a, les séquences d'At et d'Al sont toujours associées à une même valeur de dN/dS lorsque ces 2 espèces se trouvent dans un même groupe. Il en va de même pour les séquences d'Ah et Cr. Les séquences d'At et Cr sont liées à la même valeur de dN/dS dans un cas sur deux, tout comme les séquences d'Al et Cr.

Dans le groupe I1b, on observe une hétérogénéité de valeurs de dN/dS communes à chacune des 4 espèces. Néanmoins, il se dégage que, les valeurs de dN/dS des séquences de Ah sont préférentiellement associées aux valeurs de dN/dS des séquences de At et Al, lorsqu'au moins une séquence de ces 2 espèces est présente dans le groupe analysé.

Un bilan de ces observations pourrait être que les copies *ERD6-like* d'*Arabidopsis thaliana* et *Arabidopsis halleri* dérivées des premières copies *ERD6-like* (groupe I), partagent une pression de sélection semblable comparées aux copies de *Arabidopsis lyrata* et *Capsella rubella*. Au fur et à mesure de l'évolution et des événements de duplication amenant à la survenue de nouvelles copies *ERD6-like* dans les génomes des 47 espèces analysées dans toute cette étude, la pression de sélection, même si elle reste purifiante, se relâche chez At, Ah, Al et Cr, ce qui aboutit finalement à des valeurs très différentes et variées de dN/dS dans le groupe I1b et ce, de la même manière pour les 4 espèces étudiées ici.

1.7 Discussion

L'étude de l'évolution des transporteurs de la famille ERD6-like présentée ici a été effectuée sur 58 espèces végétales, ce qui représente un nombre très important et couvre tous

Tableau 14 : nombre de séquences CDS *ERD6-like* ayant le même dN/dS au sein d'un groupe de séquences chez *Arabidopsis thaliana* (At), *Arabidopsis lyrata* (Al), *Arabidopsis halleri* (Ah) et *Capsella rubella* (Cr). Les valeurs représentent le nombre de groupes où les dN/dS des 2 espèces comparées sont identiques par rapport au nombre de groupes contenant au moins une séquence de ces 2 espèces. En gras : plus de 0%, en noir gras : entre 1 et 99 % ; en rouge gras : 100%.

Groupe I

	At	Ah	Al
At			
Ah	2/2 (100%)		
Al	0/2 (0%)	0/2 (0%)	
Cr	0/2 (0%)	0/2 (0%)	2/2 (100%)

Groupe IIa

	At	Ah	Al
At			
Ah	0/2 (0%)		
Al	3/3 (100%)	0/2 (0%)	
Cr	1/2 (50%)	1/1 (100%)	1/2 (50%)

Groupe IIb

	At	Ah	Al
At			
Ah	6/9 (66%)		
Al	7/3 (56%)	6/9 (66%)	
Cr	5/11 (46%)	3/7 (43%)	7/11 (64%)

les génomes disponibles dans les bases de données au cours de la première année du travail de thèse. Si d'autres études abordent l'évolution de gènes ou de familles de gènes chez les végétaux, peu utilisent un aussi grand nombre de génomes. Au commencement de la thèse (2014), Peng et ses collaborateurs, ont publié un article traitant de l'évolution des transporteurs de disaccharides chez les végétaux (Peng et al. 2014). Cette analyse est basée sur 41 génomes, incluant 6 espèces ancestrales : *Physcomitrella patens* (Bryophyte), *Selaginella moellendorffii* (Lycophyte), *Amborella trichopoda* (Proto-Angiosperme), *Phoenix dactylifera* (Monocotylédones à la base de l'ordre des Alismatales), *Musa acuminata* (Monocotylédones à divergence plus récente de l'ordre des Zingibérales), *Aquilegia caerulea*, (Dicotylédone archaïque de l'ordre des Renonculales). Ces six espèces ont également été incluses dans notre étude. Mais nous avons également ajouté à l'étude une représentante des Gymnospermes *Pinus taeda*, dont le génome entièrement séquencé a été publié en 2014 (Neale et al. 2014). Les progrès des méthodes de séquençage entraînent le séquençage massif de génomes et de ce fait, de nouveaux génomes sont publiés chaque année. Aussi, il se peut que depuis la fin des analyses d'évolution des ERD6-like effectués lors de cette thèse, d'autres génomes de plantes aient été séquencés. Les bases de données, dans lesquelles sont disponibles les données issues du séquençage de génomes, évoluent également rapidement. Au moment de l'étude, 47 génomes de plantes étaient disponibles sur Phytozome dans sa version 10.0. Aujourd'hui, Phytozome version 12.0 recense les données de séquences de 80 espèces (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>).

Ce travail peut être considéré comme représentatif du Règne Végétal, puisque 11 algues, une Bryophyte (mousse), une Lycophyte (fougère), une Gymnosperme, une Proto-Angiosperme, et 44 Mésangiospermes (dont 3 considérées à la base des Eudicotylédones), ont été incluses dans l'étude. Il est intéressant de noter l'absence de transporteur de type ERD6-like chez les 11 algues étudiées, ce qui suggère que cette famille de transporteurs de monosaccharides serait apparue chez les Embryophytes, il y a au moins 532 Ma (Time Tree of Life). De plus, cette analyse a permis d'identifier des membres de la famille ERD6-like dans les protéomes de toutes les Embryophytes analysées (47 au total), ce qui signifie probablement que ces transporteurs sont nécessaires aux plantes terrestres pour leur développement. Il est ainsi possible qu'ils jouent des rôles spécifiques dans la réponse à divers stimuli environnementaux liés au mode de vie terrestre. Le séquençage du génome de la Bryophyte *Physcomitrella patens* a permis de montrer qu'en effet, certaines familles de gènes sont spécifiques des plantes terrestres, comme par exemple les gènes codant pour les protéines LEA et d'autres gènes de tolérance à la dessiccation (Rensing et al. 2008). Ces

gènes trouvent tout leur intérêt chez les plantes terrestres, qui sont immobiles et subissent des stress biotiques et abiotiques variés, incluant le stress hydrique lorsque les conditions climatiques, environnementales et géographiques sont défavorables. Toutefois, 3 transporteurs de monosaccharides (HUP 1 à 3) ont été identifiés chez l'algue *Chlorella kessleri* (Sauer and Tanner 1989 ; Caspari et al. 1994 ; Johnson et al. 2006), et 9 transporteurs proches des transporteurs de saccharose ont été identifiés chez les algues rouges (1 chez *Cyanidioschyzon merolae* et 5 chez *Galdieria sulphuraria*) (Reinders et al. 2012) et les algues vertes (1 chez *Chlorokybus Atmosphyticus* (Charophyte), 1 chez *Ostreococcus licumarinus* et 1 chez *Ostreococcus tauri* (Reinders et al. 2012 ; Peng et al. 2014). Même si ces transporteurs ne peuvent pas être classés dans aucune des sous-familles de MST ou des groupes de SUT/SUC, il apparaît qu'il existe bien un système de protéines permettant le transport d'hexoses et de saccharose chez les algues. Il n'est donc pas à exclure que le seuil de e.value imposé lors de l'identification des protéines ERD6-like par BLAST soit un peu trop stringent pour permettre d'identifier des protéines à faibles homologues chez les algues. Les gènes ERD6-like en tant que tels pourraient donc être issus des transporteurs d'hexoses identifiés chez les algues et être apparus lors de l'adaptation des plantes à la vie terrestre. De ce fait nous pouvons supposer que l'expression de certains d'entre eux puisse être régulée par des stimuli environnementaux inhérents à la vie terrestre (sécheresse, froid, etc).

L'analyse du nombre et de l'histoire évolutive des ERD6-like chez les 47 espèces étudiées montrent une expansion progressive du nombre moyen d'ERD6-like chez les plantes au fur et à mesure de l'évolution avec une expansion de ce nombre chez les Angiospermes, plus spécifiquement et de manière plus marquée chez les Eurosidées. D'après nos résultats et la littérature, cette augmentation du nombre d'ERD6-like dans les génomes est la conséquence d'événements de duplication (Johnson et al. 2006). Il est en effet montré et largement accepté que les mécanismes de duplication favorisent la multiplication des gènes conduisant à la formation de famille multigéniques et constituent une force motrice de l'évolution des êtres vivants, notamment et de manière marquée chez les Angiospermes (Osborn et al. 2003). En ce qui concerne les ERD6-like, deux grands événements de duplication de génomes entiers auraient conduit à leur diversification. Un premier événement de duplication, a eu lieu chez l'ancêtre commun des Gymnospermes et des Angiospermes, il y a entre 360 et 460 Ma (figure 25, Time Tree of Life). Cette duplication des ERD6-like est très probablement lié à un événement plus général de Whole Genome Duplication (duplication de génome entier) puisque des séquences de la Gymnosperme *P. taeda* et de toutes les Angiospermes étudiées y sont retrouvées. Cet événement de duplication pourrait avoir eu lieu durant le Carbonifère ou

au début du Permien. La possibilité qu'un tel événement ait eu lieu, avant la diversification des Spermatophytes ou plantes à graines (Gymnospermes et Angiospermes) a été suggérée par différentes études (Jiao et al. 2011, Jiao et al. 2012, Van de Peer et al. 2011, Van de Peer et al. 2017, figure 7). Un second événement de duplication des *ERD6-like* a été identifié chez l'ancêtre des Angiospermes, et se serait produit il y a entre 360 et 200 Ma. La duplication génomique permettant l'apparition de nouvelles copies *ERD6-like*, pourrait correspondre à l'événement de duplication de génomes entiers chez les Angiospermes ayant eu lieu après l'événement d'extinction massive, observée lors de la liaison Permien Triassique (Jiao et al. 2011; Van de Peer et al. 2011; Jiao et al. 2012).

Lors du Crétacé une explosion du nombre de plantes à fleurs (Angiospermes) s'est produite, grâce à des conditions environnementales très favorables. D'après des études de botanique et d'entomologie, de nombreux processus de co-évolution ont eu lieu dans la période du Crétacé, dont un très bel exemple est la co-évolution entre les Angiospermes et les insectes butineurs (De Bodt et al. 2005). Or, nous savons que la co-évolution fait partie des mécanismes jouant un rôle déterminant dans l'évolution et la diversification des espèces, au même titre que les duplications génomiques (Thompson 1994; Segraves and Anneberg 2016). Durant le Crétacé, à la fin de la période du Mésozoïque, des duplications de copies *ERD6-like*, sont bien souvent retrouvées en tandem dans les génomes chez la plupart des Eudicotylédones, et peuvent être considérées comme spécifiques de certains ordres ou de certaines espèces. Ces duplications sont probablement dues à des mécanismes différents des deux grands événements de duplications. En effet, ces duplications récentes peuvent refléter des événements de duplication de génomes entiers, comme l'évènement d'hexaploïdisation ayant eu lieu chez l'ancêtre de la vigne et laissant des traces dans les génomes de toutes les Eudicotylédones (Jaillon et al. 2007; Tang et al. 2008; Jiao et al. 2012) mais également des événements de duplications géniques ou de fragments de chromosomes (issues de recombinaisons chromosomiques inégales par exemple) dans les génomes de certaines espèces, puisque de nombreuses duplications d'*ERD6-like* en tandem sont retrouvées chez certaines d'entre elles. Une étude a montré que l'expansion des sous-familles les plus larges de la MST semblent être due à de multiples duplications de gènes (Johnson et al. 2006). En effet, les résultats de nos travaux suggèrent fortement que chez les Angiospermes, les nombreuses duplications en tandem d'*ERD6-like* sont en lien avec l'expansion du nombre d'*ERD6-like* dans les génomes.

De plus, c'est dans le groupe I de l'arbre phylogénétique construit sur la base des séquences protéiques *ERD6-like*, que certaines séquences de Monocotylédones montrent une

forte proportion de duplications en tandem par rapport aux séquences de Monocotylédones présentes dans les groupes IIa et IIb. Ces deux derniers groupes contiendraient les copies les plus récentes et ne présentent que très peu de duplications en tandem pour les Monocotylédones. L'inverse est observé pour les Eurosidées, avec une plus forte proportion de copies dupliquées en tandem dans le groupe IIb. En règle générale, le nombre de séquences présentes dans les 3 groupes de l'arbre phylogénétique (figure 19, figure 23), qui est matérialisé par la hauteur des triangles, est le reflet de l'accumulation d'*ERD6-like* dupliqués en tandem. En effet, si le groupe IIb présente le plus de séquences ERD6-like (44,7% du total), cela est dû au fait que : i) ce groupe est spécifique des séquences d'Angiospermes ; ii) le nombre moyen d'ERD6-like identifiés chez les Eudicotylédones est plus important que dans les autres groupes botaniques étudiés de divergence antérieure comme les Monocotylédones iii) ce groupe contient un sous-groupe (IIb3), spécifique des séquences des Vitales, des Solanales et de certains ordres des Eurosidées (Malpighiales, Myrtales, Sapindales, Brassicales et Malvales) qui présentent de nombreuses duplications en tandem. Les duplications dans ces ordres pourraient donc avoir une origine relativement récente et la présence de plusieurs séquences de *Vitis vinifera* à la base du groupe IIb3 permet d'émettre l'hypothèse d'une apparition chez l'ancêtre commun aux Vitales et aux Eurosidées.

Les génomes étudiés contenant le plus de copies *ERD6-like* sont ceux de lin (Linacée, Malpighiale, Eurosidée I, 31 copies) et d'eucalyptus (Myrtacée, Myrtale, Eurosidée I, 37 copies). Pour ces deux espèces, il est fort probable que ce soit l'occurrence de nombreuses duplications segmentales qui ait amené à la forte expansion de la famille de transporteurs de monosaccharides ERD6-like (Wang et al., 2012; Myburg et al., 2014).

Chez les Mésangiospermes, une vague d'évènements de duplications de génomes entiers a eu lieu lors de l'évènement d'extinction à la liaison entre le Crétacé et le Paléogène (K-Pg). La coïncidence de ces WGD et des évènements cataclysmiques est corrélée à la survie des polyploïdes et à leur spéciation (Van de Peer et al. 2017). Les ERD6-like des Mésangiospermes se sont probablement diversifiés à cette époque.

La majorité des copies *ERD6-like* ont une structure à 18 exons (structure 1), qui pourrait être à l'origine de 9 autres types de structures contenant 17 ou 16 exons par fusion d'exons ou délétions d'introns. Ces différents types de structures à 17 et 16 exons ont été identifiés en majorité pour les séquences de Monocotylédones et de Brassicales. Pour ces dernières, le fait que la structure à 18 ne soit retrouvée que dans le groupe IIb et absente des groupes I et IIa est surprenant et en désaccord avec l'hypothèse que la structure à 18 exons soit ancestrale à toutes les autres. Ce qui suggère pour les Brassicacées une évolution plus complexe.

L'analyse des substitutions nucléotidiques chez le genre *Arabidopsis* a révélé que, quel que soit le groupe de l'arbre, auquel appartient un ERD6-like, ou quelle que soit leur structure, tous ces gènes sont en sélection purifiante, c'est-à-dire en faveur de la conservation de la protéine. Une étude effectuée sur 24 loci nucléaires, a déterminé une valeur moyenne de dN/dS de 0,17 entre *A. thaliana* et *A. lyrata* (Wright and Andolfatto 2008). Les auteurs mentionnent que 4 loci ont un dN/dS supérieur ou égal à 0,4, et en déduisent que ces loci subissent une pression de sélection moins importante qui permettrait à ces séquences protéiques d'évoluer rapidement. Dans le cas des *ERD6-like*, le dN/dS moyen entre les espèces *A. thaliana*, *A. lyrata*, *A. halleri* et *C. rubella* est de 0,08 pour le groupe I, de 0,17 pour le groupe IIa et de 0,23 pour le groupe IIb. Ces résultats signifieraient donc que l'évolution des copies du groupe IIa correspond aux observations générales publiées (Wright and Andolfatto 2008), les copies du groupe I sont quant à elles plus conservées et les copies du groupe IIb évoluent plus vite. En incluant à l'étude de dN/dS des séquences d'autres espèces plus éloignées et ayant divergé plus tôt que les Brassicacées, nous pourrions apporter un argument supplémentaire en faveur d'une pression de sélection moins importante, que certains ERD6-like (les copies les plus récentes) subissent, du fait de la présence de nombreuses copies dupliquées en tandem. Au fur et à mesure de l'évolution et des duplications des ERD6-like, la pression de sélection, même si elle reste purifiante, se relâche. Nous pouvons suggérer, comme cela a déjà été démontré pour certaines familles de gènes, que les ERD6-like puissent être préférentiellement retenus lors d'une duplication (Seoighe and Wolfe 1999). Cela laisse entrevoir qu'ils pourraient apporter des avantages évolutifs pour les plantes. Nous pouvons également imaginer que, comme le propose le modèle de duplication du dosage génique (Francino 2004, Innan and Kondrashov 2010), l'augmentation de la quantité d'ERD6-like dans le génome est bénéfique et que les copies dupliqués sont préférentiellement fixées par sélection purifiante. Cela a d'ailleurs été suggéré pour les gènes répondant à des stress environnementaux (Kondrashov et al. 2002). Or, certains transporteurs de sucres de la familles ERD6-like ont été caractérisés chez *A. thaliana* et répondraient à des stress abiotiques comme le froid, la sécheresse et le stress salin (Kiyosue et al. 1998, Seki et al. 2002, Yamada et al. 2010 ; Poschet et al. 2011).

Le génome de la plante modèle *A.thaliana* comprend 19 *ERD6-like*, formant une grande famille multigénique. La suite des travaux de thèse a donc porté sur l'expression des 19 *AtERD6-like*, dans les organes majeurs, afin de déterminer le patron d'expression de ces gènes et déterminer si des différences sensibles de niveau d'expression peuvent être mises en

Tableau 15: niveau d'expression *in silico* de 18 *AtERD6-like* dans différents organes d'*Arabidopsis thaliana*. Les valeurs correspondent à des valeurs d'expression en Log₂, issues de la base de données Geninvestigator. Selon les principes de Geneinvestigator, un gène est considéré comme peu exprimé dans une condition si la valeur en Log₂ est inférieure à 8. Il est considéré comme moyennement exprimé si cette valeur se situe entre 8 et 12 et fortement exprimé pour des valeurs supérieures à 12. Les valeurs en rouge représentent les valeurs d'expression du gène le plus exprimé dans l'organe considéré. Les valeurs en vert représentent les valeurs d'expression du gène le moins exprimé dans l'organe considéré. La valeur représentant la plus haute valeur d'expression pour un gène donné est surlignée en rouge et la valeur représentant la plus faible valeur d'expression pour un gène donné est surlignée en vert.

	Groupe I		Groupe IIa				Groupe IIb									
	B1	IIa1		IIa2	IIb1		IIb2		IIb3		B11					
		B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B9		B10				
	<i>At1G19450</i>	<i>ERDL6</i> <i>At1g75220</i>	<i>ZIF2</i> <i>At2g48020</i>	<i>At3g05150</i>	<i>At5g18840</i>	<i>At1g54730</i>	<i>At4g04750</i>	<i>At4g04760</i>	<i>At3g20460</i>	<i>ESL3</i> <i>At1g08890</i> <i>ESL2</i> <i>At1g08920</i> <i>At1g08900</i>	<i>ESL1</i> <i>At1g08920</i>	<i>ERD6</i> <i>At1g08930</i>	<i>At3g05400</i>	<i>At3g05160</i> <i>At3g05165</i>	<i>SFP1</i> <i>At5g27350</i>	<i>SFP2</i> <i>At5g27360</i>
Structure du gène	3 : 17 exons	2 : 17 exons	x : 16 exons	2 : 17 exons	9 : 16 exons	1 : 18 exons	1 : 18 exons	1 : 18 exons	2 : 17 exons	1 : 18 exons	6 : 17 exons	5 : 17 exons	4 : 17 exons	1 : 18 exons	1 : 18 exons	1 : 18 exons
Cotyledon	13,139	12,658	12,483	8,442	8,965	10,52	9,44	8,537	8,079	11,371	11,737	12,714	9,855	12,043	12,498	10,793
Racine principale	13,363	12,184	12,859	9,332	10,033	9,544	9,306	8,937	10,172	10,136	11,525	12,697	9,243	11,588	11,882	8,98
Racine latérale	13,844	12,636	12,347	10,64	10,669	10,204	9,503	9,849	9,968	11,11	12,736	13,699	9,403	12,496	12,347	9,071
Feuille de rosette	13,781	13,325	12,719	8,337	10,441	10,726	9,335	8,499	7,829	11,641	12,162	14,753	9,466	12,991	13,572	10,47
Feuille jeune	13,195	12,5	12,318	8,2	9,197	10,576	10,402	8,91	8,149	10,791	10,899	13,024	9,263	11,31	11,465	10,543
Feuille adulte	13,247	13,225	12,297	8,232	9,493	10,351	9,628	8,865	8,04	11,682	11,702	14,566	9,616	12,358	12,987	9,924
Feuille sénescence	11,506	11,239	11,921	8,256	9,615	11,092	11,181	8,814	7,716	12,373	13,412	14,96	12,548	13,911	14,522	10,315
Tige de l'inflorescence	13,067	12,53	11,545	8,414	10,351	10,609	9,236	8,921	8,685	10,228	10,74	13,655	10,794	11,778	12,587	10,998
Feuille caulinaire	13,563	12,025	12,915	8,214	8,99	11,465	10,509	8,515	7,854	12,232	11,014	14,803	9,289	12,282	12,499	9,949
Tige axillaire	12,968	11,836	11,739	8,149	8,84	10,998	11,183	9,727	7,689	10,723	10,4	11,918	9,213	10,392	9,567	10,049
Fleur	12,695	11,965	12,039	9,023	9,994	11,184	9,675	9,691	8,56	9,726	10,366	10,56	11,895	11,031	9,915	11,085
pédoncule	12,844	12,546	12,517	8,025	9,778	11,463	9,779	8,806	8,17	10,336	10,29	13,059	12,299	10,931	11,344	11,701
Sépales	13,095	12,512	13,316	8,213	9,769	10,273	8,773	8,588	7,502	11,195	12,349	13,036	13,482	12,073	12,16	10,736
Pétales	12,384	12,367	12,782	8,415	10,067	11,08	9,787	8,817	7,671	10,397	11,364	10,951	13,625	11,267	9,461	11,338
Étamines	12,995	11,781	13,243	10,823	9,28	9,733	8,264	10,05	8,262	9,196	10,817	9,284	10,666	11,512	8,628	10,965
Pollen	15,032	15,89	10,234	17,065	9,551	9,178	9,045	9,954	9,106	9,124	9,741	9,594	9,41	12,11	9,226	9,442
Pistil	12,339	11,9	11,383	8,15	8,956	10,744	9,613	7,99	8,316	8,804	9,87	9,576	10,51	10,823	9,203	9,237
Ovule	11,034	12,106	11,419	7,9	11,898	9,921	7,909	8,721	8,452	9,765	11,632	9,024	10,281	10,504	8,639	9,991
Silique	13,58	12,72	12,322	8,56	11,099	9,936	8,667	9,538	8,983	9,877	12,574	11,368	14,032	12,27	12,998	11,043
Graine	12,502	12,965	10,695	9,421	10,271	10,675	8,179	9,632	8,253	9,585	9,91	11,008	10,307	11,664	9,258	9,531
Embryon	11,822	11,641	9,224	8,75	8,498	9,406	7,108	7,593	7,732	7,873	7,613	9,776	7,962	10,71	7,918	10,312
Suspenseur	9,826	11,678	10,328	8,387	8,12	8,575	7,759	7,715	8,397	8,243	8,444	7,822	8,102	8,909	7,959	8,057
Moyenne	12,810	12,465	11,938	9,043	9,722	10,375	9,286	8,940	8,345	10,291	10,968	11,902	10,512	11,589	10,938	10,206

relation avec leur appartenance à un des 3 groupes déterminés sur l'arbre phylogénétique (I, IIa et IIb). Les différences d'expression pourraient alors refléter des rôles différents des ERD6-like dans la plante, comme supposé après l'analyse de l'évolution de ces transporteurs chez les Embryophytes.

2 Expression des gènes *AtERD6-like* dans différents organes d'*A. thaliana*

2.1 Données d'expression *in silico*, collectée dans la base de données Genevestigator

Pour commencer l'analyse de l'expression des *ERD6-like* dans différents organes chez *A. thaliana*, une étude *in silico* a été réalisée, à partir des résultats regroupés dans la base de données Genevestigator. Ces données sont pour la plupart issues de microarrays.

Il est nécessaire de noter qu'aucune donnée d'expression n'est disponible pour *At1g05155* sur la base de données Genevestigator tout comme sur la base de données BAR Toronto. Ceci est dû au fait qu'aucun couple d'amorces spécifique n'a pu être défini. De plus, il s'agit vraisemblablement d'un *ERD6-like* tronqué car il est constitué uniquement de 13 exons au lieu de 17 ou 18 (voir la partie structure introns/exons des *ERD6-like*). Il pourrait donc s'agir d'un pseudogène. Par ailleurs, les gènes dupliqués en tandem *At1g05160* et *At1g05165* ainsi que *At1g08890* et *At1g08900* n'ont pu être discriminés l'un par rapport à l'autre au sein du tandem respectif.

Le tableau 15 résume l'ensemble des données d'expression collectées pour les principaux organes d'*Arabidopsis*. Dans ce tableau, l'expression est considérée comme significativement élevée si les valeurs sont supérieures à 12 (en Log2), moyenne si elles sont comprises entre 8 et 12 et faible si elles sont en dessous de 8 (seuils définis par Genevestigator). Les données collectées mettent en évidence que tous les gènes de la famille ERD6-like sont moyennement à fortement exprimés dans trois organes (inflorescences, rosettes et racines), ainsi que dans les plantules entières au stade germination, puisque peu de valeurs sont inférieures à 8. Toutefois, les gènes *At1g19450* et *At1g08930* sont les deux gènes les plus fortement exprimés dans pratiquement tous les organes. Les gènes *At1g75220* et *At2g48020* sont également fortement exprimés dans tous les organes. A l'inverse, les gènes *At4g04760* et *At3g20460* semblent être les deux gènes les moins exprimés. *At3g20460* est le

gène le plus faiblement exprimé dans la majorité des organes testés. Dans les cotylédons et les racines, *At1g19450* présente le plus fort niveau d'expression mais les gènes *At1g75220*, *At2g48020*, *At1g08930* et *At5g27350* sont également fortement exprimés. Dans les racines, très peu de différences sont observables pour l'expression des différents gènes entre les racines principales et les racines latérales. Dans les feuilles de rosettes, les mêmes gènes sont exprimés auxquels se rajoutent *At1g08920*, *At1g08890/At1g08900* et *At3g05160/At3g05165*. Les gènes *At1g08890/At1g08900*, *At1g08920*, *At1g08930*, *At3g05160/At3g05165* et *At5g27350* présentent une plus forte expression dans les feuilles sénescentes que dans les feuilles aux autres stades de développement et tous les autres organes. *At1g08930* est le gène globalement le plus expression dans les feuilles de rosette et sa plus forte expression est détectée dans les feuilles de rosette en sénescence. Ce gène est aussi fortement exprimé dans les racines, dans les tiges des inflorescences dans les pédoncules et les sépales des fleurs mais plus faiblement dans tous les organes reproducteurs. *At1g08930* semble donc être plus exprimé dans les organes chlorophylliens et les racines que dans les organes reproducteurs. Dans les parties stériles de la fleur, les gènes fortement exprimés sont *At1g19450*, *At1g75220*, *At2g48020*, *At1g08930* et *At3g5400*. Dans les organes reproducteurs, les gènes *At1g19450*, *At1g75220* et *At3g05150* sont les trois gènes les plus exprimés dans les grains de pollen. *At1g19450* et *At1g75220* sont les deux gènes les plus fortement exprimés dans le pistil et les ovules. Dans les siliques, le gène *At3g05400* est le plus exprimé mais les gènes *At1g19450*, *At1g75220*, *At2g48020*, *At1g08920*, *At3g05160/At3g05165*, *At5g27350* et *At3g27360* sont aussi exprimés assez fortement. Enfin dans la graine, et en particulier dans l'embryon et le suspenseur, les gènes du groupe I (*At1g19450* et *At1g75220*) sont les plus fortement exprimés, alors que tous les autres *ERD6-like* sont les plus faiblement exprimés.

Pour compléter cette analyse *in silico*, les données d'expression des gènes *ERD6-like*, dans des conditions de perturbations (développement ou contraintes abiotiques) ont également été collectées. Les données les plus marquantes sont présentées dans l'annexe 2. Ces données montrent qu'au cours d'un processus de germination *in vitro*, les gènes *At1g19450*, *At1g54730* et *At1g08930* sont induits après 48h de stratification c'est-à-dire lorsque les graines sont incubées sur milieu MS avec 3% de saccharose pendant 48h à 4°C. A l'inverse dans les mêmes conditions le gène *At1g75220* est réprimé. Les gènes *At3g05150* et *At3g05400* sont eux induits après 12h de germination à la lumière et les gènes *At4g04750*, *At3g20460* et *At1g08920* le sont plus tardivement après 48h de germination. A l'inverse le gène *At1g54730* est réprimé à partir 12 h de germination. Ces données montrent d'une part

que 9 gènes *AtERD6-like* sont vraisemblablement régulés lors du processus de germination et d'autre part que leurs régulations peuvent être différentes et que ces gènes peuvent être exprimés à différents moments du processus de germination. Il est intéressant de noter que les deux gènes du groupe I, issus d'une duplication segmentale, ne répondent pas de la même façon : l'un est induit (*At1g19450*) par la stratification alors que le second (*At1g75220*) est réprimé. De même, les deux gènes dupliqués en tandem *At1g08920* et *At1g08930* présentent une réponse différente, le premier étant induit après 48h de germination alors que le deuxième est induit après 48h de stratification.

D'autres perturbations montrent également des différences pour ces deux paires de gènes dupliqués. Pour les gènes du groupe I, le gène *At1g19450* semble être induit par les températures inférieures à 10°C dans certaines conditions et par le glucose alors que le gène *At1g75220* est réprimé par ces deux conditions. Dans le cas des gènes *At1g08920* et *At1g08930*, l'hypoxie et l'obscurité sont deux facteurs qui induisent l'expression d'*At1g08930* mais qui ne semblent pas avoir de conséquence sur l'expression d'*At1g08920*. A l'inverse, le stress salin, l'ABA et les brassinostéroïdes induisent *At1g08920* et ne semblent pas avoir d'effet important sur l'expression d'*At1g08930*. Pour la paire *At5g27350* et *At5g27360*, l'ABA et les brassinostéroïdes induisent *At5g27350* et ne semblent pas modifier l'expression d'*At5g27360*. De plus, seul *At5g27350* semble induit lors de la croissance du tube pollinique si la germination est réalisée *in vivo*. Toutes ces observations mettent en évidence des différences de régulation de l'expression des gènes dupliqués en tandem et pointent donc des différences fonctionnelles pour les ERD6-like.

De façon surprenante, les données collectées dans des conditions de déficit hydrique, ne permettent pas de conclure de façon fiable à la régulation des gènes *ERD6-like* par ce stress. Considérant que les données d'expression décrites précédemment ont été obtenues dans des conditions différentes de celles qui seront utilisées dans notre étude, nous avons, dans un premier temps, cartographié le niveau d'expression de l'ensemble des *ERD6-like* dans les différents organes d'*A. thaliana* cultivées dans nos conditions normal d'arrosage, avant d'étudier l'expression de ces gènes en conditions de déficit hydrique.

2.2 Cartographie de l'expression de 17 *AtERD6-like* dans les feuilles, racines, boutons floraux, fleurs et siliques d'*A. thaliana* en conditions normales d'arrosage

Afin de déterminer, dans nos conditions de cultures, les niveaux d'expression des *ERD6-like* dans divers organes d'*A. thaliana*, des feuilles, racines, boutons floraux, fleurs et siliques

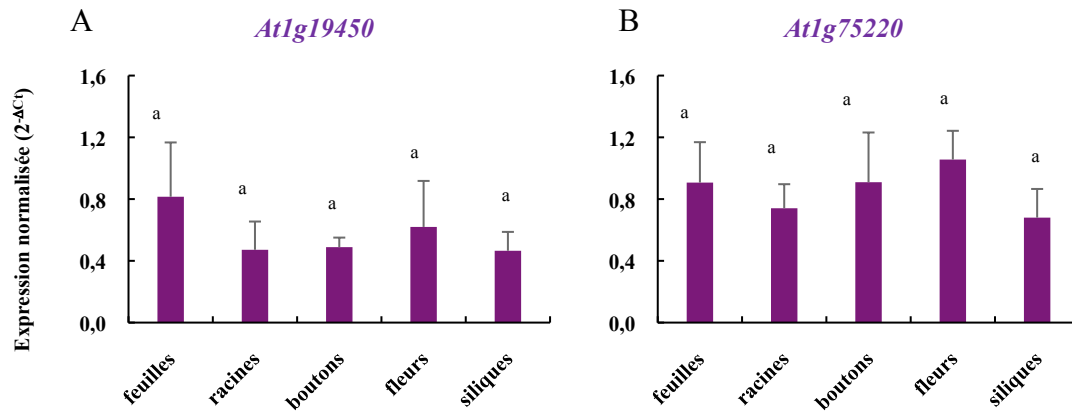


Figure 33: expression relative des deux *ERD6-like* du groupe I de l'arbre phylogénétique. Les valeurs représentées sont les valeurs d'expression normalisée par rapport à *AtPP2a*. Chaque valeur représente la moyenne de 3 répétitions biologiques (\pm écart-type). Des tests de Kruskal Wallis ont été effectués suivis de test de comparaisons multiples de Dunn corrigé par Bonferroni. Les valeurs statistiquement différentes sont représentées par des lettres différentes (p.value < 0,05).

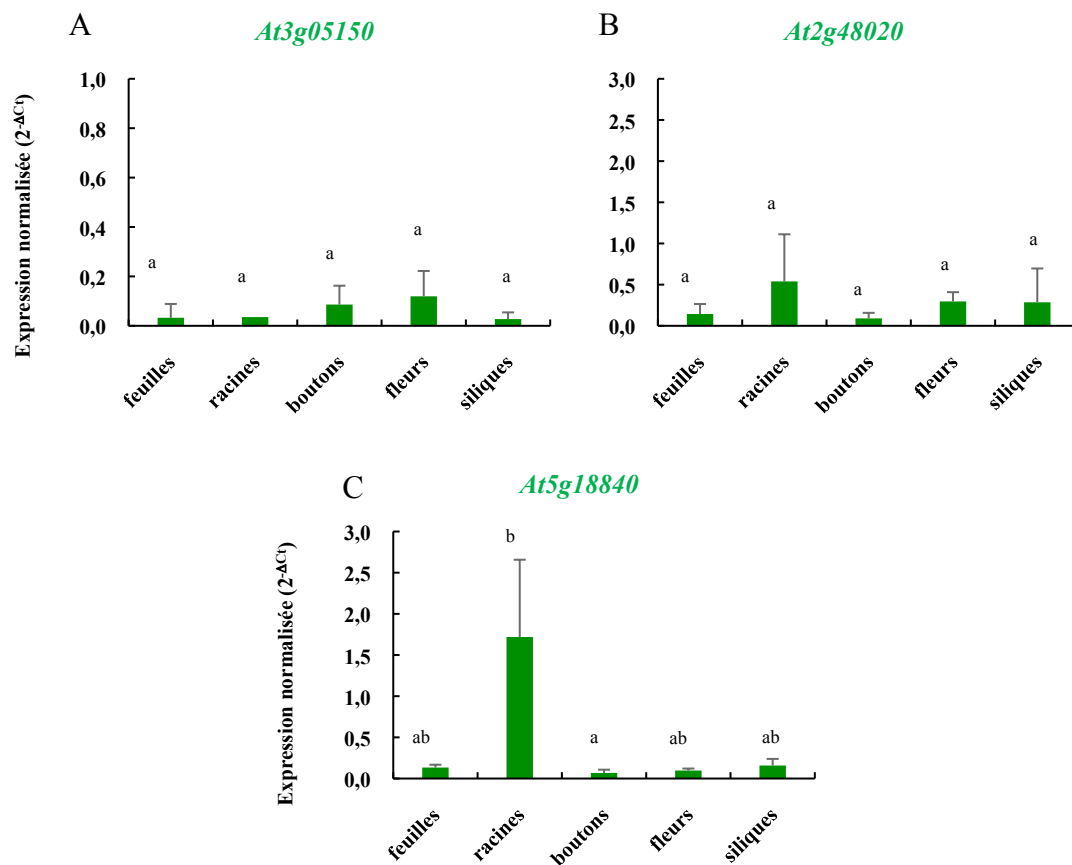


Figure 34 : expression relative des trois *ERD6-like* du groupe IIa de l'arbre phylogénétique. Les valeurs représentées sont les valeurs d'expression normalisée par rapport à *AtPP2a*. Chaque valeur représente la moyenne de 3 répétitions biologiques (\pm écart-type). Des tests de Kruskal Wallis ont été effectués suivis de test de comparaisons multiples de Dunn corrigé par Bonferroni. Les valeurs statistiquement différentes sont représentées par des lettres différentes (p.value < 0,05).

ont été prélevées sur des plantes normalement arrosées pour extraire des ARNs totaux et déterminer l'expression par RT-qPCR en utilisant le gène *AtPP2a* comme gène de ménage. L'expression d'*AtPP2a* est stable dans toutes les conditions testées lors des études d'expression par RT-qPCR. Il est important de noter que le gène *At1g05155* n'a pas pu être amplifié par RT-qPCR, ce qui corrobore les données de Genevestigator et conforte l'hypothèse qu'il pourrait s'agir d'un pseudogène. De façon similaire, le gène *At1g05165* n'a pas pu être analysé car aucun des 2 couples d'amorces établis n'a permis de déterminer une expression spécifique de ce gène (Cf § Matériels et Méthodes). Considérant que ces deux gènes sont positionnés en tandem sur le chromosome 3 avec le gène *At3g05160*, pour lequel l'expression a pu être étudiée, l'absence de détection de transcrits suggère fortement qu'*At5g05165* pourraient constituer un pseudogène également. Ainsi l'analyse de l'expression dans les différents organes n'a pu être réalisée que pour 17 gènes.

2.2.1 Comparaison du niveau d'expression de chaque gène dans les 5 organes testés

At1g19450 et *At1g75220*, les 2 *ERD6-like* du groupe I de l'arbre, sont exprimés chacun de façon constante dans tous les organes (figure 33 A et B). *At1g19450* et *At1g75220* ont une expression relative moyenne, dans les 5 organes testés de $0,57 \pm 0,24$ (figure 33 A) et de $0,86 \pm 0,24$ (figure 33 B), respectivement.

Dans le groupe IIa, les gènes *At1g05150* et *At1g48020* sont exprimés chacun de façon constante dans tous les organes (figure 34 A et B), tandis que *At1g18840* présente un niveau d'expression variable en fonction des organes (figure 34 C). *At1g05150* a une expression relative moyenne, dans les 5 organes testés de $0,06 \pm 0,07$ (figure 34 A) alors que celle de *At2g48020* est de $0,27 \pm 0,32$ (figure 34 B). *At1g18840* est significativement plus exprimé dans les racines que dans les feuilles, boutons floraux, fleurs et siliques (figure 34 C). Il est 15,7 fois plus exprimé dans les racines ($1,72 \pm 0,93$) que dans tous les autres organes testés (moyenne = $0,11 \pm 0,06$).

Les *ERD6-like* du groupe IIb présentent une hétérogénéité de niveaux d'expression relative dans chacun des organes testés (figure 35). En effet, seuls 2 *ERD6-like* sur les 12 gènes du groupe IIb analysés (*At1g54730* et *At3g20460*), sont exprimés de façon constante

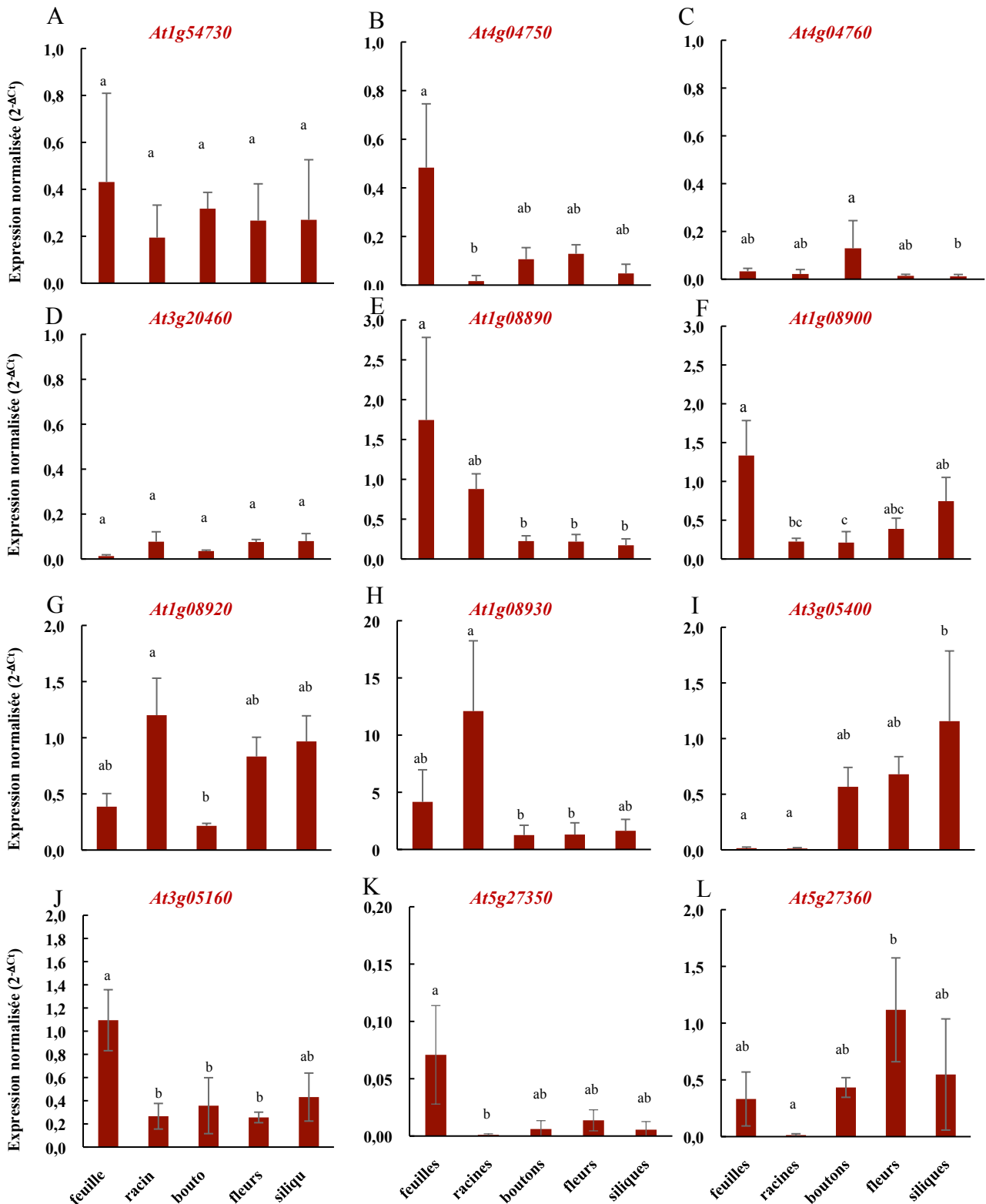


Figure 35 : expression relative de douze *ERD6-like* du groupe IIb de l'arbre phylogénétique. Les valeurs représentées sont les valeurs d'expression normalisée par rapport à *AtPP2a*. Chaque valeur représente la moyenne de 3 répétitions biologiques (\pm écart-type). Des tests de Kruskal Wallis ont été effectués suivis de test de comparaisons multiples de Dunn corrigé par Bonferroni. Les valeurs statistiquement différentes sont représentées par des lettres différentes. L'expression de *At1g05165* n'a pas pu être analysée car il n'a pas été possible de définir un couple d'amorces spécifique. L'expression de *At1g05155* (gène tronqué) n'a pas pu être analysée car aucun produit d'amplification n'a été détecté.

dans tous les organes. *At1g54730* (figure 35 A) et *At3g20460* (figure 35 D) ont une expression relative moyenne, dans les 5 organes testés de $0,30 \pm 0,21$ et de $0,06 \pm 0,04$, respectivement.

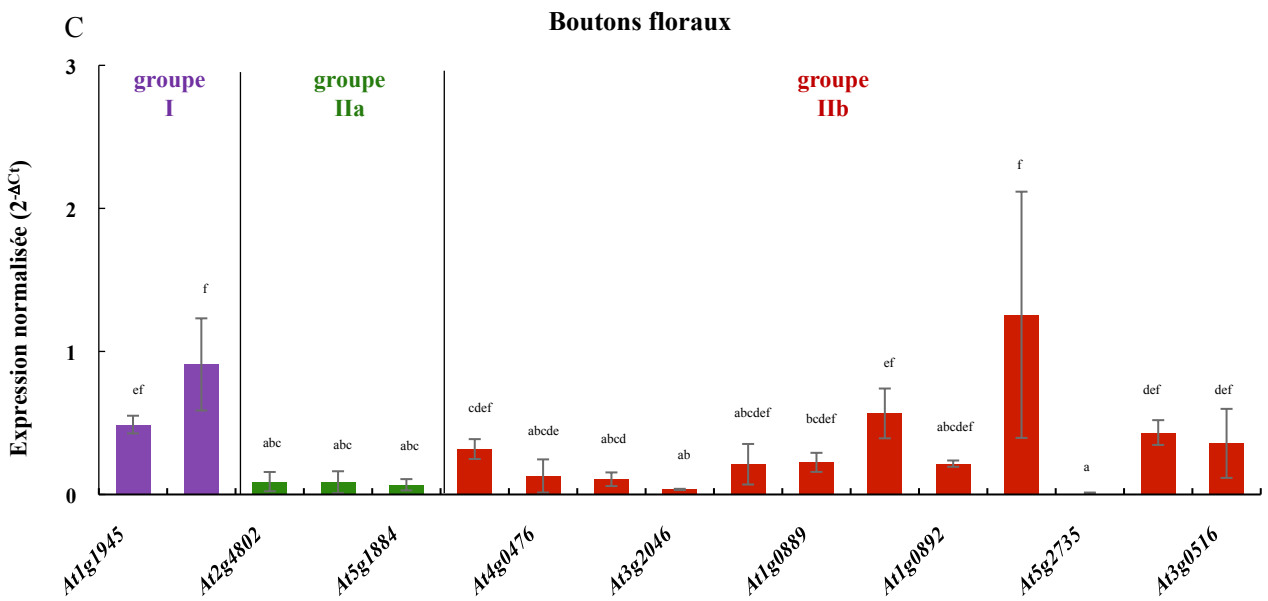
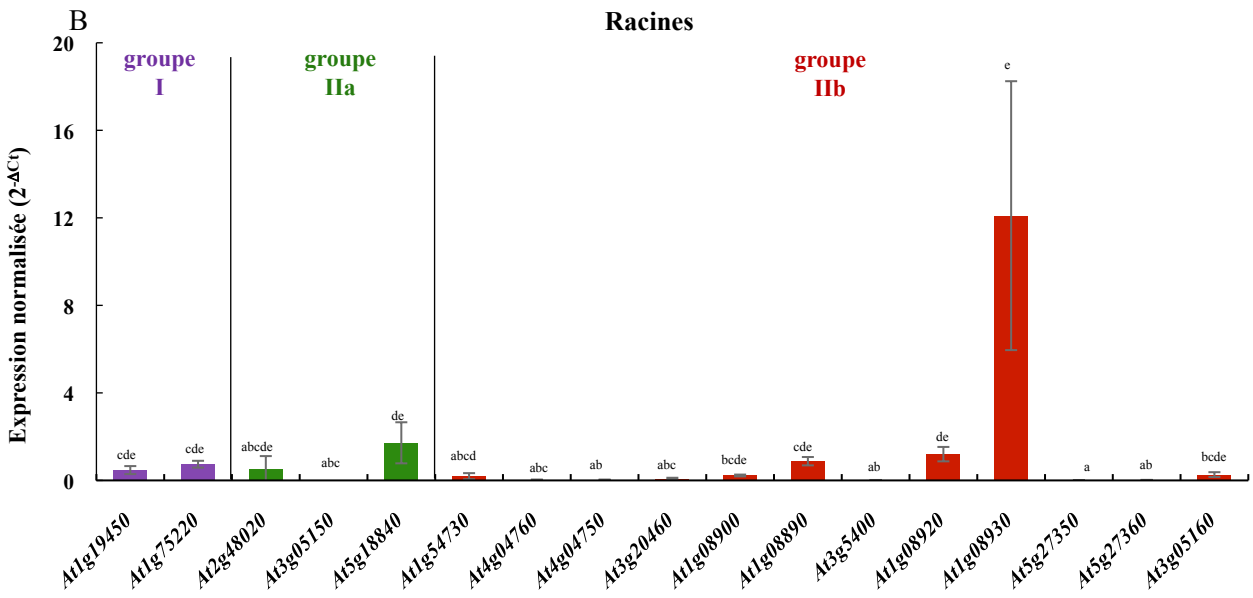
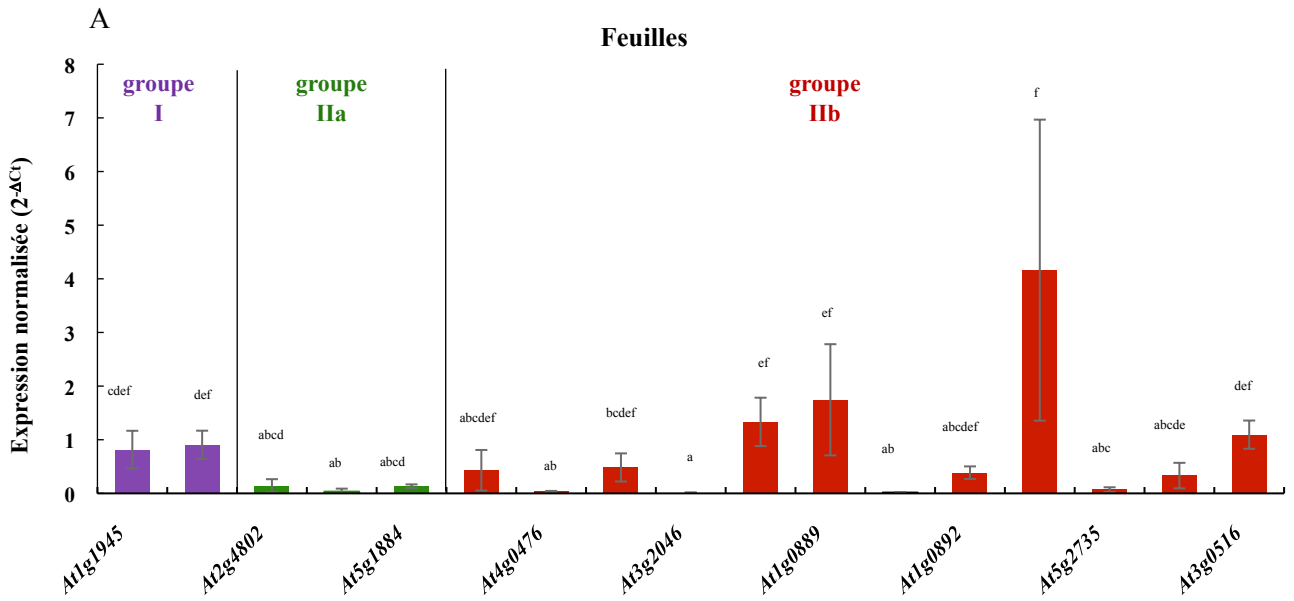
Deux gènes présentent une plus forte expression dans les racines. *At1g08920* (figures 35 G) est 2 fois plus exprimé dans les racines que dans les autres organes ($1,20 \pm 0,33$ contre $0,60 \pm 0,35$). Il est toutefois assez fortement exprimé dans les fleurs et les siliques. *At1g08930* (figures 35 H) est 5,8 fois plus exprimé dans les racines que dans les autres organes ($12,10 \pm 6,14$ contre $2,09 \pm 1,88$). Il est toutefois fortement exprimé dans les feuilles ($4,16 \pm 2,80$) et plus faiblement dans les organes reproducteurs. C'est le gène le plus fortement exprimé dans tous les organes.

At1g08890 (figure 35 E) est plus exprimé dans les organes végétatifs ($1,31 \pm 0,82$) que dans les organes reproducteurs ($0,20 \pm 0,07$). Son expression est plus élevée dans les feuilles ($1,74 \pm 1,03$) que dans les racines ($0,88 \pm 0,19$).

Quatre autres gènes sont plus fortement exprimés dans les feuilles que dans les autres organes. Il s'agit de *At4g04750*, *At1g08900*, *At1g05160* et *At5g27350*. *At1g04750* (figures 35 B). *At4g04750* est 6,9 fois plus exprimé dans les feuilles que dans les autres organes ($0,48 \pm 0,26$ contre $0,07 \pm 0,008$), toutefois son expression est relativement faible. *At1g08900* (figures 35 F) est 3,4 fois plus exprimé dans les feuilles que dans les autres organes ($1,33 \pm 0,45$ contre $0,39 \pm 0,27$). *At1g05160* (figures 35 J) est 3,3 fois plus exprimé dans les feuilles que dans les autres organes ($1,09 \pm 0,26$ contre $0,33 \pm 0,16$). *At5g27350* (figures 35 K) est 10 fois plus exprimé dans les feuilles que dans les autres organes ($0,07 \pm 0,04$ contre $0,007 \pm 0,008$), toutefois son expression est très faible.

Enfin, trois gènes sont plus fortement exprimés dans les organes reproducteurs. *At4g04760* (figure 35 C) est 6,5 fois plus exprimé dans les boutons floraux que dans les autres organes ($0,13 \pm 0,12$ contre $0,02 \pm 0,01$), toutefois son expression est relativement faible. *At3g05400* (figure 35 I) est plus exprimé dans tous les organes reproducteurs testés ($0,80 \pm 0,43$) que dans les organes végétatifs ($0,014 \pm 0,008$). Son expression est la plus forte dans les siliques. *At5g27360* (figure 35 L) est 3,4 fois plus exprimé dans les fleurs ($1,12 \pm 0,46$) que dans les autres organes ($0,33 \pm 0,31$). Il est exprimé à un niveau moyen dans les feuilles, les boutons floraux et les siliques.

2.2.2 Comparaison du niveau d'expression des différents *AtERD6*-like dans chacun des 5 organes testés



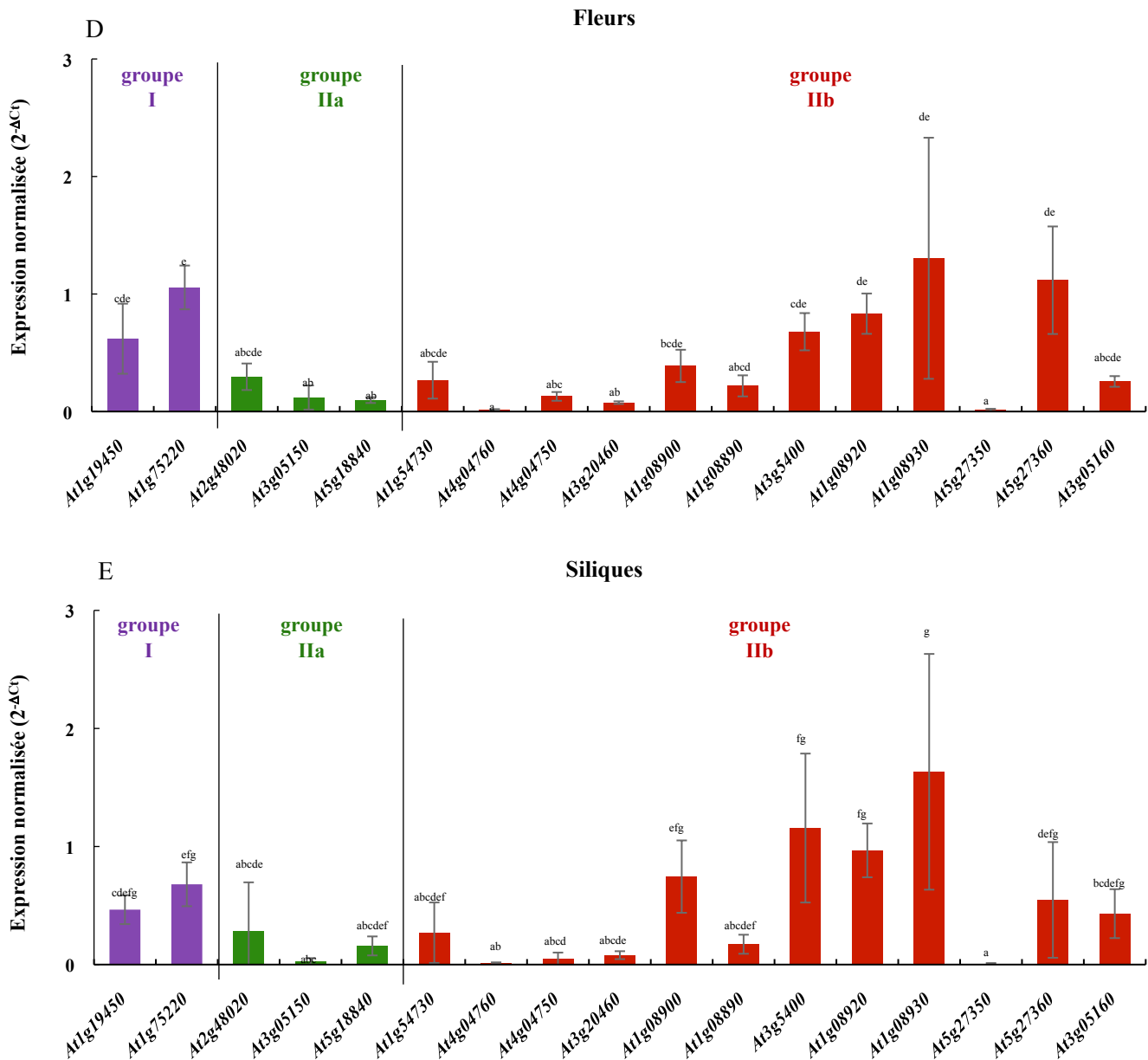


Figure 36 : expression relative de dix-sept *ERD6-like* dans les feuilles, les racines, les boutons floraux, les fleurs et les siliques d'*Arabidopsis thaliana*. Les valeurs représentées sont les valeurs d'expression normalisée par rapport à *AtPP2a*. Chaque valeur représente la moyenne de 3 répétitions biologiques (\pm écart-type). Des tests de Kruskal Wallis ont été effectués suivis de test de comparaisons multiples de Dunn corrigé par Bonferroni. Les valeurs statistiquement différentes sont représentées par des lettres différentes. L'expression de *At1g05165* n'a pas pu être analysée car il n'a pas été possible de définir un couple d'amorces spécifique. L'expression de *At1g05155* (gène tronqué) n'a pas pu être analysée car aucun produit d'amplification n'a été détecté.

Pour comparer plus facilement le niveau d'expression des gènes qui s'expriment dans chacun des organes testés, les mêmes données d'expression ont été représentées par organe dans la figure 36.

Dans les feuilles (figure 36 A), les gènes du groupe I, *At1g19450* et *At1g75220* ont un niveau d'expression relative moyen et semblable (respectivement $0,82 \pm 0,35$ et $0,91 \pm 0,26$). Les gènes du groupe IIa, *At1g05150*, *At2g48020* et *At5g18840* ont également un niveau d'expression semblable entre eux (respectivement $0,03 \pm 0,06$, $0,14 \pm 0,12$ et $0,13 \pm 0,03$) mais plus faible que celui des gènes du groupe I. Ces trois gènes du groupe IIa sont 6,5 fois moins exprimés que les 2 gènes du groupe I (en moyenne $0,14 \pm 0,11$ contre $0,91 \pm 0,26$). L'hétérogénéité des niveaux d'expression pour les *AtERD6-like* du groupe IIb est facilement visualisée avec ce type de représentation. *At3g20460* est l'*ERD6-like* du groupe IIb le moins exprimé dans les feuilles ($0,01 \pm 0,005$). *At1g08930* est l'*ERD6-like* du groupe IIb le plus exprimé dans les feuilles ($4,71 \pm 2,32$). *At3g20460* est donc 471 fois moins exprimé qu'*At1g08930* dans les feuilles. Les 10 autres *ERD6-like* du groupe IIb analysés ont des niveaux d'expression relative variés dans les feuilles allant de $0,03 \pm 0,01$ pour *At1g04760* à $1,74 \pm 1,03$ pour *At1g08890*. La moyenne des valeurs d'expression pour tous les gènes exprimés dans les feuilles est égale à 0,71 et 6 *ERD6-like* sur les 17 analysés ont des valeurs d'expression supérieures à cette moyenne. Il s'agit d'*At1g19450* ($0,82 \pm 0,35$) et *At1g75220* ($0,91 \pm 0,26$) du groupe I, *At1g08890* ($1,74 \pm 1,03$), *At1g08900* ($1,33 \pm 0,33$), *At1g08930* ($4,71 \pm 2,32$) et *At3g05160* du groupe IIb. Les 3 gènes les plus exprimés sont *At1g08930*, et le tandem *At1g08890/At1g08900* du groupe IIb.

Dans les racines (figure 36 B, tableau 15), les gènes du groupe I, *At1g19450* et *At1g75220* ont un niveau d'expression relative semblable (respectivement $0,47 \pm 0,18$ et $0,74 \pm 0,16$). Dans le groupe IIb, le gène *At5g18840* est 43 fois plus exprimé qu'*At1g05150* et 3,2 fois plus exprimé qu'*At2g48020* ($1,72 \pm 0,94$ contre 0,04 pour *At1g05150* et $0,54 \pm 0,57$ pour *At2g48020*). Il y a, comme pour les feuilles, une hétérogénéité des niveaux d'expression pour les *ERD6-like* du groupe IIb. *At5g27350* est l'*ERD6-like* du groupe IIb le moins exprimé dans les racines ($0,001 \pm 0,0009$). *At1g08930* est l'*ERD6-like* du groupe IIb le plus exprimé dans les racines ($12,1 \pm 6,14$). *At5g27350* est 12100 fois moins exprimé qu'*At1g08930* dans les racines. *At5g27350* et *At1g08930* peuvent donc être considéré, respectivement, comme très faiblement exprimé et très fortement exprimé dans les racines. Les 10 autres *ERD6-like* du groupe IIb analysés ont des niveaux d'expression relative variés dans les racines allant de $0,013 \pm 0,011$ pour *At5g27360* à $1,20 \pm 0,33$ pour *At1g08920*. La moyenne des valeurs

d'expression pour tous les gènes exprimés dans les racines est égale à 1,09 et 3 *AtERD6-like* sur les 17 analysés sont plus exprimés que cette moyenne. Il s'agit d'*At5g18840* ($1,72 \pm 0,94$) du groupe IIa, et du tandem *At1g08920 / At1g08930* ($12,1 \pm 6,14 / 1,20 \pm 0,33$) du groupe IIb.

Dans les boutons floraux (figure 36 C), les gènes du groupe I, *At1g19450* et *At1g75220* ont un niveau d'expression relative à peu près semblable (respectivement $0,49 \pm 0,06$ et $0,91 \pm 0,32$), même si *At1g75220* semble un peu plus fortement exprimé. Les gènes du groupe IIa, *At1g05150*, *At2g48020* et *At5g18840* ont un niveau d'expression semblable entre eux mais nettement plus faible que celui des gènes du groupe I (respectivement $0,09 \pm 0,07$, $0,09 \pm 0,07$ et $0,07 \pm 0,04$). Ces trois gènes du groupe IIa sont 13 fois moins exprimés que les 2 gènes du groupe I (en moyenne $0,07 \pm 0,04$ contre $0,91 \pm 0,32$). Il y a, comme pour les feuilles et les racines, une hétérogénéité du niveau d'expression des *ERD6-like* du groupe IIb dans les boutons floraux. *At3g27350* est l'*ERD6-like* du groupe IIb le moins exprimé dans les boutons floraux ($0,006 \pm 0,007$). *At1g08930* est l'*ERD6-like* du groupe IIb le plus exprimé dans les boutons floraux ($1,26 \pm 0,86$). *At5g27350* est 210 fois moins exprimé qu'*At1g08930* dans les boutons floraux. *At5g27350* peut donc être considéré comme très faiblement exprimé alors qu'*At1g08930* est très fortement exprimé dans les boutons floraux. Les 10 autres *ERD6-like* du groupe IIb analysés ont des niveaux d'expression relative variés dans les boutons floraux allant de $0,04 \pm 0,004$ pour *At3g20460* à $0,57 \pm 0,17$ pour *At3g05400*. Les 3 gènes les plus exprimés dans les boutons floraux sont *At1g08930* ($1,26 \pm 0,86$), *At1g75220* ($0,91 \pm 0,32$) et *At3g05400* ($0,57 \pm 0,17$). *At1g75220* fait partie du groupe I, et *At1g08930* et *At1g05400* font partie du groupe IIb. La moyenne des valeurs d'expression pour tous les gènes exprimés dans les boutons floraux est égale à 0,32 et 6 *ERD6-like* sur les 17 analysés sont plus exprimés que la moyenne. Il s'agit d'*At1g19450* et *At1g75220* du groupe I, d'*At1g08930*, *At1g05400*, *At1g05160* et *At5g27360* du groupe IIb. *At1g54730* du groupe IIb a une expression relative égale à la moyenne.

Dans les fleurs (figure 36 D), les gènes du groupe I, *At1g19450* et *At1g75220* ont un niveau d'expression relative significativement différent (respectivement $0,62 \pm 0,30$ et $1,06 \pm 0,19$). *At1g75220* est 1,7 fois plus exprimé dans les fleurs qu'*At1g19450*, ce qui reste modéré. Les gènes du groupe IIa, *At1g05150*, *At2g48020* et *At5g18840* ont un niveau d'expression semblable (respectivement $0,12 \pm 0,10$; $0,30 \pm 0,11$ et $0,10 \pm 0,02$) plus faible que celui des gènes du groupe I. *At2g48020* est toutefois 3 fois plus exprimé qu'*At1g05150* et *At5g18840*, même si ces résultats ne sont pas forcément significatifs au vu des écarts types et des valeurs

Tableau 16: expression des *ERD6-like* selon leur niveau d'expression relative par rapport à l'expression moyenne de tous les *ERD6-like* dans chacun des organes testés. Les valeurs indiquées pour chaque gène correspondent à la variation par rapport à la moyenne en $2^{-\Delta Ct}$ de toutes les valeurs d'expression relative calculées pour tous les gènes *ERD6-like* dans l'organe considéré. Cette moyenne est égale à 0,71 dans les feuilles, 1,09 dans les racines, 0,32 dans les boutons floraux, 0,44 dans les fleurs et 0,45 dans les siliques. Les valeurs d'expression relative sur fond rouge indique que l'expression du gène considéré est supérieure à la moyenne de tous les *ERD6-like*, dans l'organe indiqué. Les valeurs d'expression relative sur fond vert indique que l'expression du gène considéré est inférieure à la moyenne de tous les *ERD6-like*, dans l'organe indiqué. Les valeurs d'expression relative sur fond noir indique que l'expression du gène considéré est égale à la moyenne, dans l'organe indiqué.

	Groupe I		Groupe IIa			Groupe IIb											
			IIa1		IIa2	IIb1		IIb2			IIb3						
	B1	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B6	B7	B8	B8	B9	B9	B10	B11	B11	B11
	<i>At1g19450</i>	<i>At1g75220</i>	<i>At2g48020</i>	<i>At3g05150</i>	<i>At1g18840</i>	<i>At1g54730</i>	<i>At4g04750</i>	<i>At4g04760</i>	<i>At3g20460</i>	<i>At1g08890</i>	<i>At1g08900</i>	<i>At1g08920</i>	<i>At1g08930</i>	<i>At3g05400</i>	<i>At3g05160</i>	<i>At5g27350</i>	<i>At5g27360</i>
Feuilles	0.11	0.2	-0.68	-0.56	-0.57	-0.28	-0.23	-0.68	-0.7	1.03	0.62	-0.32	4	-0.69	0.39	-0.64	-0.38
Racines	-0.62	-0.35	-1.02	-1.05	0.63	-0.9	-1.07	-1.07	-1.01	-0.21	-0.86	0.11	11.01	-1.08	-0.82	-1.08	-1.07
Boutons floraux	0.17	0.59	-0.25	-0.23	-0.25		-0.21	-0.19	-0.28	-0.09	-0.11	-0.1	0.94	0.25	0.04	-0.31	0.11
Fleurs	0.18	0.62	-0.14	-0.32	-0.34	-0.17	-0.31	-0.43	-0.36	-0.22	-0.05	0.39	0.86	0.24	-0.18	-0.43	0.68
Siliques	0.02	0.25	-0.16	-0.42	-0.28	-0.18	-0.43	-0.44	-0.37	-0.28	0.3	0.52	1.18	0.71	-0.02	-0.44	0.1

Echelle de variation 0 0.02 0.04 0.06 0.08 0.1 0.12 0.14 0.16 0.18 >0.2
 Supérieure à 0
 Inférieure à 0

faibles d'expression relative. Il y a, comme pour les feuilles, les racines et les boutons floraux, une hétérogénéité du niveau d'expression relative des *ERD6-like* du groupe Iib dans les fleurs. *At5g27350* et *At4g04760* sont les *ERD6-like* du groupe Iib les moins exprimés dans les fleurs ($0,01 \pm 0,009$). *At1g08930* est l'*ERD6-like* du groupe Iib le plus exprimé dans les fleurs ($1,30 \pm 1,03$). *At5g27350* est 130 fois moins exprimé qu'*At1g08930* dans les fleurs. *At5g27350* peut donc être considéré comme très faiblement exprimé dans les fleurs alors qu'*At1g08930* est très fortement exprimé dans les fleurs. Les 10 autres *ERD6-like* du groupe Iib analysés ont un niveau d'expression relative varié dans les fleurs allant de $0,01 \pm 0,006$ pour *At4g04760* à $1,12 \pm 0,46$ pour *At5g27360*. Les 3 gènes les plus exprimés dans les fleurs sont *At1g08930* ($1,30 \pm 1,03$), *At5g27360* ($1,12 \pm 0,46$) et *At1g75220* ($1,06 \pm 0,19$). D'après les résultats présentés en figure 36 D, l'*ERD6-like* le plus exprimé dans les fleurs ne serait pas *At1g08930* ($1,30 \pm 1,03$) mais *At1g75220* ($1,06 \pm 0,19$) dont l'expression relative bénéficie d'un écart type beaucoup plus faible. La moyenne des valeurs d'expression pour tous les gènes exprimés dans les fleurs est égale à 0,44 et 6 *ERD6-like* sur les 17 analysés sont plus exprimés que la moyenne. Il s'agit d'*At1g19450* et *At1g75220* du groupe I, du tandem *At1g08920/At1g08930* du groupe Iib, d'*At1g05400* et *At5g27360* du groupe Iib.

Dans les siliques (figure 36 E), les gènes du groupe I, *At1g19450* et *At1g75220* ont un niveau d'expression relative semblable (respectivement $0,47 \pm 0,12$ et $0,70 \pm 0,18$). Les gènes du groupe Iia, *At1g05150*, *At2g48020* et *At5g18840* ont un niveau d'expression semblable (respectivement $0,03 \pm 0,03$, $0,29 \pm 0,42$ et $0,16 \pm 0,08$). *At2g48020* est toutefois 3 fois plus exprimé qu'*At1g05150* et 6 fois plus qu'*At5g18840*, même si ces résultats ne sont pas forcément significatifs au vu des écarts types et des valeurs faibles d'expression relative. Il y a, comme pour les feuilles, les racines les boutons floraux et les fleurs, une hétérogénéité du niveau d'expression relative pour les *ERD6-like* du groupe Iib dans les siliques. *At5g27350* est l'*ERD6-like* du groupe Iib le moins exprimé dans les siliques ($0,006 \pm 0,008$). *At1g08930* est l'*ERD6-like* du groupe Iib le plus exprimé dans les fleurs ($1,63 \pm 1,00$). *At5g27350* est 271 fois moins exprimé qu'*At1g08930* dans les siliques. *At5g27350* peut donc être considéré comme très faiblement exprimé dans les fleurs alors qu'*At1g08930* est très fortement exprimé dans les siliques. Les 10 autres *ERD6-like* du groupe Iib analysés ont des niveaux d'expression relative variés dans les siliques allant de $0,012 \pm 0,007$ pour *At4g04760* à $1,16 \pm 0,63$ pour *At3g05400*. Les 3 gènes les plus exprimés dans les siliques sont *At1g08930* ($1,63 \pm 1,00$), *At3g05400* ($1,16 \pm 0,63$) et *At1g08920* ($0,97 \pm 0,23$). Ces 3 gènes font partie du groupe Iib. La moyenne des valeurs d'expression pour tous les gènes exprimés dans les siliques est

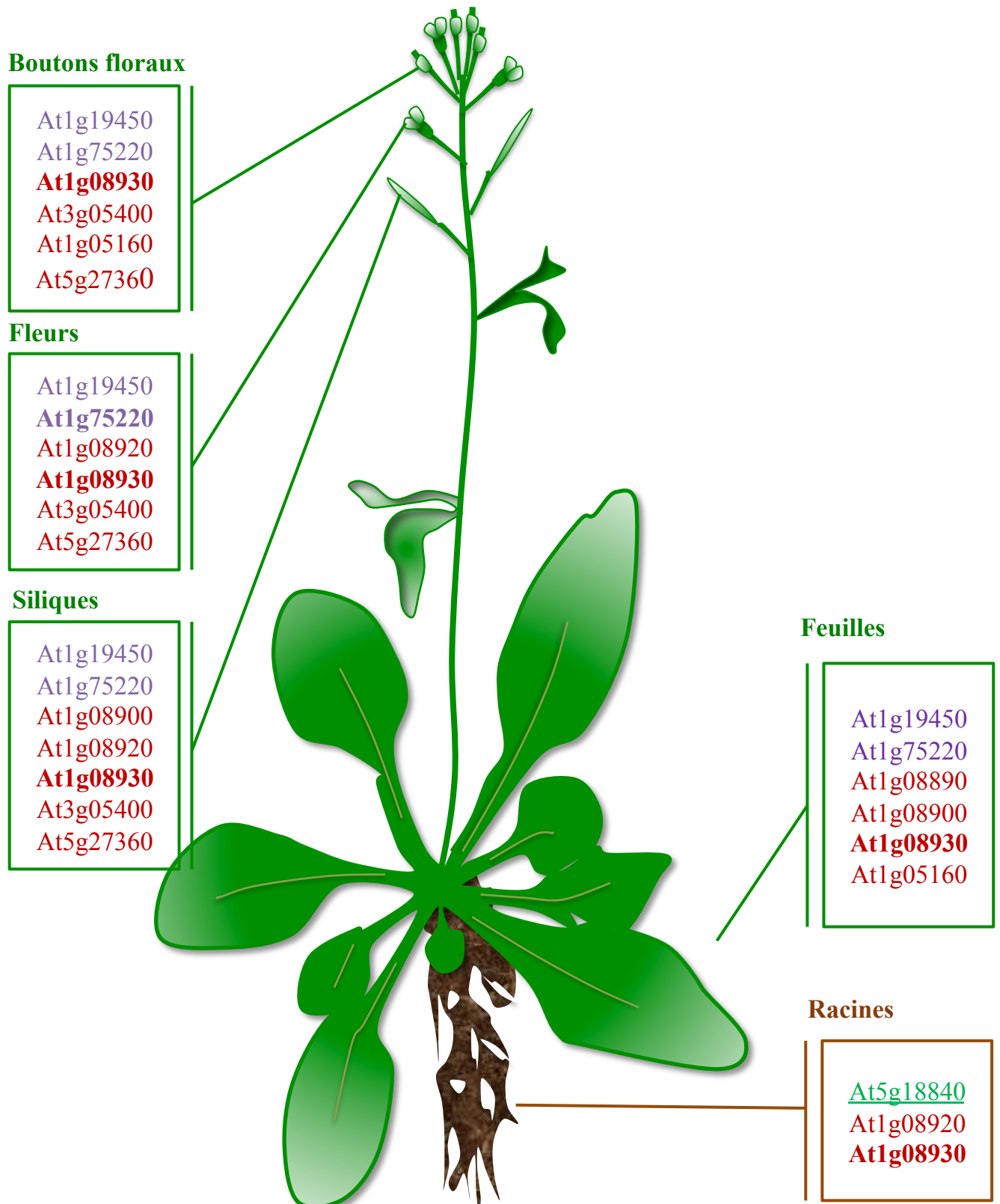


Figure 37: cartographie des ERD6-like les plus exprimés dans les 5 organes testés sur *Arabidopsis thaliana*. Cette figure représente les résultats d'expression relative (en $2^{-\Delta Ct}$) obtenus par RT-qPCR. Seuls les gènes plus exprimés que la moyenne ont été placés dans cette cartographie. La couleur de chaque nom de gène correspond à sa position dans l'arbre : groupe I = violet, groupe IIa = vert, groupe IIb = rouge. Pour chaque organe, le gène le plus exprimé a été indiqué en caractères gras. Lorsque le nom d'un gène est souligné, cela signifie que son expression est spécifique de l'organe en question.

égale à 0,45 et 7 *ERD6-like* sur les 17 analysés sont plus exprimés que la moyenne. Il s'agit d'*At1g19450* et *At1g75220* du groupe I, *At1g08920* et *At1g08930*, tandem du groupe IIb *At1g08900*, *At1g05400*, et *At5g27360* du groupe IIb.

Le tableau 16 représente les 17 *ERD6-like* dont l'expression relative dans différents organes a été analysée par RT-qPCR, avec un code couleur indiquant, pour chaque organe, si l'expression relative calculée sur chaque gène est supérieure (rouge), inférieure (vert) ou égale (blanc), à la moyenne de toutes les valeurs d'expression calculée pour cet organe (moyenne indiquée entre parenthèse pour chaque organe). Sachant que la moyenne totale, de toutes les valeurs d'expression relative calculées pour tous les gènes, tous organes confondus, est égale à 0,60, les moyennes d'expression dans les feuilles (0,71) et dans les racines (1,09) respectivement 1,2 fois et 1,8 fois supérieures. Les moyennes d'expression dans les boutons floraux (0,32), fleurs (0,44) et siliques (0,45) sont respectivement 1,9 fois, 1,4 fois et 1,3 fois inférieures. Cela montre que les *ERD6-like* sont en moyenne plus exprimés dans les racines, puis dans les feuilles, puis dans les siliques, les fleurs et enfin dans les boutons floraux. Néanmoins, ces résultats sont difficiles à exploiter en tant que tels, étant donné qu'une moyenne peut refléter, comme pour les racines dans cet exemple, qu'un gène est beaucoup plus exprimé que tous les autres, ou bien que de nombreux gènes sont exprimés moyennement. Pour cela, le code couleur appliqué permet d'aider dans la compréhension globale des niveaux d'expression des *ERD6-like* dans chacun des organes.

Une cartographie bilan des *ERD6-like* les plus exprimés dans chaque organe testé, chez *A.thaliana* est présentée en figure 37. Les gènes du groupe I *At1g19450* et *At1g75220*, issus d'une duplication segmentale, sont exprimés dans tous les organes, mais dans les racines leur niveau d'expression est inférieur à la valeur moyenne d'expression de l'ensemble des gènes. Ceci est probablement dû au fait que dans les racines, *At1g08930* est très fortement exprimé par rapport à tous les autres gènes et donc fait augmenter la moyenne d'expression relative dans cet organe. Ces deux gènes ont, dans tous les organes testés, un niveau d'expression par rapport à la moyenne semblable. Il n'y a pas de spécificité d'expression pour ces deux gènes dans les organes testés dans des conditions de culture utilisées. Cela conforte l'hypothèse qu'ils soient issus des copies *ERD6-like* les plus anciennes, présentes dans le génome de *P. patens* (mousse) et de *S. moellendorffii* (fougère).

Les 3 gènes du groupe IIa sont tous moins exprimés que la moyenne sur chacun des organes testés, à l'exception d'*At5g18840* qui est spécifiquement exprimé dans les racines.

Les 3 *ERD6-like* du groupe IIa sont plus récents que les *ERD6-like* du groupe I, et *At5g18840* a acquis une spécificité d'expression dans les racines d'*A. thaliana*.

Les gènes *At1g54730*, *At4g04750*, *At4g04760*, *At3g20460* et *At5g27350* du groupe IIb sont moins exprimés que la moyenne dans tous les organes. En conditions optimales, ils sont très peu exprimés mais pourraient être induits dans d'autres conditions.

At3g05400 et *At5g27360* sont plus exprimés que la moyenne uniquement dans les organes reproducteurs (boutons floraux, fleurs et siliques). Ces 2 *ERD6-like* du groupe IIb, ont acquis une spécificité d'expression dans ces organes. *At1g05160* du groupe IIb est plus exprimé que la moyenne dans les feuilles et boutons floraux. Les gènes dupliqués en tandem *At1g08890* et *At1g08900* du groupe IIb, sont tous deux plus exprimés dans les feuilles que dans les autres organes par rapport à la moyenne. *At1g08900* l'est aussi dans les siliques. Le gène *At1g08930* est plus exprimé que la moyenne dans tous les organes testés. C'est l'*ERD6-like* le plus exprimé globalement quel que soit l'organe (figures 36 et 37, tableau 16). Dans les fleurs, son expression relative souffre d'un fort écart type dû à des différences entre les 3 répétitions biologiques. Il apparaît donc qu'*At1g75220* pourrait également être, dans cet organe, l'*ERD6-like* le plus exprimé (figure 36 D). *At1g08920*, sa copie en tandem a une expression relative supérieure à la moyenne dans les racines, les fleurs et les siliques.

At5g18840, du groupe IIa, est spécifiquement plus exprimé que la moyenne uniquement dans les racines. *At3g05400* et *At5g27360*, deux *ERD6-like* du groupe IIb sont spécifiquement plus exprimés dans les organes reproducteurs (boutons floraux, fleurs, siliques) que dans les organes végétatifs (feuilles et racines). En effet, leur expression relative n'est supérieure à la moyenne que dans ces 3 organes.

2.3 Comparaison du niveau d'expression des *AtERD6-like* dupliqués en tandem dans les 5 organes testés

L'analyse bioinformatique a permis d'identifier cinq duplications en tandem dans le groupe IIb (*At4g04750/At4g04760*, *At1g08890/At1g08900*, *At1g08920/At1g08930*, *At3g05150/At3g05155/At3g05160/At3g05165*, *At5g27350/At5g27360*) et un couple de gènes issus d'une duplication segmentale, dans le groupe I. A l'issue de la partie précédente, menant à la cartographie de l'expression des *ERD6-like* dans les feuilles, racines, boutons floraux, fleurs et siliques, émerge la question de savoir si les deux copies d'un tandem possèdent des profils d'expression similaires ou si à l'inverse des spécificités d'expression peuvent être

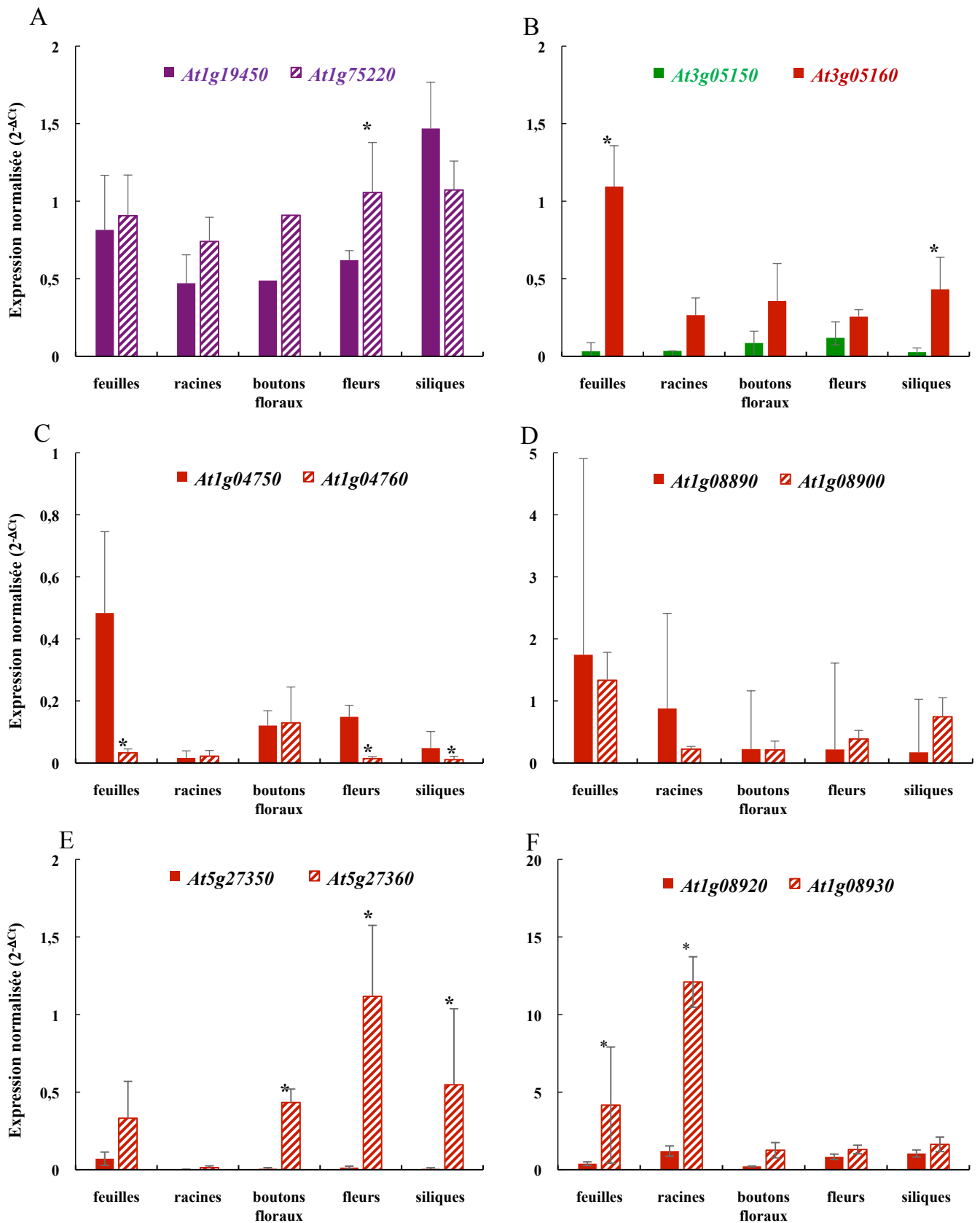


Figure 38 : expression relative de douze *ERD6-like* dupliqués. Les valeurs représentées sont les valeurs d'expression normalisée par rapport à *AtPP2a*. Chaque valeur représente la moyenne de 3 répétitions biologiques (\pm écart-type). Des tests de Kruskal Wallis ont été effectués suivis de test de comparaisons multiples de Dunn corrigé par Bonferroni. Les valeurs statistiquement différentes sont représentées par des astérisques. A : gènes issus d'une duplication segmentale; de B à F : gènes dupliqués en tandem ; violet : groupe I ; vert : groupe II a ; rouge : groupe IIb.

identifiées. Les données d'expression relative décrites précédemment ont été analysées dans ce sens dans le but de comparer les profils d'expression de toutes les copies de chaque tandem à l'exception du quartet *At3g05150/At3g05155/At3g05160/At3g05165* pour lequel deux gènes n'ont pas pu être amplifiés (figure 38).

Le couple *At1g19450/At1g75220* a été inclus dans cette étude puisque ce sont les 2 seuls *ERD6-like* d'*A. thaliana* retrouvés dans le groupe I et qui représentent potentiellement les copies les plus ancestrales chez cette espèce. Leur niveau d'expression relative dans chacun des organes est semblable sauf dans les fleurs où *At1g75220* est significativement plus exprimé qu'*At1g19450*. Néanmoins le facteur d'induction (1,7 fois) n'est pas très élevé. Nous pouvons donc considérer, hormis dans les fleurs, que dans tous les autres organes ces 2 gènes ont bien le même niveau d'expression (figure 38 A).

Les copies *At3g05150* (groupe IIa) et *At3g05160* (groupe IIb), dupliquées en tandem, ont une expression relative semblable dans les racines, boutons floraux et fleurs. Dans les feuilles et les siliques, *At1g05160* est respectivement 36 et 14 fois plus exprimé qu'*At1g05150* (figure 38 B). Ce résultat intéressant pourrait indiquer d'une part qu'*At1g05160* soit l'*ERD6-like* du groupe IIb le plus proche des *ERD6-like* du groupe IIa, mais aussi qu'il ait acquis un niveau d'expression plus important dans les feuilles (organes-sources), en conditions favorables, que sa copie en tandem du groupe IIa, montrant potentiellement une évolution vers une expression organe-spécifique de ces gènes. En effet, une expression relative plus importante peut avoir des répercussions sur la fonction d'un gène. Les fonctions des *ERD6-like*, bien que méconnues, sont néanmoins rattachées au transport de sucres. Un niveau d'expression plus élevé acquis durant l'évolution des *ERD6-like* pourrait indiquer que la fonction de ce gène, a subi une pression plus importante et tend à être conservée par rapport à celle du gène *At1g05150*.

Parmi les gènes du groupe IIb, *At4g04750*, copie en tandem d'*At4g04760*, a une expression relative plus forte dans les feuilles, fleurs et siliques (figure 38 C, respectivement 16 ; 10,7 et 5 fois plus). Néanmoins, aucun de ces gènes n'est retrouvé dans la liste des gènes les plus exprimés, et ce dans tous les organes testés (tableaux 15 et 16; figure 37). Aussi, le niveau d'expression relative de ces gènes peut être considéré comme relativement faible.

At1g08890 et *At1g08900*, deux gènes dupliqués en tandem du groupe IIb, ont des expressions relatives de niveaux semblables dans chacun des organes testés (figure 38 D).

At5g27360 est significativement plus exprimé que sa copie en tandem *At5g27350* dans les organes reproducteurs (boutons floraux : 71,6 fois ; fleurs : 111 fois ; siliques : 91,6 fois). Ceci reflète une expression préférentielle d'*At5g27360* dans les organes reproducteurs. *At5g27350* ne partage manifestement pas cette spécificité d'expression.

Enfin, pour la dernière paire de gènes dupliqués en tandem du groupe IIb, *At1g08930* est significativement plus exprimé qu'*At1g08920* dans les organes végétatifs (feuilles : 10,6 fois ; racines : 10 fois). Les différences de niveau d'expression s'atténuent dans les organes reproducteurs (boutons floraux, fleurs et siliques). Ceci est dû à la plus faible expression de *At1g08930* dans les organes reproducteurs comme décrits précédemment (tableaux 15 et 16, figure 38).

2.4 Discussion

Même si les niveaux d'expression des *AtERD6-like* sont variables d'un gène à l'autre dans les organes d'*A. thaliana*, notre analyse corrobore et complète les données de Genevestigator puisque l'expression des 17 gènes a pu être détectée dans les cinq organes, démontrant qu'ils sont tous exprimés. Nous avons pu mettre en évidence les niveaux d'expression différentiels des deux gènes dupliqués en tandem *At1g08890* et *At1g08900* aussi bien dans les racines, que dans les siliques. Nos résultats confirment le fort niveau d'expression des gènes *At1g19450*, *At1g08930* et d'*At1g75220* ainsi que le faible niveau d'expression pour *At4g04760* et *At3g20460*. Malgré l'absence de spécificité d'organe nettement avérée, nous avons démontré l'expression préférentielle de certains gènes ERD6-like dans certains types d'organes. En accord avec les données de Genevestigator la plus faible expression d'*At1g08930* dans les organes reproducteurs par rapport aux organes végétatifs et à l'inverse la plus forte expression de *At3g05400* dans les organes reproducteurs par rapport aux organes végétatifs, notamment dans les siliques, ont été démontrées. A l'inverse, le gène *At2g48020* (*AtZIF2*) du groupe II, qui, dans Genevestigator, est assez fortement exprimé, s'est révélé dans nos conditions être un gène assez faiblement exprimé sur l'ensemble des organes testés. Remy et al. (2014), ont mis en évidence des différences de niveaux d'expression de deux variants d'épissage d'*AtZIF2* dans les racines, en présence de fortes concentrations en zinc. Il semblerait donc que les différences de niveau d'expression du gène *AtZIF2* (*At2g48020*) dans les organes, entre l'analyse *in silico* et l'analyse par RT-qPCR puisse être due : i) aux différentes conditions de culture des plantes ; ii) à la présence de variants d'épissages, qui n'ont pas été pris en compte

dans notre étude à l'inverse des études recensées dans Genevestigator, car en RT-qPCR, seuls les transcrits pleine longueur ont été amplifiés.

Les deux *ERD6-like* du groupe I, *At1g19450* et *At1g75220*, sont exprimés de manière plus ou moins constitutive dans tous les organes testés et à un même niveau. L'absence de spécificité d'organe pour les gènes du groupe I leur permet potentiellement de répondre à un large spectre de conditions physiologiques et/ou environnementales. Ceci est en accord avec l'hypothèse selon laquelle les *ERD6-like* de ce groupe seraient dérivés des copies ancestrales, présentes dans les génomes de *Physcomitrella patens* (mousse) et *Selaginella moellendorffii* (fougère).

Dans le groupe IIa, les gènes sont assez faiblement exprimés et seul *At1g18840* présente une expression différentielle dans les organes testés. Il est préférentiellement exprimé dans les racines.

Les *AtERD6-like* du groupe IIb, qui sont issus de duplications plus récentes et dont le dN/dS au sein du genre *Arabidopsis* suggère une pression de sélection moins importante, et par conséquent une évolution plus rapide (Wright and Adolatto 2002), montrent des patrons d'expression différents dans les cinq organes testés. Ceci pourrait signifier l'acquisition, au fur et à mesure des événements de duplication, de spécificités d'expression pouvant se traduire par des rôles différentiels des protéines codées, suggérant des mécanismes de sous-fonctionnalisation des copies dupliquées.

Il a été montré chez le riz (*O. sativa*), *A. thaliana* et le soja (*G. max*), qu'un lien peut être effectué entre l'évolution et l'expression des différents membres de la famille de transporteurs de disaccharides SUC/SUT (Peng et al. 2014). Il a notamment été mis en évidence une complémentarité d'expression d'*AtSUC1* dans les racines et le pollen d'*A. thaliana*, organes dans lesquels *AtSUC2* est peu exprimé. Sur les 6 couples en tandem d'*AtERD6-like* analysés, peu de différences d'expression entre les deux copies ont pu être détectées pour les trois couples *At1g19450/At1g75220*, *At1g04750/At1g04760* et *At1g08890/At1g08900*. En revanche, des différences très significatives sont clairement mises en évidence dans les organes végétatifs pour le tandem *At1g08920/At1g08930*, dans les organes reproducteurs pour le tandem *At5g27350/At5g27360* et dans les feuilles et les siliques pour le tandem *At3g05150/At3g05160*. Deux autres études ont déterminé que l'activité des promoteurs respectifs d'*AtERD6* (*At1g08930*) et d'*AtESL1* (*At1g08920*) est localisée dans les mêmes organes : parties aériennes, sépales et racines. Toutefois dans les racines, *AtERD6* est exprimé dans les cellules de l'épiderme et du cortex alors que *AtESL1* est exprimé dans l'endoderme, le péricycle et dans les cellules du parenchyme xylémien (Kiyosue et al. 1998 ; Yamada et al.

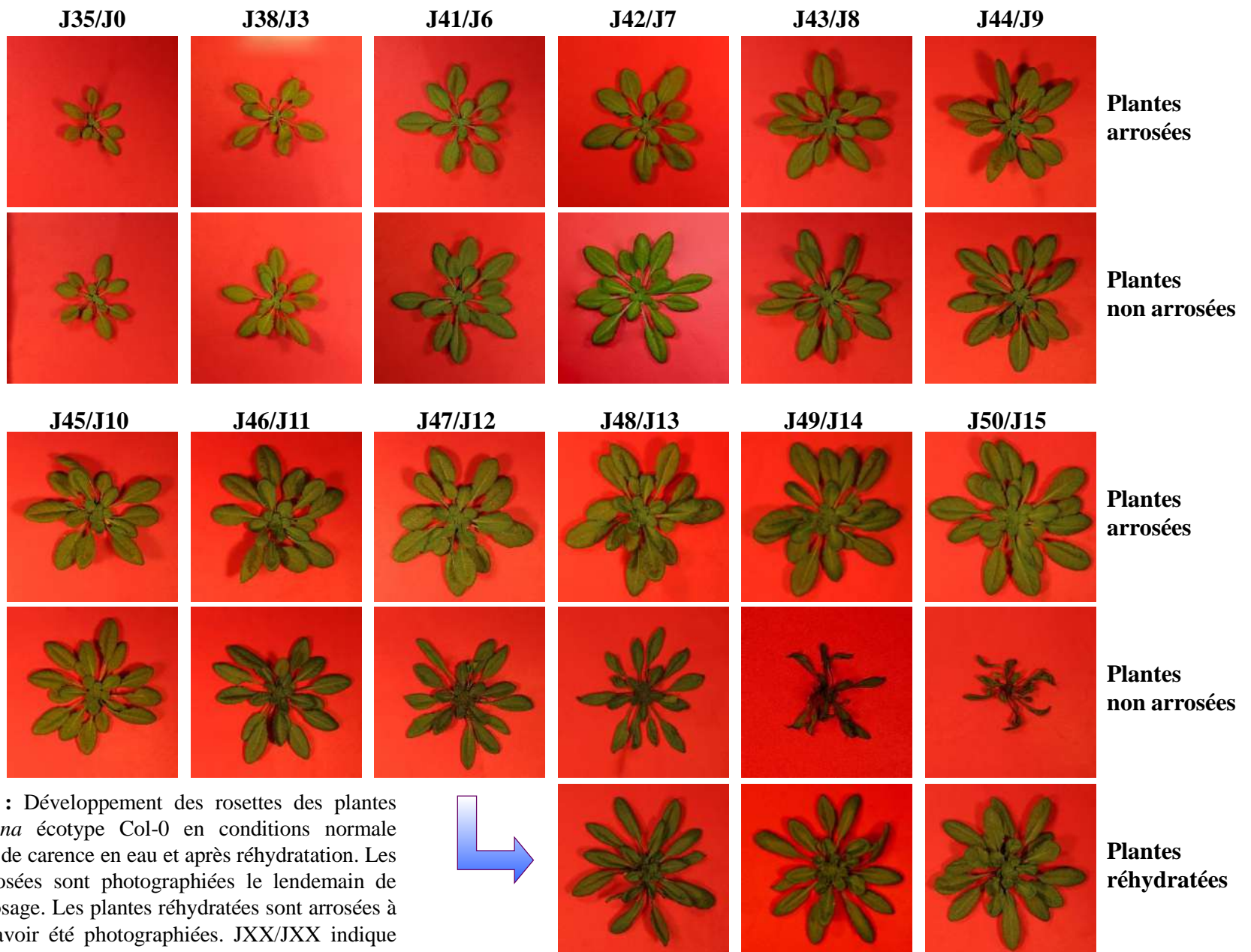
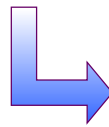


Figure 39 : Développement des rosettes des plantes d'*A. thaliana* écotype Col-0 en conditions normale d'arrosage, de carence en eau et après réhydratation. Les plantes arrosées sont photographiées le lendemain de chaque arrosage. Les plantes réhydratées sont arrosées à J12 après avoir été photographiées. JXX/JXX indique les jours après semis et les jours après arrêt d'arrosage.



2010). Néanmoins, aucune donnée issue d'analyse d'expression par RT-qPCR n'est disponible dans la littérature afin de déterminer le niveau d'expression de ces deux gènes dans les différents organes d'*A. thaliana*. Après l'étude menée lors de ces travaux de thèse, il s'avère qu'*AtERD6* est plus exprimé qu'*AtESL1* dans les feuilles et les racines (figure 38). *AtERD6* est d'ailleurs l'*ERD6-like* le plus exprimé dans tous les organes (tableau 15 ; figures 37 et 38). Nos résultats suggèrent également d'éventuels mécanismes de sous-fonctionnalisation pour ces 6 gènes dupliqués en tandem.

3 Caractérisation des effets de la carence en eau chez l'écotype Columbia-0 d'*Arabidopsis thaliana*

Des plantes d'*Arabidopsis thaliana* cultivées sur terreau ont été soumises à une carence en eau par arrêt d'arrosage pendant 15 jours. Différents paramètres physiologiques mesurés chez les plantes arrosées et non arrosées lors de 12 prélèvements (J0, J3, J6, J7, J8, J9, J10, J11, J12, J13, J14 et J15) ont permis de caractériser les effets de l'arrêt d'arrosage. De plus, ces mêmes paramètres ont été mesurés à J14 et J15, sur un lot de plantes réhydratées après 12 jours sans arrosage.

3.1 Aspect et croissance des rosettes de plantes soumises ou non à une carence en eau

La figure 39 montre l'aspect des rosettes des plantes arrosées, non arrosées et réhydratées. Alors que les rosettes des plantes arrosées ne cessent de se développer pendant les 15 jours d'expérimentation, il y a un arrêt progressif de la croissance des rosettes entre J10 et J15 chez les plantes non arrosées. Les feuilles des plantes non arrosées sont flétries à partir de J12 après arrêt d'arrosage. Une réhydratation des plantes, par reprise de l'arrosage à J12 est possible.

Il existe donc des différences notables dans la croissance des rosettes entre les plantes arrosées et non arrosées. Afin de chiffrer ces différences de croissance, la masse fraîche (MF), la masse sèche (MS) et la surface foliaire projetée (SFp) des rosettes de plantes arrosées et non arrosées ont été analysées et comparées.

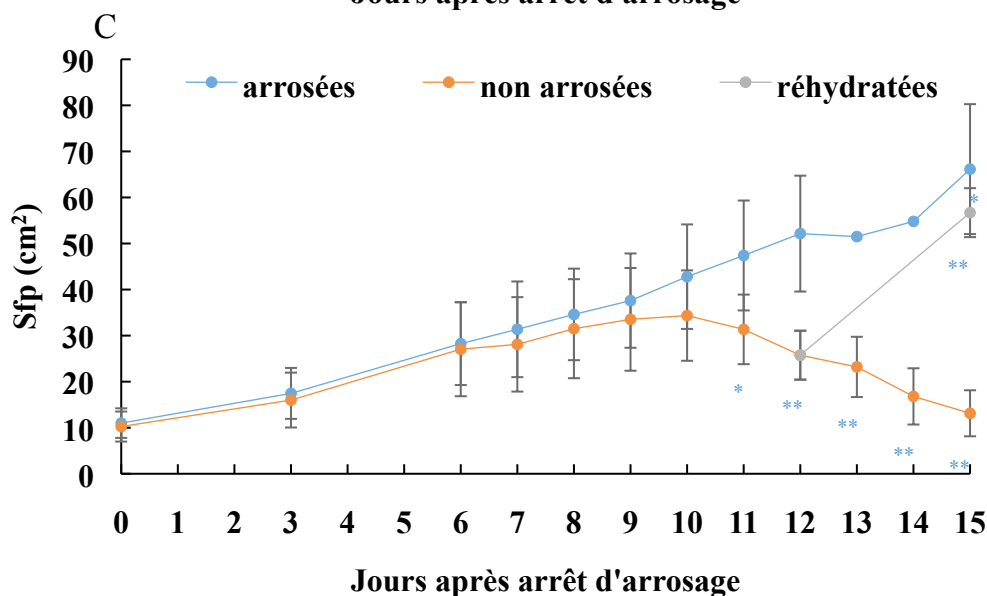
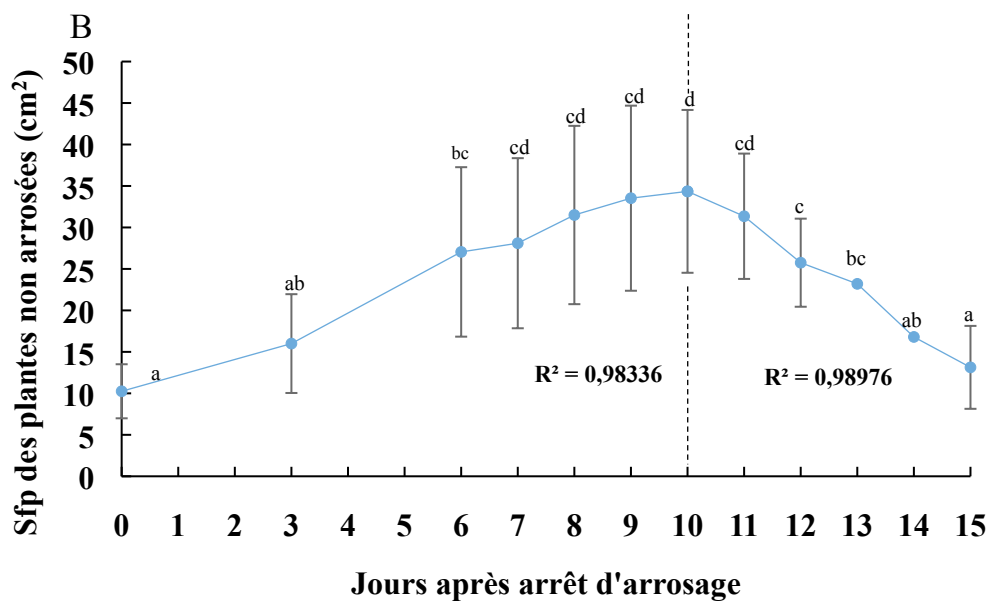
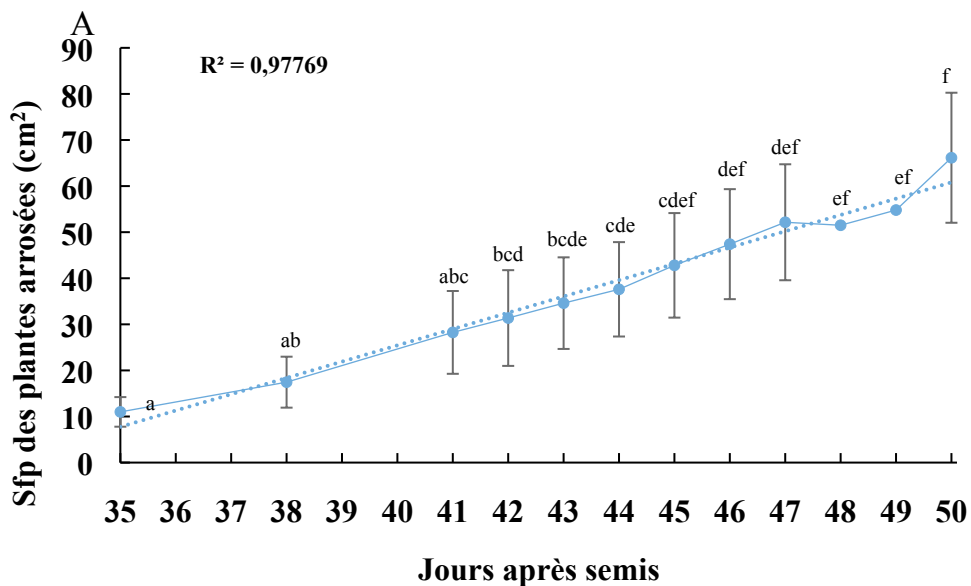


Figure 40: Analyse de la surface foliaire projetée (Sfp) chez les plantes arrosées, non arrosées et réhydratées. Les valeurs représentent les moyennes de 2 répétitions biologiques pour les jours 48 et 49 après semis, n = 10 plantes et 3 répétitions biologiques (\pm écart type) n = 15 plantes pour tous les autres jours de prélèvement. Les lettres représentent les valeurs de moyennes déterminées comme statistiquement différentes par un test de Kruskal-Wallis suivi du test Dunn de comparaisons multiples, corrigé par Bonferroni (p.value < 0,05). Les astérisques représentent des valeurs statistiquement différentes déterminées par des tests de Mann-Whitney (* = p.value < 0,05, ** = p.value < 0,0001).

3.1.1 Evolution de la surface foliaire projetée des rosettes

Chez les plantes arrosées, la SFp augmente entre 35 et 50 j après semis (figure 40 A). Trente-cinq jours après semis, les rosettes ont une SFp de $11 \pm 3,2 \text{ cm}^2$ alors que 15 jours plus tard, cette surface est de $66,2 \pm 14,1 \text{ cm}^2$, soit 6 fois plus importante. Le coefficient de corrélation (R^2) de 0,978 indique que l'expansion de la surface des rosettes est corrélée à l'âge des plantes. Les rosettes des plantes arrosées grandissent progressivement et linéairement entre 35 et 50 j après semis, ce qui montre que les plantes sont en phase de développement végétatif.

Cependant l'augmentation de la SFp des rosettes n'est plus linéaire à 48 et 49 j après semis (figure 40 A). Les valeurs de surface foliaire projetée des rosettes sont légèrement plus faibles qu'aux autres jours testés. Cette différence correspond certainement à un artéfact dû au fait que ces deux points de prélèvement n'ont pas été effectués dans la première répétition biologique. Les valeurs correspondent uniquement à la moyenne de deux expérimentations.

La vitesse d'expansion des rosettes entre 35 et 50 jours après semis chez les plantes arrosées est calculée en soustrayant la SFp des rosettes à 35 j après semis à la SFp des rosettes à 50 jours après semis, et, en divisant par 15, le nombre de jours écoulés. La vitesse d'expansion de la rosette est de $3,7 \pm 0,8 \text{ cm}^2$ par jour.

La SFp des plantes non arrosées augmente d'un facteur 3,4 pendant les 10 premiers jours d'arrêt d'arrosage, pour atteindre $34,4 \pm 9,8 \text{ cm}^2$ (figure 40 B). Un R^2 de 0,983 indique que l'augmentation de la SFp de J0 à J10 est linéaire.

A partir de J11, la SFp des plantes non arrosées diminue progressivement, le R^2 calculé (0,989) indique que la diminution la surface de la rosette est linéaire. La SFp est à J12 et à J14 équivalente à celle mesurée à J6 et à J3 respectivement. A J15, la SFp est de $13,1 \pm 5,0 \text{ cm}^2$. Ainsi, de 10 à 15 jours après l'arrêt d'arrosage, la SFp des rosettes a diminué d'un facteur 2,6.

L'expansion des rosettes des plantes arrosées et non arrosées est statistiquement comparable jusqu'à J10, en effet, il n'a pas été possible de déterminer des différences statistiques par le biais de test de Mann-Whitney (figure 40 C). A partir de J10, la SFp des plantes non arrosées est statistiquement plus faible que celle des plantes arrosées. Cet écart se creuse jusqu'à J15.

A J12, un lot de plantes non arrosées a été réhydraté par arrosage avec de l'eau. A J15, la SFp des plantes réhydratées est significativement supérieure à celle des plantes non arrosées

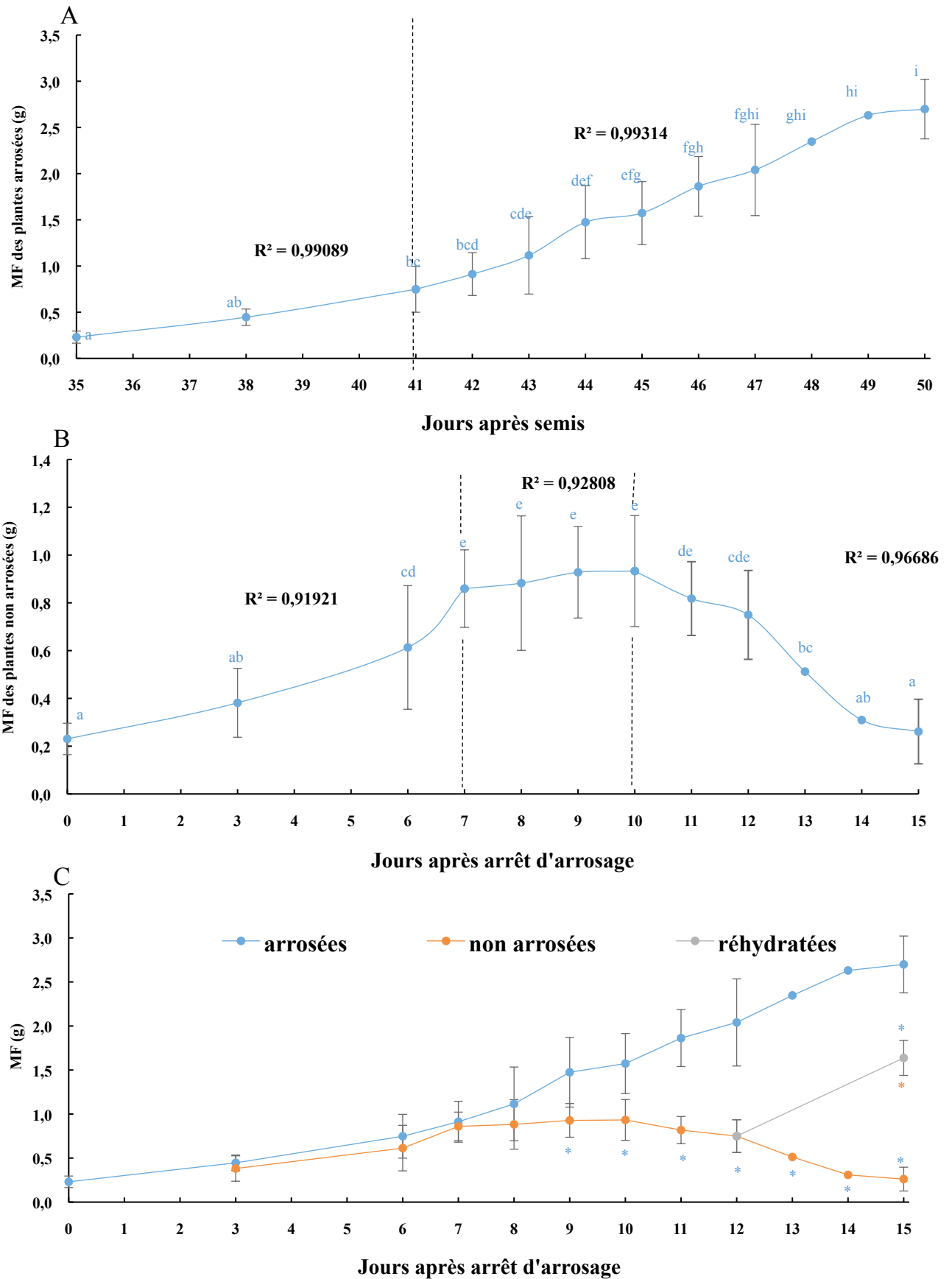


Figure 41: analyse de la masse fraîche (MF) chez les plantes arrosées, non arrosées et réhydratées Les valeurs représentent les moyennes de 2 répétitions biologiques pour les jours 48 et 49 après semis, $n = 10$ plantes et 3 répétitions biologiques (\pm écart type) $n = 15$ plantes pour tous les autres jours de prélèvement. Les lettres représentent les valeurs de moyennes déterminées comme statistiquement différentes par un test de Kruskal-Wallis suivi du test Dunn de comparaisons multiples, corrigé par Bonferroni ($p.value < 0,05$). Les astérisques représentent des valeurs statistiquement différentes déterminées par des tests de Mann-Whitney (* = $p.value < 0,05$, ** = $p.value < 0,0001$).

($56,7 \pm 5,3 \text{ cm}^2$ contre $13,1 \pm 5,0 \text{ cm}^2$). Néanmoins, il existe une différence significative de la SFp à J15, entre les plantes arrosées ($66,2 \pm 14,1 \text{ cm}^2$) et les plantes réhydratées ($56,7 \pm 5,3 \text{ cm}^2$).

Ces observations suggèrent que les rosettes des plantes non arrosées se développent de manière similaire à celles des plantes arrosées jusqu'à J10. Au-delà, il n'y a plus d'expansion des rosettes mais au contraire une réduction de leur taille. La période comprise entre J10 et J12, au cours de laquelle la SFp commence à diminuer correspond au début du flétrissement des feuilles (figure 40 A). Les plantes non arrosées subissent donc une perte d'eau et le flétrissement qui en découle est vraisemblablement responsable de la réduction de la SFp. Etant donné qu'en ré-arrosant un lot de plantes, 2 jours après le début de la chute de la SFp (J12), les plantes reprennent leur croissance mais qu'un léger retard par rapport aux plantes arrosées est noté, nous pouvons conclure que c'est bien le manque d'eau qui est à l'origine de ce retard de croissance.

3.1.2 Evolution de la masse fraîche des rosettes

La masse fraîche (MF) des rosettes des plantes arrosées est de $0,23 \pm 0,07 \text{ g}$ 35 jours après semis pour atteindre $2,70 \pm 0,32 \text{ g}$ 50 jours après semis (figure 41 A), soit une augmentation d'un facteur 10,4 en 15 jours. Ce résultat est cohérent avec les données obtenues pour la SFp, néanmoins, ce facteur (x10,4) est nettement supérieur à celui correspondant de la SFp (x 6), ce qui pourrait traduire que la MF des rosettes des plantes arrosées augmente plus que la SFp. Cette différence pourrait traduire que la MF des rosettes des plantes arrosées augmente plus que la SFp. Cependant cette différence peut être attribuée au mode de détermination de la SFp qui sous-estime la surface foliaire réelle. En effet, à partir de 47 jours après semis (figure 39) une superposition plus ou moins importante des feuilles les plus matures est visible, ce qui conduit à une sous-estimation de la SFp.

Entre 35 et 50 jours après semis, il y a une corrélation linéaire entre la MF et l'âge des plantes arrosées avec un R^2 de 0,950 (donnée non montrée). Cependant, le profil de la courbe permet aussi de différencier deux phases de croissance en terme de MF : une première phase de 35 à 41 jours après semis et une seconde phase de 41 à 50 jours après semis (figure 41 A). Le coefficient de corrélation de chacune de ces deux phases est égal à 0,991 et 0,993 respectivement. La masse fraîche augmente moins vite entre 35 et 41 jours après semis (0,17

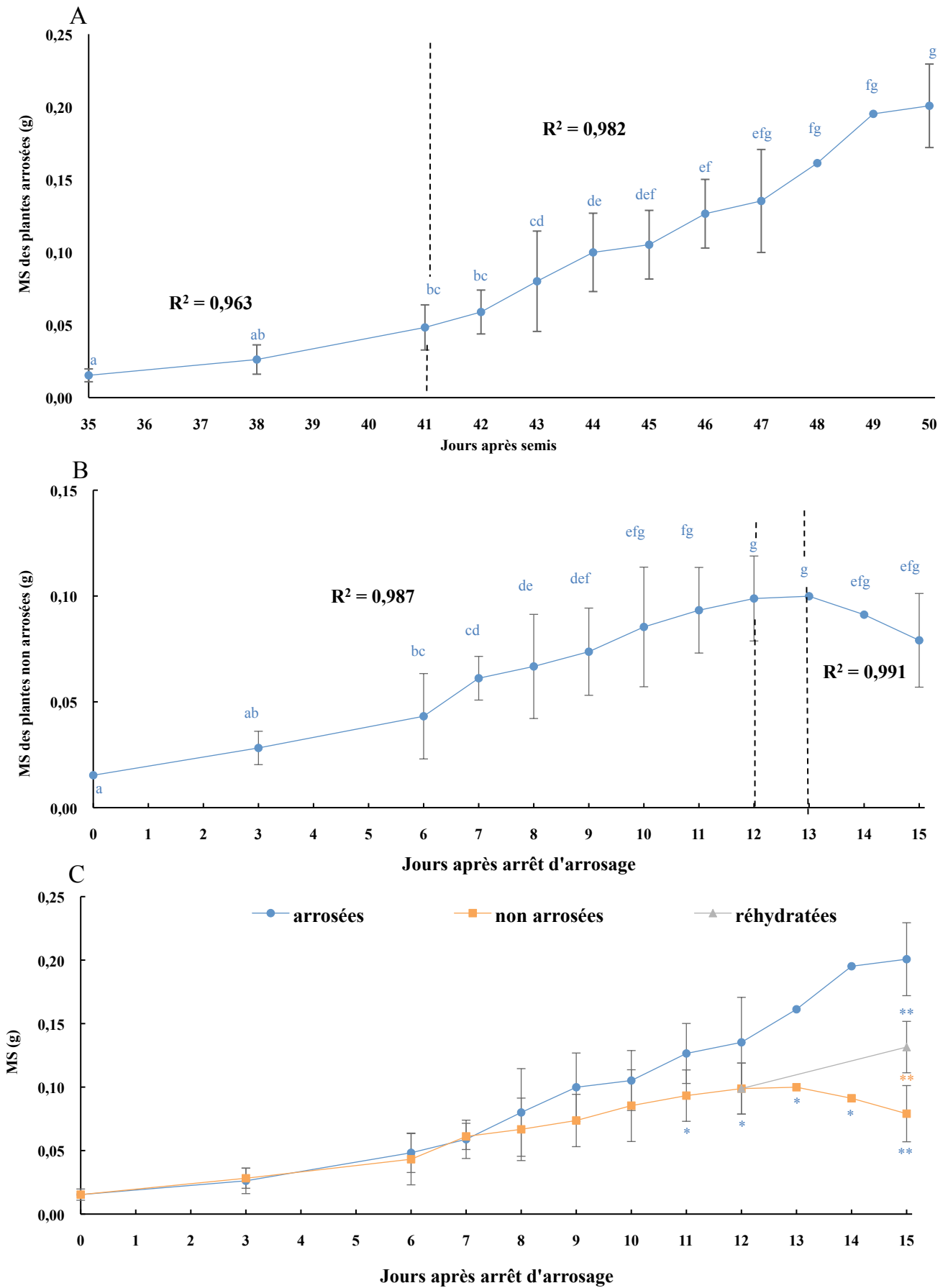


Figure 42 : analyse de la masse sèche (MS) chez les plantes arrosées, non arrosées et réhydratées. Les valeurs représentent les moyennes de 2 répétitions biologiques pour les jours 48 et 49 après semis, $n = 10$ plantes et 3 répétitions biologiques (\pm écart type) $n = 15$ plantes pour tous les autres jours de prélèvement. Les lettres représentent les valeurs de moyennes déterminées comme statistiquement différentes par un test de Kruskal-Wallis suivi du test Dunn de comparaisons multiples ($p.value < 0,05$), corrigé par Bonferroni. Les astérisques représentent des valeurs statistiquement différentes déterminées par des tests de Mann-Whitney (* = $p.value < 0,05$, ** = $p.value < 0,0001$).

g/jour), qu'entre 41 et 50 jours après semis (0,22 g/jour). Le fait que la MF n'augmente pas régulièrement au cours des 15 jours de croissance des plantes, est conforté par la figure 39.

L'évolution de la MF au cours des 15 jours de privation d'eau des plantes peut être découpée en 3 phases (figure 41 B). La MF des rosettes augmente significativement de J0 à J7, passant d'une masse de $0,28 \pm 0,14$ g à $0,86 \pm 0,16$ g, soit une augmentation d'un facteur de 3,1. De J7 à J10, la MF des rosettes stagne (un test de Kruskal-Wallis ne permet pas de trouver de différence significative entre les valeurs de MF des rosettes). Enfin, entre J10 et J15, la MF diminue. A J15, la MF des rosettes est égale à $0,26 \pm 0,13$ g, ce qui est équivalent à la valeur mesurée à J0.

Entre J10 et J15, le R^2 est de 0,967, ce qui signifie qu'il y a une corrélation linéaire entre le nombre de jours depuis l'arrêt de l'arrosage et la diminution de MF après J10.

Pendant les 9 premiers jours, il n'y a pas de différences significatives pour l'évolution de la MF entre les plantes arrosées et les plantes non arrosées. Par contre à partir de J9, la MF des rosettes des plantes non arrosées est statistiquement différente de celle des plantes arrosées (figure 41 C). Cette différence augmente jusqu'à J15. Ceci est le reflet de la différence entre la croissance progressive des rosettes des plantes arrosées et l'arrêt de croissance puis la perte de MF des rosettes des plantes non arrosées. La MF des plantes réhydratées 12 jours après l'arrêt de l'arrosage, augmente pour atteindre la valeur de $1,6 \pm 0,20$ g à J15 ; une masse 1,6 fois plus faible que pour les plantes arrosées ($2,7 \pm 0,13$ g).

3.1.3 Evolution de la masse sèche des rosettes

La matière sèche (MS) des rosettes des plantes arrosées est de $0,015 \pm 0,004$ g, 35 jours après semis (figure 42 A). De la même manière que pour la MF et la SFp, la MS des rosettes des plantes arrosées augmente jusqu'à 50 jours après semis, pour atteindre une valeur de $0,201 \pm 0,03$ g, soit une MS multipliée par 13,4 en 15 jours.

Le coefficient de corrélation calculé entre 35 et 50 jours après semis (donnée non montrée) est de 0,930, montrant ainsi que la MS est linéairement corrélée avec le nombre de jours de culture. Ceci suggère que, durant cet intervalle de temps, la plante synthétise de plus en plus de matière organique. Toutefois, comme ce qui avait été observé pour la MF, l'augmentation de la MS peut être décomposée en deux phases : de 35 à 41 jours après semis et de 41 à 50 jours après semis. Le coefficient de corrélation de chacune des phases étant de

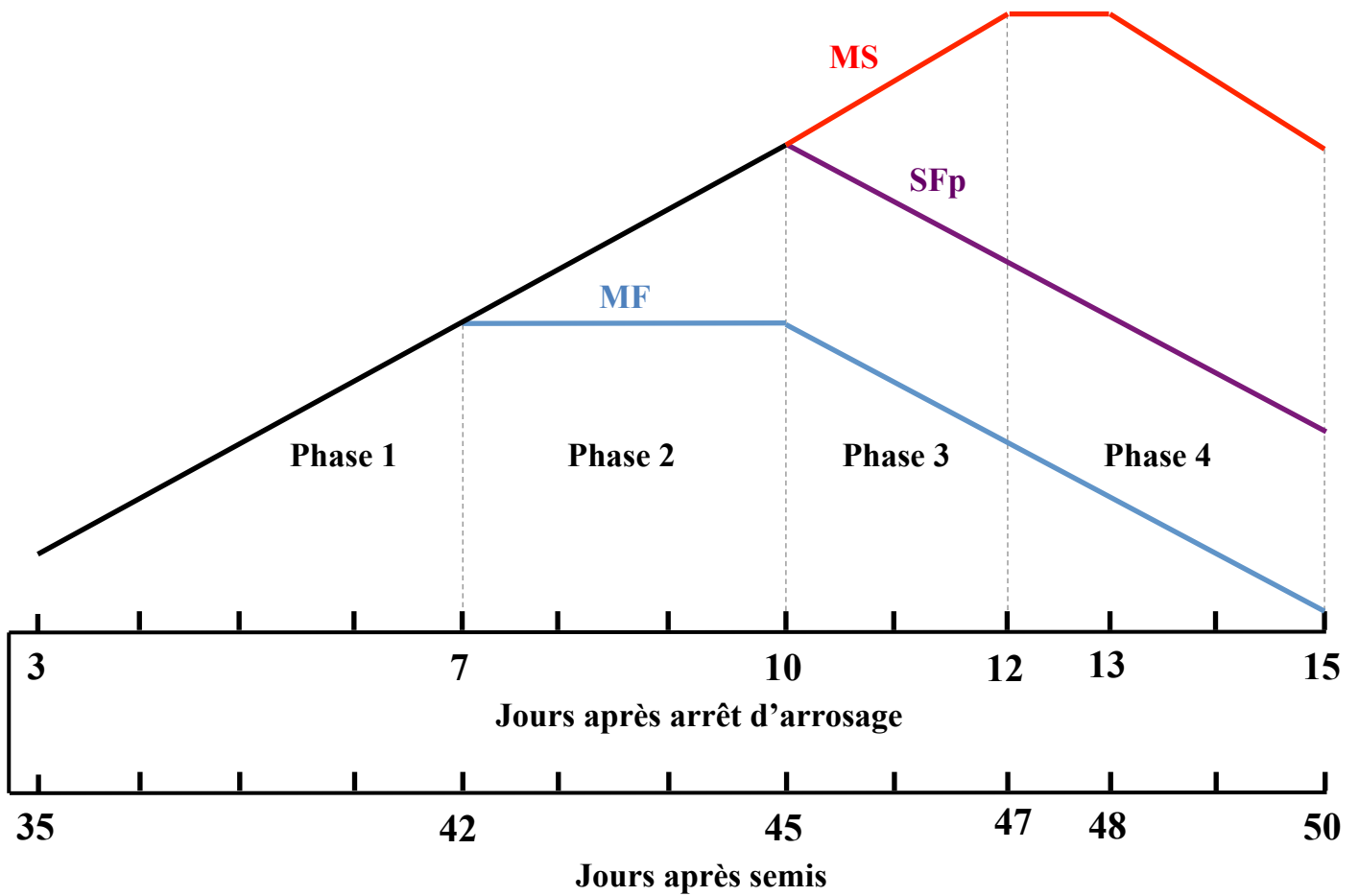


Figure 43 : bilan de la croissance des rosettes des plantes non arrosées durant 15 jours. En noir, sont représentés les trois paramètres mesurés lorsqu'ils se comportent de la même manière. En bleu, est représentée la masse fraîche (MF), en rouge, la masse sèche (MS) et en violet, la surface foliaire projetée (SFp).

0,963 et 0,982 respectivement. La MS augmente moins vite entre 35 et 41 jours après semis (0,011 g/jour) qu'entre 41 et 50 jours après semis (0,017g/jour).

La MS des plantes non arrosées augmente progressivement jusqu'à J12 (figure 42 B). Les rosettes des plantes non arrosées ont une MS de $0,015 \pm 0,004$ g à J0, et de $0,1 \pm 0,020$ g à J12, soit une augmentation de 6,7 fois. A J13, les rosettes des plantes non arrosées ont une MS équivalente à celle de J12, soit 0,1g. Les rosettes des plantes non arrosées accumulent donc de la matière organique pendant 12 jours. Cette augmentation de MS est corrélée avec le temps ($R^2 = 0,987$). A partir de 13 jours de privation d'eau, la MS décroît jusqu'à atteindre la valeur de $0,079 \pm 0,022$ g. Cette perte de MS est aussi corrélée avec le temps ($R^2 = 0,991$).

De J0 à J11, il n'y a pas de différence significative entre la MS des rosettes de plantes arrosées et non arrosées (figure 42 C). De J11 à J13, la MS des plantes non arrosées est significativement différente de celle des plantes arrosées (figure 42 C). De J13 et J15, les plantes arrosées gagnent 0,04 g de MS tandis que les plantes non arrosées en perdent 0,02 g.

Les plantes réhydratées à J12, synthétisent et accumulent de nouveau de la MS après arrosage. A J15, les rosettes des plantes réhydratées ont une MS de $0,132 \pm 0,020$ g ce qui est 1,7 fois plus important que les plantes non arrosées et 1,4 fois plus faible que pour les plantes arrosées (figure 42 C).

3.1.4 Détermination de différentes phases de croissance chez les plantes non arrosées

Au vu des résultats précédents, nous pouvons définir, pour les plantes non arrosées quatre phases de croissance qui sont résumées dans la figure 43:

- Phase 1 : entre J0 et J7, les plantes non arrosées ont une croissance similaire à celle des plantes arrosées. Les MF, MS et SFp augmentent.
- Phase 2 : entre J7 et J10, les plantes non arrosées commencent à perdre de l'eau. La MS et la SFp augmentent et la MF reste inchangée. Cette stagnation de la MF traduit une difficulté des racines à absorber de l'eau du sol et peut être le reflet d'une diminution du potentiel hydrique du sol due à son appauvrissement en eau.
- Phase 3 : entre J10 et J12, la MS continue d'augmenter alors que la MF et la SFp diminuent. Les plantes non arrosées synthétisent toujours de la matière organique mais elles perdent de l'eau. Un début de flétrissement est alors visible, ce qui traduit une baisse du potentiel hydrique du sol au niveau du point de flétrissement.

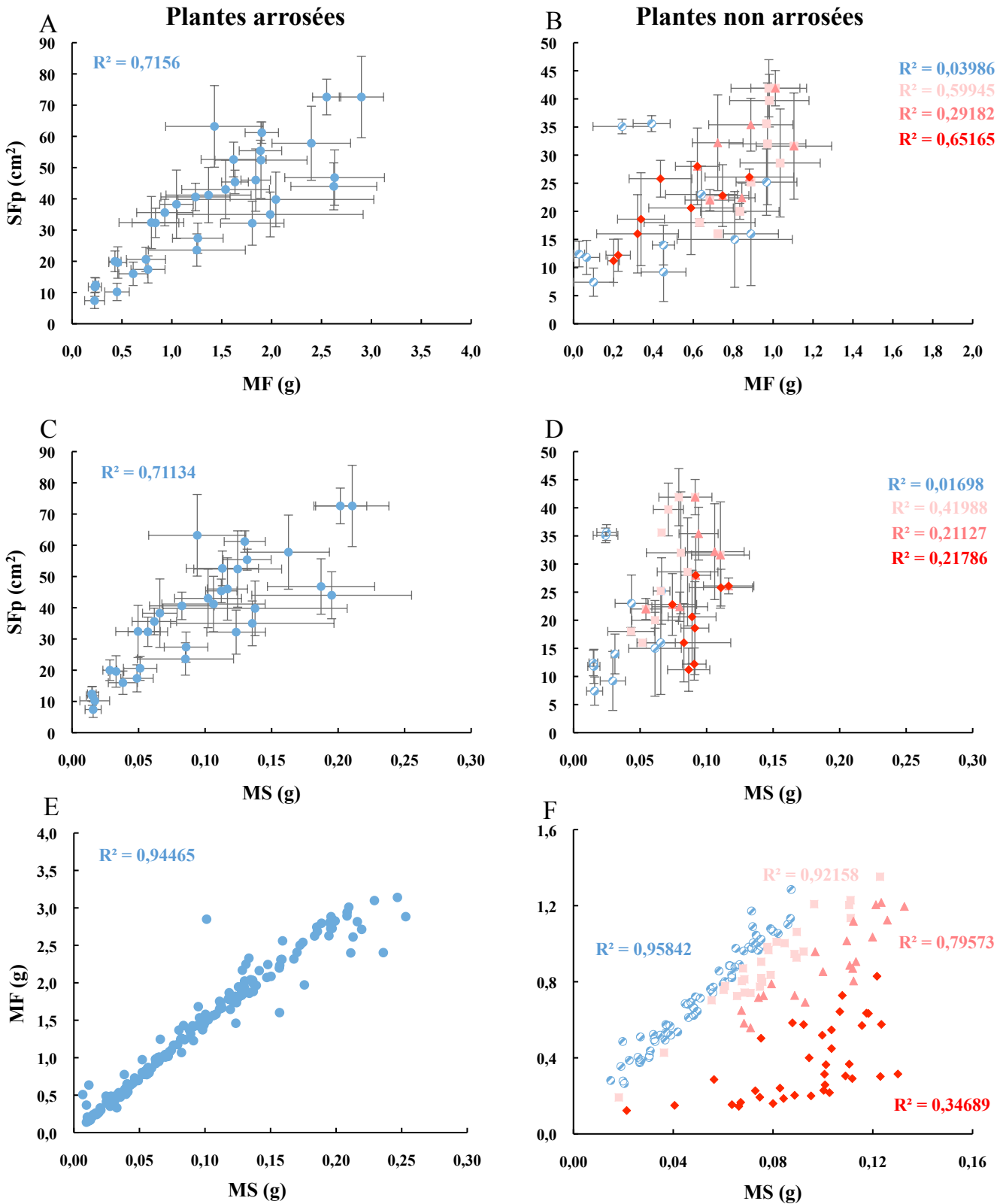
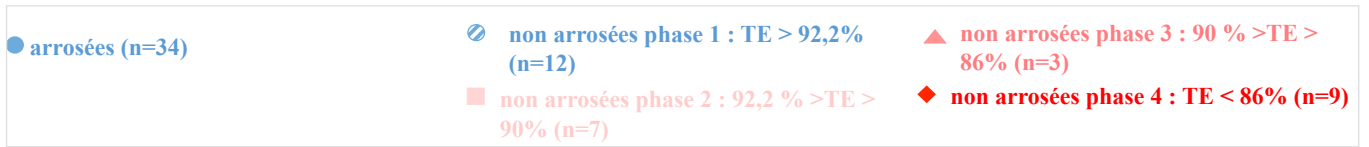


Figure 44 : corrélations entre la surface foliaire projetée (SFp), la masse fraîche (MF) et la masse sèche (MS) pour les plantes arrosées et non arrosées, pour chacune des 4 phases de croissance. Pour la SFp, chaque point représente la moyenne de 5 plantes d'une seule répétition biologique (\pm écart type, n = 15 plantes soit 3 répétitions). Pour la MF et la MS, les valeurs de chaque plante sont représentées. Le R^2 est le coefficient de corrélation linéaire. A, B et C = plantes arrosées, D, E et F = plantes non arrosées.

- Phase 4 : entre J12 et J15, il y a arrêt de production de matière organique. Tous les paramètres de croissance mesurés diminuent. Les rosettes des plantes sont très flétries, et ce jusqu'au cœur de la rosette où se trouve les plus jeunes feuilles. A l'issue de cette phase, le fait d'arroser de nouveau les plantes, n'a pas permis de réhydrater les rosettes. Cet état de flétrissement est donc irréversible (état de flétrissement permanent).

3.1.5 Corrélations entre SFp, MF et MS chez les plantes arrosées et non arrosées, lors de chacune des phases de croissance

Pour les plantes arrosées, il n'y a pas de corrélation linéaire entre la SFp et les MF et MS (figure 44 A et B). Cette absence de corrélation peut être liée au mode de détermination de la SFp. A l'inverse, il y a une corrélation linéaire ($R^2 = 0,945$) de 35 à 50 jours après semis, entre la MF et la MS chez les plantes arrosées (figure 44 C). Cela signifie que la MF et la MS des rosettes des plantes arrosées augmentent de façon concomitante. La MS est environ 10,5 fois plus faible que la MF, traduisant ainsi la contribution négligeable de la MS dans la détermination de la MF, au contraire de la masse d'eau.

Chez les plantes non arrosées, il n'y a pas de corrélation linéaire entre la SFp et les MF et MS, dans aucune des phases de croissance déterminées précédemment (figure 44 D et E). De J0 à J7, période pendant laquelle la MF et la MS des rosettes des plantes non arrosées augmentent, il y a corrélation linéaire entre ces deux paramètres ($R^2 = 0,958$, figure 44 F). De J7 à J10, période au cours de laquelle la MF des plantes non arrosée stagne, le coefficient de corrélation entre la MF et la MS diminue ($R^2 = 0,921$, figure 44 F), la MS continuant d'augmenter. Entre J10 et J12, période durant laquelle la MF des rosettes des plantes non arrosées diminue, il n'y a plus de corrélation entre la MF et la MS (figure 44 F), probablement parce que la MS continue d'augmenter. Il n'y a pas de corrélation linéaire entre MF et MS des rosettes de plantes non arrosées, entre J12 et J15 (figure 44 F). Les deux paramètres diminuent donc à des vitesses différentes.

3.2 Caractérisation physiologique des rosettes de plantes soumises ou non à une carence en eau

Puisque des différences de croissance des rosettes sont observées entre les plantes arrosées et non arrosées, il est possible d'émettre l'hypothèse que ces différences reflètent des

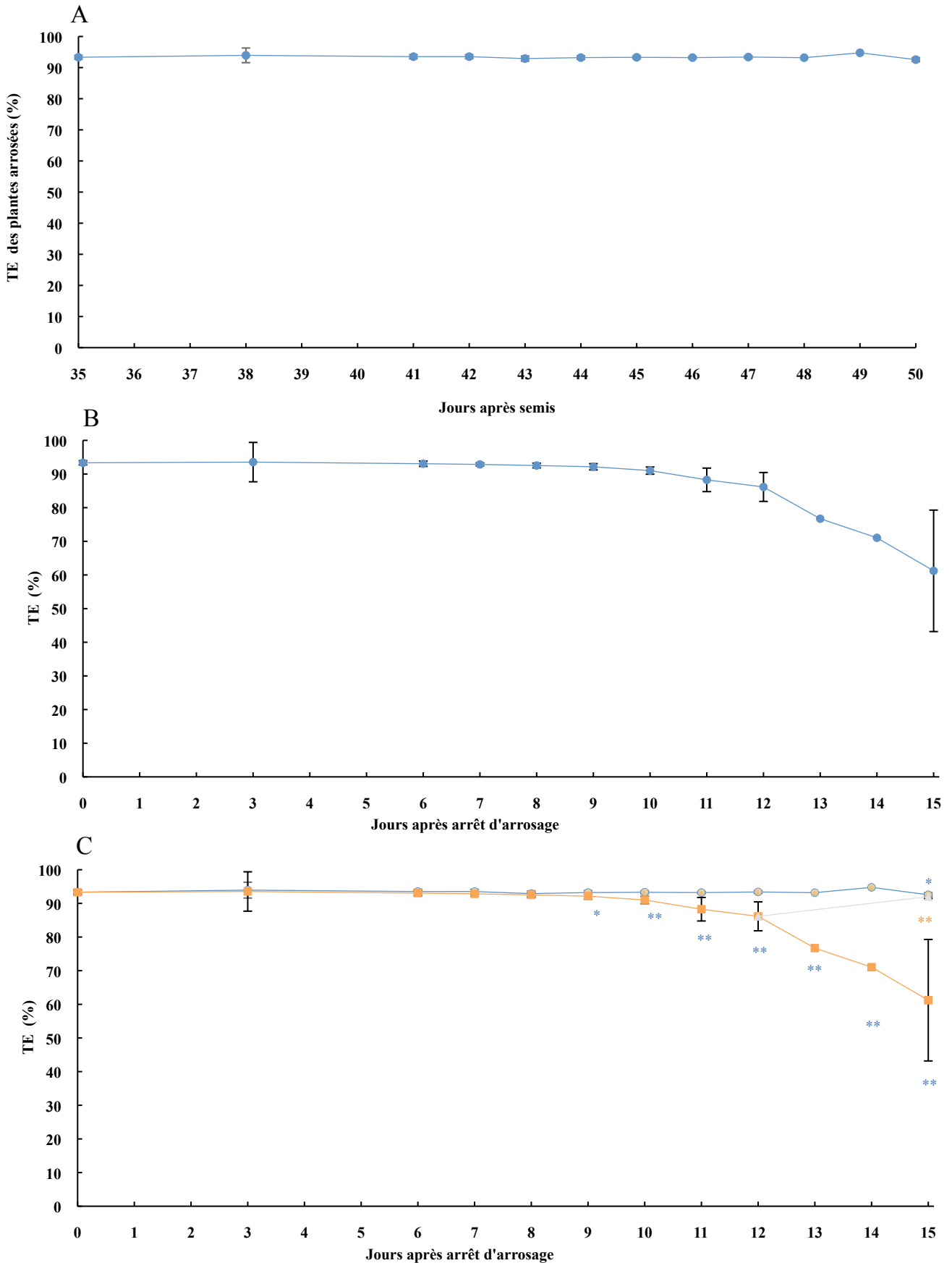


Figure 45 : analyse de la teneur en eau (TE) chez les plantes arrosées, non arrosées et réhydratées. Les valeurs représentent les moyennes de 2 répétitions biologiques pour les jours 48 et 49 après semis, $n = 10$ plantes et 3 répétitions biologiques (\pm écart type) $n = 15$ plantes pour tous les autres jours de prélèvement. Les lettres représentent les valeurs de moyennes déterminées comme statistiquement différentes par un test de Kruskal-Wallis suivi du test Dunn de comparaisons multiples, corrigé par Bonferroni (p .value $< 0,05$). Les astérisques représentent des valeurs statistiquement différentes déterminées par des tests de Mann-Whitney (* = p .value $< 0,05$, ** = p .value $< 0,0001$).

changements physiologiques pouvant être caractérisés. L'idée étant de caractériser au mieux les réponses physiologiques des plantes arrosées et non arrosées à chacune des 4 phases déterminées précédemment.

3.2.1 Analyse de la teneur en eau dans les rosettes

La teneur en eau (TE) des rosettes des plantes arrosées entre 35 et 50 jours après semis est relativement stable (figure 45 A), avec une moyenne de $93,3 \pm 1,1$ %. Sur les 165 plantes arrosées étudiées, 147 plantes (89%) ont une TE se situant entre 92,2 et 94,4 %. Ainsi pour la suite de l'analyse, la TE des rosettes des plantes arrosées sera délimitée par des valeurs de 92,2 et de 94,4%. Les valeurs aberrantes, plus faibles ou plus importantes seront considérées comme négligeables. En effet, les valeurs inférieures à 92,2% concernent 7 plantes sur un total de 165, soit 4,2 % des rosettes analysées et les valeurs supérieures à 94,4% de TE concerne 10 plantes sur 165 (6,0 %).

La TE est stable, chez les plantes non arrosées, jusque J9, puis elle diminue jour après jour pour atteindre une valeur de $61,2 \pm 9,2$ % à J15 (figure 45 B).

La TE est stable, chez les plantes non arrosées, jusqu'à J9, puis elle diminue jour après jour pour atteindre une valeur de $61,2 \pm 9,2$ % à J15 (figure 45 B).

La comparaison de l'évolution de la TE dans les rosettes des plantes arrosées et non arrosées pendant 15 jours est représentée dans la figure 45 C. Jusqu'à J8, il n'y a pas de différence significative, ainsi huit jours sans apport d'eau dans le substrat ne modifie pas la TE dans les rosettes ($TE = 93,3 \pm 1,1$ % ; figure 45 A et C). Entre J9 et J12, la TE dans les rosettes des plantes non arrosées diminue progressivement. A J9 la TE est égale à $92,1 \pm 0,9$ %, ce qui est légèrement inférieur à la valeur seuil de 92,2% déterminée précédemment pour caractériser une plante arrosée et à J12, elle est de $86,2 \pm 4,3$ %. Après J12, la TE diminue rapidement jusqu'à J15 où elle est égale à $61,2 \pm 9,2$ %. L'écart type à partir de J9 pour les plantes non arrosées est plus important que chez les plantes arrosées, et révèle une hétérogénéité de réponses physiologiques à la carence en eau, entre les différentes plantes au cours du temps. Chaque individu répond plus ou moins rapidement à la carence en eau, au niveau de la diminution de la TE dans les rosettes. Le temps après arrêt d'arrosage n'est donc pas le paramètre le plus approprié pour caractériser les effets de la carence en eau sur les plantes.

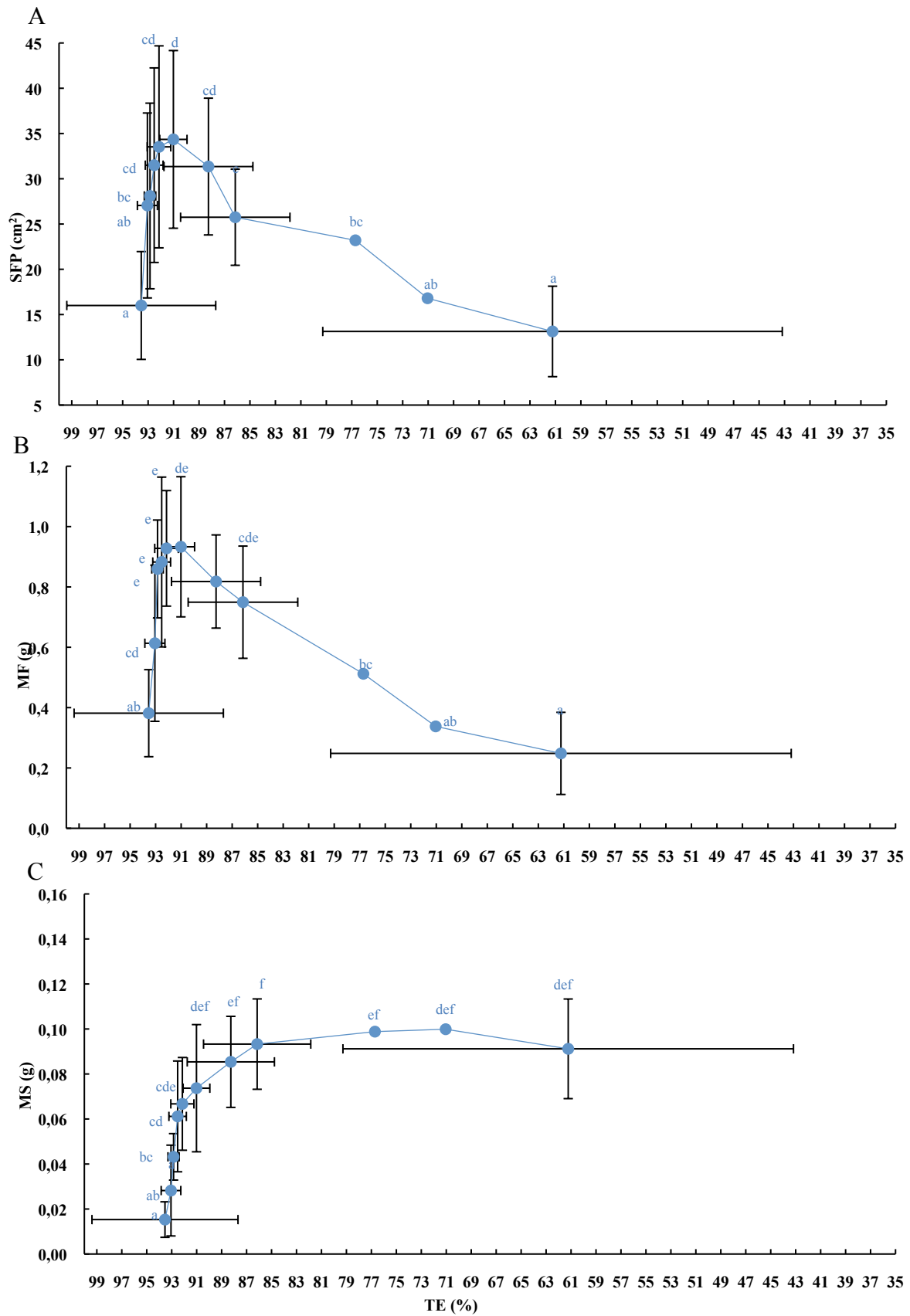


Figure 46 : évolution de la surface foliaire projetée (SFP), de la masse fraîche (MF) et de la masse sèche (MS) en fonction de la teneur en eau (TE) pour les plantes non arrosées. Les valeurs représentent les moyennes de 2 répétitions biologiques pour les jours 48 et 49 après semis, n = 10 plantes et 3 répétitions biologiques (± écart type), n = 15 plantes pour tous les autres jours de prélèvement. Les lettres représentent les valeurs de moyennes déterminées comme statistiquement différentes par un test de Kruskal-Wallis suivi du test Dunn de comparaisons multiples (p.value < 0,05), corrigé par Bonferroni.

A J15, les rosettes des plantes réhydratées, ont une TE plus proches de celle des plantes arrosées que des plantes non arrosées (figure 45 C). Néanmoins, avec $91,9 \pm 0,54$ % de TE, les plantes réhydratées sont encore statistiquement différentes des plantes arrosées.

Pour les plantes non arrosées, les écarts types à partir de J9 sont plus importants que pour les plantes arrosées et révèlent une hétérogénéité de réponses physiologiques à la carence en eau, entre les différentes plantes au cours du temps de déficit hydrique. Chaque individu répond plus ou moins rapidement à la carence en eau, du moins en ce qui concerne la diminution de la TE dans les rosettes. Le temps après l'arrêt d'arrosage n'est donc pas le paramètre le plus approprié pour caractériser les effets de la carence en eau sur les plantes. A l'inverse, la TE étant un paramètre très stable chez les plantes arrosées, j'ai choisi de représenter la SFp, la MF et la MS en fonction de la TE, afin de voir comment elles évoluent en fonction de ce paramètre chez les plantes non arrosées (figure 46). La SFp des plantes non arrosées augmente jusqu'à une TE de 90% puis diminue (figure 46 A). Une diminution de 1,8 % de la TE (de 92,2% à 90%) n'a pas d'effet sur l'expansion de la rosette. La MF des rosettes des plantes non arrosées augmente jusqu'à une TE de 92,2%, est constante jusqu'à une TE de 90% puis diminue au-delà (figure 46 B). Ainsi, dès que la TE devient inférieure à 92,2%, la croissance de la MF est impactée. La MS augmente jusqu'à une valeur de TE de 86%, stagne ensuite jusqu'à une TE de 76%, puis diminue (figure 46 C). La MS continue d'augmenter, même lorsque la TE diminue fortement et ce jusqu'à une valeur seuil de TE de 86%. Toutefois, nous pouvons faire le parallèle avec la figure 42 montrant que la MS augmente moins chez les plantes arrosées que chez les plantes non arrosées entre J8 et J12.

D'après les données issues de l'observation de la SFp, de la MF et de la MS en fonction de la TE, et en se basant sur les 4 phases de croissance déterminées précédemment, il apparaît que :

- la phase 1 comprend les plantes dont les rosettes ont une TE $> 92,2$ %,
- la phase 2 comprend les plantes dont les rosettes ont une TE comprise entre 92,2% et 90%
- la phase 3 comprend les plantes dont les rosettes ont une TE comprise entre 90% et 86%
- la phase 4 comprend les plantes dont les rosettes ont une TE < 86 %

Il n'y a aucune corrélation linéaire entre la SFp, la MF, la MS et la TE chez les plantes arrosées (figure 47 A, B, C). Ceci paraît normal lorsque l'on sait que la TE est très stable chez

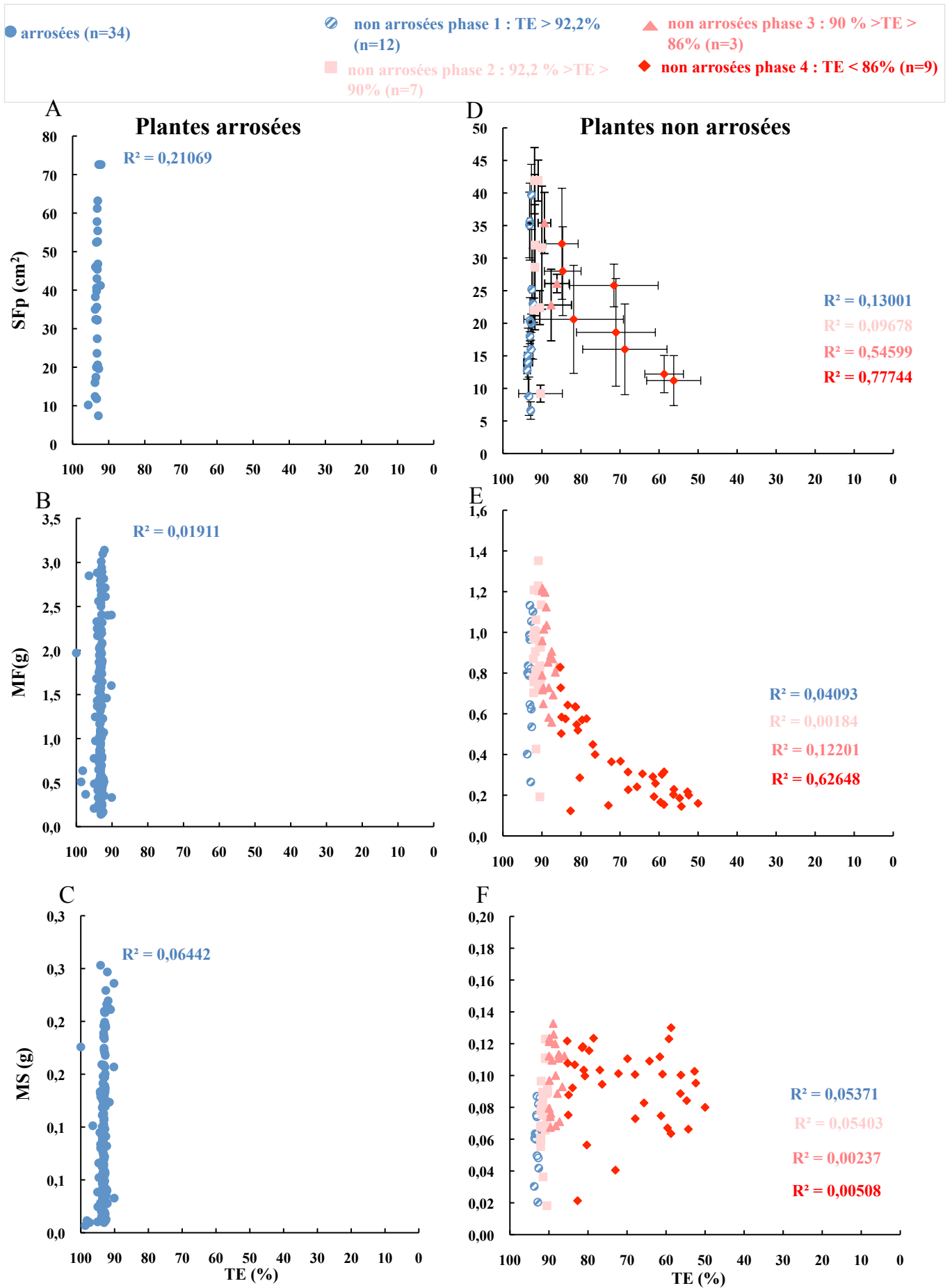


Figure 47: corrélations entre la surface foliaire projetée (SFp), la masse fraîche (MF), la masse sèche (MS) et la teneur en eau (TE) pour les plantes arrosées et non arrosées, pour chacune des 4 phases de croissance. Pour la SFp, chaque point représente la moyenne de 5 plantes d'une seule répétition biologique (\pm écart type, n = 15 plantes soit 3 répétitions). Pour la MF et la MS, les valeurs de chaque plante sont représentées. Le R² est le coefficient de corrélation linéaire. A, B et C = plantes arrosées, D, E et F = plantes non arrosées.

les plantes arrosées. Il n'y a pas de corrélation linéaire entre la SFP, la MF ou la MS et la TE chez les plantes non arrosées, au cours des 15 jours de culture (données non montrées), ni lors d'aucune des quatre phases déterminées ci-dessus (figure 47 D, E, F). Aucun des trois paramètres testés n'évolue de la même manière que la TE et ce, dans aucune des quatre phases.

La diminution de la TE chez les plantes non arrosées est due à une difficulté ou à une incapacité des plantes à absorber l'eau présente dans le sol. Les plantes sont incapables d'absorber l'eau du sol lorsque le potentiel hydrique du sol est plus faible (-1,5MPa) que celui des cellules du système racinaire et que par conséquent le point de flétrissement permanent est atteint. La réhydratation des plantes est un bon indicateur de l'état physiologique de la plante et permet de mettre en évidence que les plantes non arrosées pendant 12 jours (TE = 86,15 %) sont capables, lorsque l'eau est de nouveau disponible, de l'absorber alors que les plantes non arrosées pendant 15 jours (57,84 %) en sont incapables. Le point de flétrissement permanent est donc situé au cours de la phase 4, à partir de J13 qui correspond à une chute importante de la MS et à une TE de 76%. La mesure de la masse turgide (MT) des rosettes et le calcul de la teneur relative en eau (TRE), permettront de mieux caractériser l'état physiologique des plantes en fonction des conditions hydriques, lors des 15 jours de culture.

3.2.2 Analyse de la masse turgide : capacité d'absorption d'eau des feuilles

Chez les plantes arrosées, la masse turgide (MT) augmente progressivement entre 35 et 50 jours après semis (figure 48 A), elle est de $0,26 \pm 0,07$ g 35 jours après semis et de $3,2 \pm 0,47$ g quinze jours plus tard. La MT augmente d'un facteur 12, ce qui est proche du facteur d'augmentation de la MF ($\times 10,4$, figure 41 A). Entre 35 et 50 jours après semis, le R^2 entre la MT de la rosette et l'âge des plantes arrosées est égal à 0,950 (donnée non montrée). Cette valeur indique qu'il y a une corrélation linéaire entre les deux paramètres. Deux coefficients de corrélation linéaires égaux à 0,993 ont aussi été calculés entre la MT et le temps de 35 à 41 jours après semis et 41 à 50 jours après semis (figure 48 A). Ceci indique, comme pour la MF et la MS que la MT augmente moins vite entre 35 et 41 jours après semis (0,185 g/jour) qu'entre 41 et 50 jours après semis (0,262g/jour).

De ce fait, même si une corrélation linéaire entre MT et temps après semis est avérée, entre 35 et 50 jours, la MT n'augmente pas à la même vitesse tout au long des 15 jours d'expérimentation. Ceci a déjà été mis en évidence pour la MF (figure 41 A) et la MS (figure 42 A).

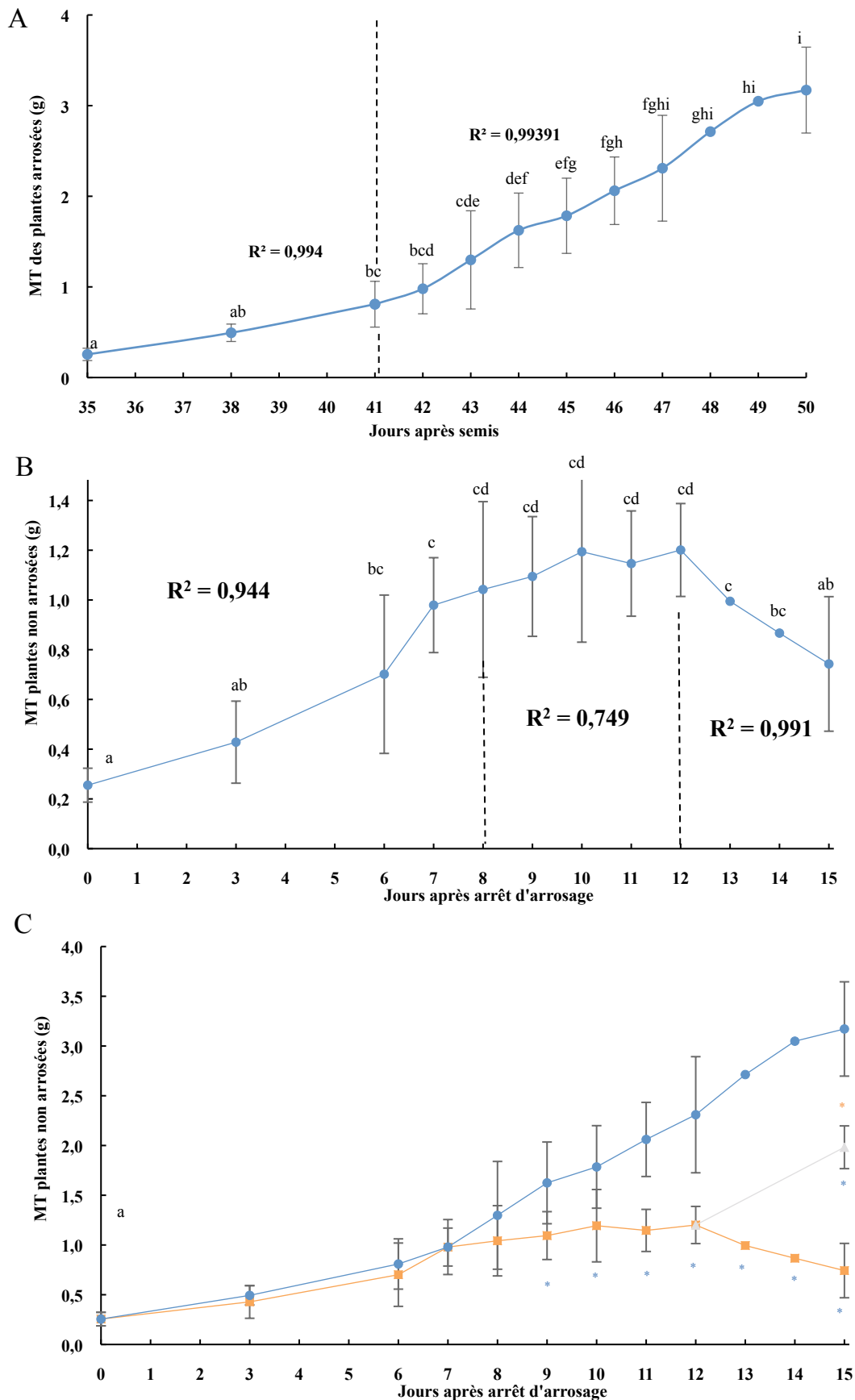


Figure 48 : analyse de la masse turgide (MT) chez les plantes arrosées, non arrosées et réhydratées. Les valeurs représentent les moyennes de 2 répétitions biologiques pour les jours 48 et 49 après semis, $n = 10$ plantes et 3 répétitions biologiques (\pm écart type) $n = 15$ plantes pour tous les autres jours de prélèvement. Les lettres représentent les valeurs de moyennes déterminées comme statistiquement différentes par un test de Kruskal-Wallis suivi du test Dunn de comparaisons multiples (p .value $< 0,05$), avec la correction de Bonferroni. Les astérisques représentent des valeurs statistiquement différentes déterminées par des tests de Mann-Whitney (* = p .value $< 0,05$, ** = p .value $< 0,0001$).

Chez les plantes non arrosées, la MT augmente progressivement entre J0 et J8 (figure 48 B), de $0,26 \pm 0,07$ g, à $1,04 \pm 0,34$ g, respectivement, soit une augmentation d'un facteur 4 en 8 jours. Cette augmentation est comparable à celle observée chez les plantes arrosées. Entre J8 et J12, la MT des plantes non arrosées est constante ($1,00 \text{ g} \pm 0,20$), puis, dès J12, la MT chute significativement pour passer à $0,74 \pm 0,26$ g à J15 ce qui correspond à une diminution d'un facteur 1,4 en 3 jours. Les cellules de la rosette seraient incapables d'absorber l'eau lorsque les plantes n'ont pas été arrosées pendant plus de 12 jours.

A partir de J9, la MT des plantes non arrosées est significativement plus faible que la MT des plantes arrosées (figure 48 C). La MT des plantes réhydratées est de $2,0 \pm 0,21$ g à J15, ce qui est 2,7 fois plus que celle des plantes non arrosées ($0,74 \pm 0,26$ g) et 4,3 fois moins que celle des plantes arrosées ($3,2 \pm 0,47$ g). Les plantes réhydratées sont capables d'absorber de l'eau, mais cette absorption ne compense pas totalement la perte initiale d'eau. En effet, les plantes ont subi un retard de croissance et un stress lié à la carence en eau, de ce fait i) elles peuvent avoir plus de mal à absorber l'eau même 3 jours après réhydratation, que les plantes arrosées, ii) les plantes étant plus petites, le volume d'eau qu'elles contiennent est plus faible.

La MT des plantes non arrosées augmente jusqu'à une valeur de TE de 92,2%, stagne jusqu'à une TE de 86 % et diminue ensuite (figure 49). Cela signifierait que, malgré la perte d'eau, la rosette peut, si de l'eau est de nouveau disponible, accumuler de l'eau jusqu'à une TE de 86 %. Cette hypothèse peut être renforcée par les observations précédentes, montrant la capacité des plantes à se réhydrater après arrosage jusqu'à 12 jours après arrêt total d'arrosage. Par contre, la réhydratation n'est plus possible à J15.

Chez les plantes arrosées, il n'y a pas de corrélation linéaire entre la MT et la TE (figure 50 A), ni entre la MT et la SFp (figure 50 B). En revanche, l'augmentation de la MT est corrélée avec l'augmentation de la MF et de la MS (figures 50 C et D).

Chez les plantes non arrosées, il n'y a pas de corrélation linéaire entre la MT et la TE, dans aucune des 4 phases de stress déterminées précédemment (figure 51 A). Il y a une corrélation linéaire entre la MT et la SFp dans la phase 4 (TE < 86%) avec un R^2 de 0,962 (figure 51 B). Ceci suggère que dans cette phase, la chute importante de la MT provoque le flétrissement des rosettes durant cette phase. Durant la phase 1 (TE > 92,2 %), il y a, comme chez les plantes arrosées, une corrélation linéaire entre MF et MT ($R^2 = 0,998$, figure 51 C) et entre MS et MT ($R^2 = 0,963$, figure 51 D). Ces corrélation diminuent légèrement durant la phase 2 (TE compris entre 92,2% et 90 %), avec des R^2 de 0,958 et 0,960, respectivement

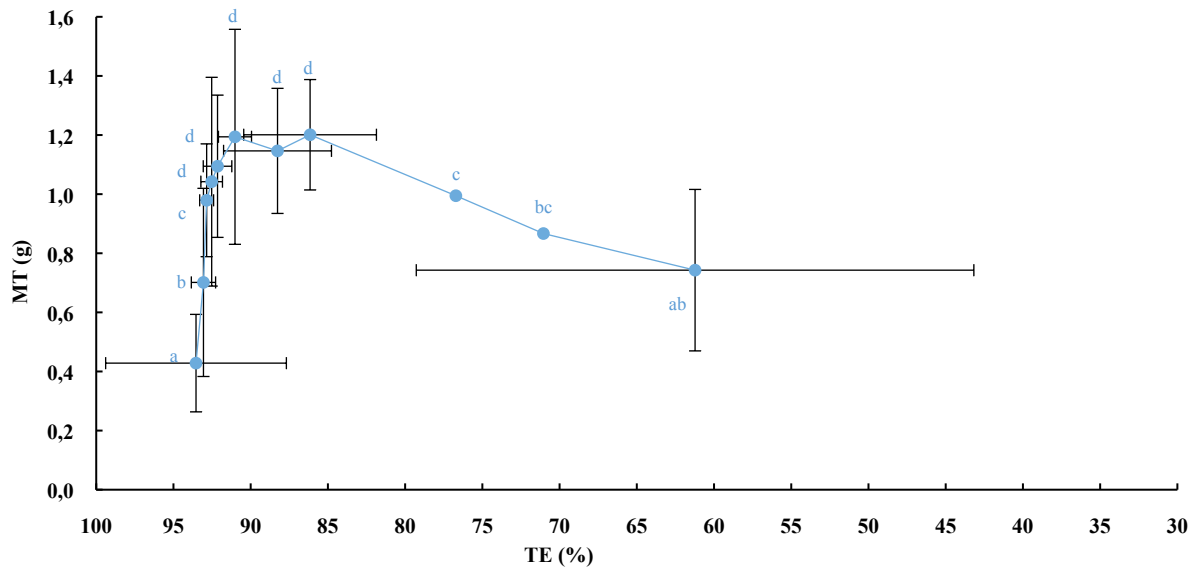


Figure 49 : analyse de la masse sèche (MT) en fonction de la teneur en eau (TE) chez les plantes non arrosées. Les valeurs représentent les moyennes de 2 répétitions biologiques pour les jours 48 et 49 après semis, n = 10 plantes et 3 répétitions biologiques (\pm écart type), n = 15 plantes pour tous les autres jours de prélèvement. Les lettres représentent les valeurs de moyennes déterminées comme statistiquement différentes par un test de Kruskal-Wallis suivi du test Dunn de comparaisons multiples (p.value < 0,05), corrigé par Bonferroni.

Plantes arrosées (n=34)

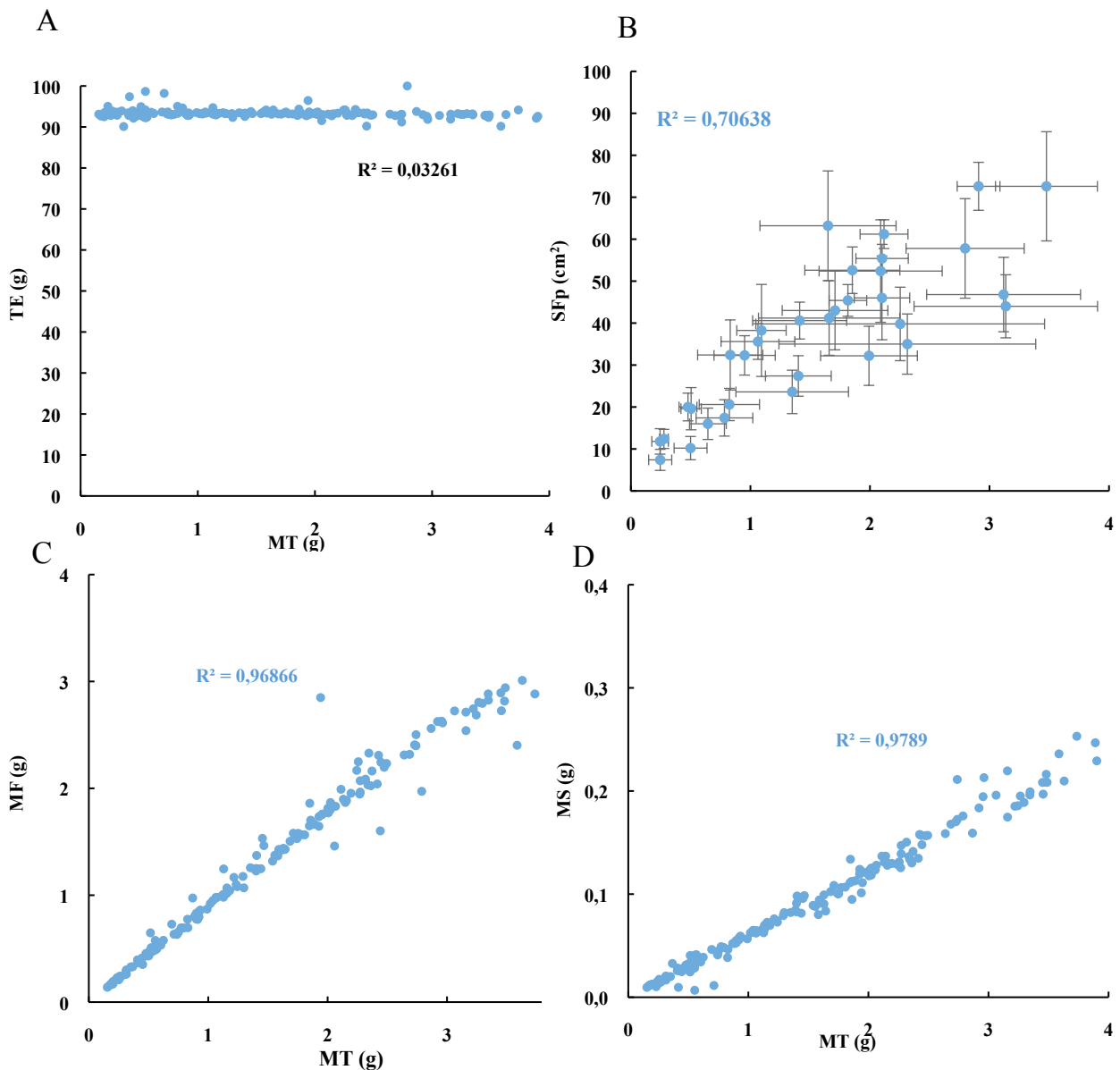


Figure 50 : corrélations entre la surface foliaire projetée (SFp), la masse fraîche (MF), la masse sèche (MS), la teneur en eau (TE) et la masse turgide (MT) chez les plantes arrosées. Pour la SFp, chaque point représente la moyenne de 5 plantes d'une seule répétition biologique (\pm écart type, n = 15 plantes soit 3 répétitions). Pour la MF et la MS, les valeurs de chaque plante sont représentées. Le R^2 est le coefficient de corrélation linéaire.

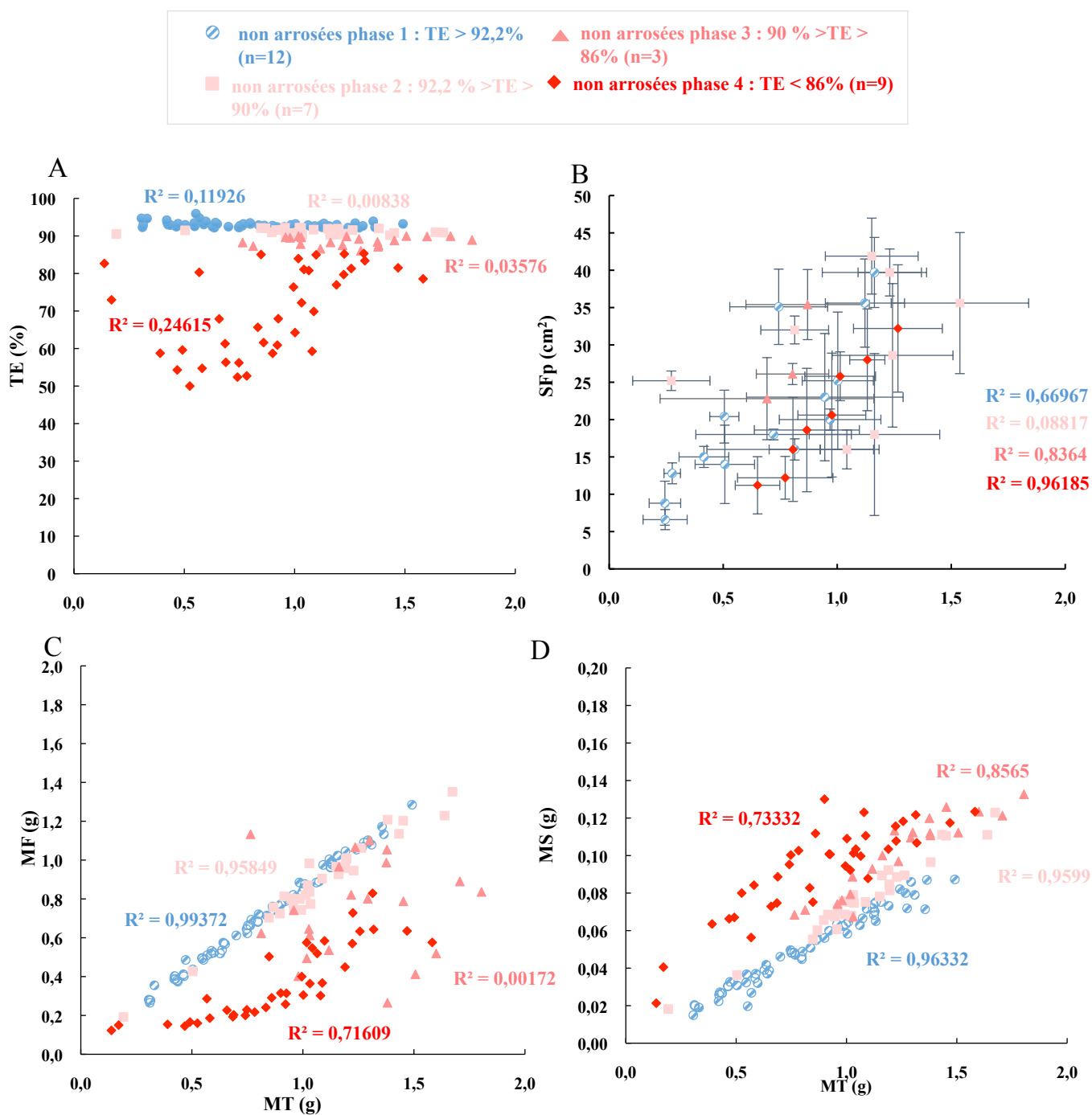


Figure 51 : corrélations entre la surface foliaire projetée (SFp), la masse fraîche (MF), la masse sèche (MS), la teneur en eau (TE) et la masse turgide (MT) chez les plantes non arrosées. Pour la SFp, chaque point représente la moyenne de 5 plantes d'une seule répétition biologique (\pm écart type, n = 15 plantes soit 3 répétitions). Pour la MF et la MS, les valeurs de chaque plante sont représentées. Le R^2 est le coefficient de corrélation linéaire.

(figures 51 C et D). Dès que la TE des rosettes est inférieure à 90% (phase 3), il n'y a plus de corrélation linéaire entre la MF et la MT et entre la MS et la MT (figures 51 C et D). Dès que la TE des rosettes est inférieure à 90%, il n'y a plus de corrélation linéaire entre MF et MT et entre MS et MT (figures 51 C et D). La MF commence à diminuer avant la MT et la MS augmente encore alors que la MT va diminuer.

3.2.3 *Analyse de la teneur relative en eau dans les rosettes, indicateur de l'état hydrique des plantes*

La teneur relative en eau a été calculée dans le but d'appréhender l'état hydrique des plantes. En effet, les mesures de MT indiquent que dans les rosettes ayant une TE inférieure à 86%, la MT diminue. Ceci pourrait signifier une chute drastique de la teneur relative en eau (TRE), indiquant que les plantes sont carencées en eau.

La TRE moyenne dans les rosettes des plantes arrosées est comprise entre 84,5 et 91,8 % (figure 52 A). La moyenne de TRE chez les plantes arrosées est de $87,9 \pm 5,8$ %.

Chez les plantes non arrosées, la TRE diminue à partir de J9 (figure 52 B) ce qui correspond à une TE de $92,1 \% \pm 0,9 \%$ (figure 53). A ce stade, la TRE est de $83 \pm 2,5$ %. Quand la TE atteint une valeur de 92,1% (valeur constatée pour les plantes en phase 2 de croissance), la TRE est équivalente à 84%, ce qui est bien inférieur à la valeur seuil de 84,5 % qui permet de caractériser des plantes arrosées (figure 53). De plus, la chute de TE à partir de ces valeurs s'accompagne également d'une chute de la TRE plus importante encore puisqu'à J15 elle est en moyenne de $26 \pm 9,9$ % à J15 contre 61 ± 18 % pour la TE (figure 53).

Chez les plantes arrosées et non arrosées la valeur moyenne des TRE est relativement stable dans les rosettes entre J0 et J9 (figure 52 C). Ce n'est qu'à partir de J9 que la TRE diminue significativement chez les plantes non arrosées (figures 52 B et C). Trois jours après réhydratation par arrosage à l'eau, les plantes non arrosées pendant 12 jours ont une TRE proche de celle des plantes arrosées ($84,6 \pm 5,9$ % pour les plantes réhydratées et $87,4 \pm 9,7$ % pour les plantes arrosées). Les plantes réhydratées reprennent donc à J15, une valeur de TRE caractéristique des plantes arrosées.

Puisque les mesures sont plus ou moins stables dans les plantes arrosées, il n'y a pas de corrélation linéaire entre TE et TRE (figure R mesures physio 15 A). Toutefois, la TRE est moins stable que la TE au cours des 15 j de culture (figure 54 A). Les valeurs, plante par plante, sont comprises entre 60 et 100 % pour la TRE et entre 90 et 100 % pour la TE. Cela

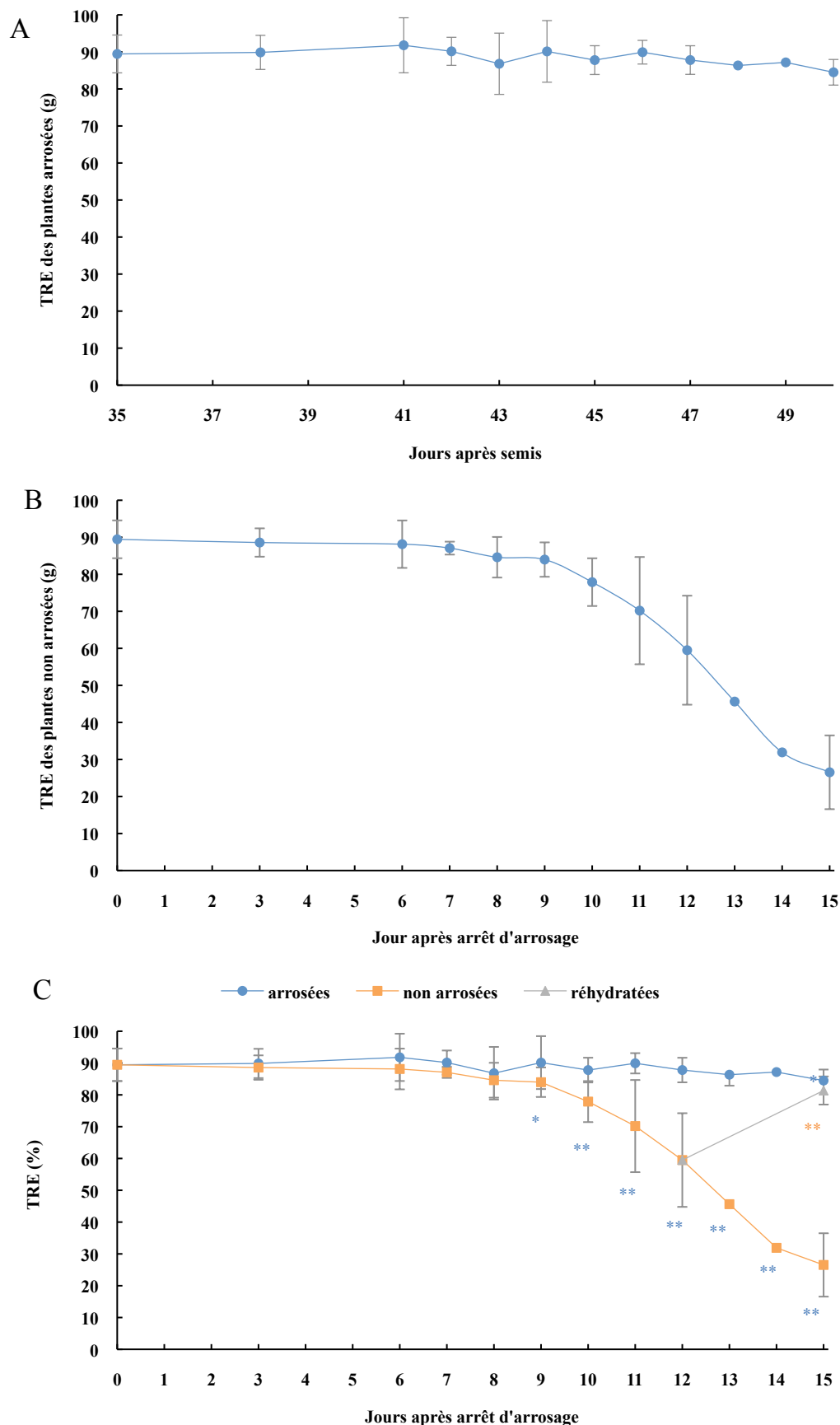


Figure 52 : analyse de la teneur relative en eau (TRE) chez les plantes arrosées, non arrosées et réhydratées. Les valeurs représentent les moyennes de 2 répétitions biologiques pour les jours 48 et 49 après semis, $n = 10$ plantes et 3 répétitions biologiques (\pm écart type), $n = 15$ plantes pour tous les autres jours de prélèvement. Les lettres représentent les valeurs de moyennes déterminées comme statistiquement différentes par un test de Kruskal-Wallis suivi du test Dunn de comparaisons multiples (p .value $< 0,05$), corrigé par Bonferroni. Les astérisques représentent des valeurs statistiquement différentes déterminées par des tests de Mann-Whitney (* = p .value $< 0,05$, ** = p .value $< 0,0001$).

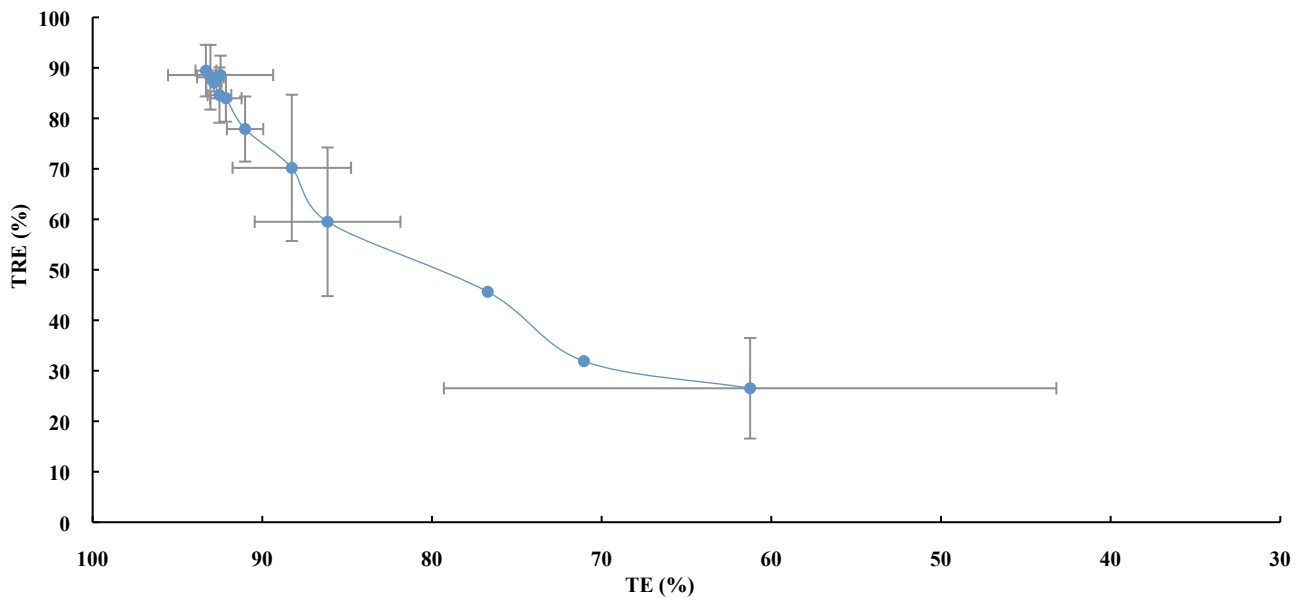


Figure 53 : analyse de la teneur relative en eau (TRE) en fonction de la teneur en eau (TE) chez les plantes non arrosées. Les valeurs représentent les moyennes de 2 répétitions biologiques pour les jours 48 et 49 après semis, n = 10 plantes et 3 répétitions biologiques (\pm écart type) n = 15 plantes pour tous les autres jours de prélèvement. Les lettres représentent les valeurs de moyennes déterminées comme statistiquement différentes par un test de Kruskal-Wallis suivi du test Dunn de comparaisons multiples (p.value < 0,05), avec corrections de Bonferroni.

● arrosées (n=34)

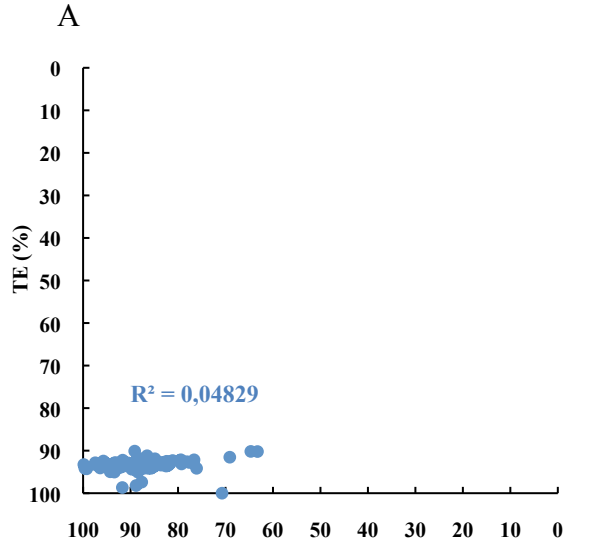
○ non arrosées phase 1 : TE > 92,2% (n=12)

▲ non arrosées phase 3 : 90 % >TE > 86% (n=3)

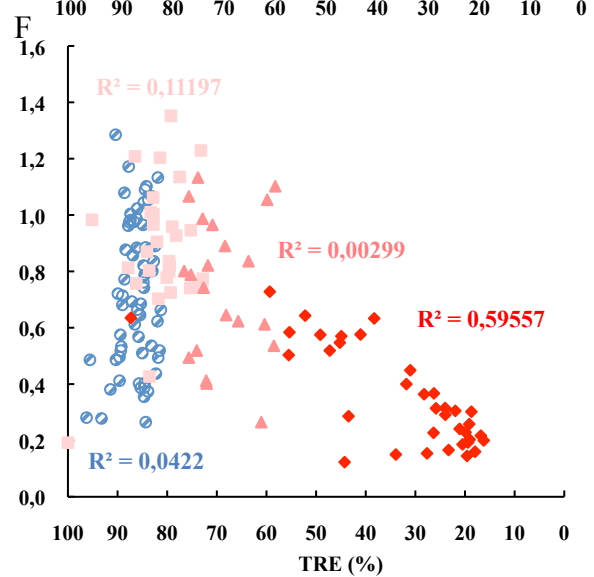
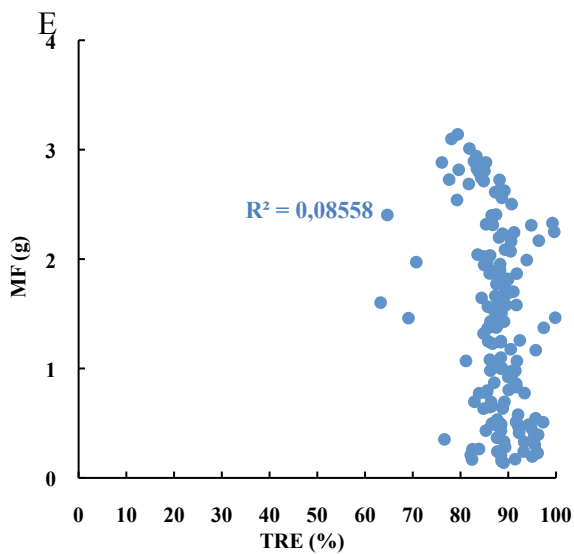
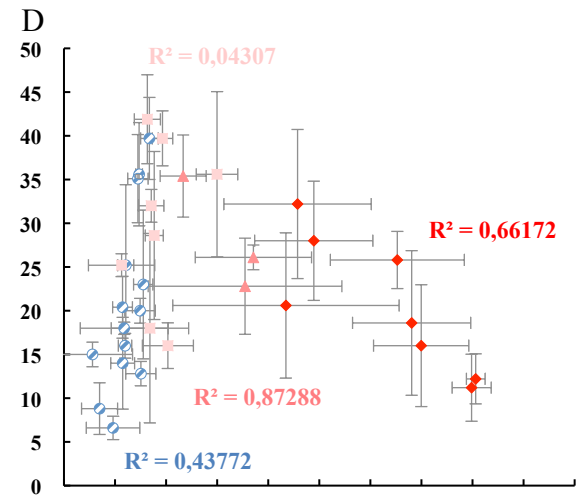
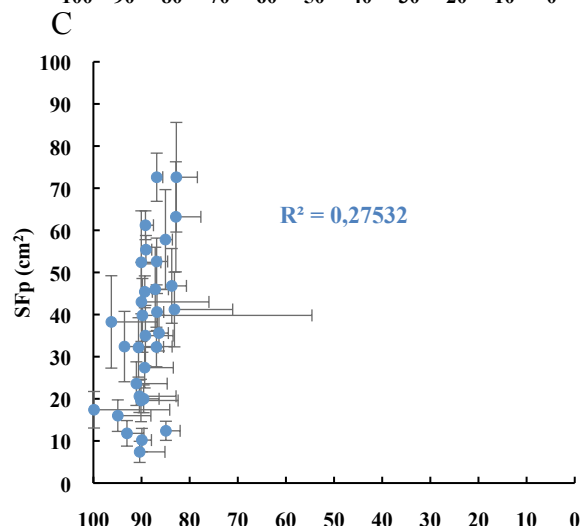
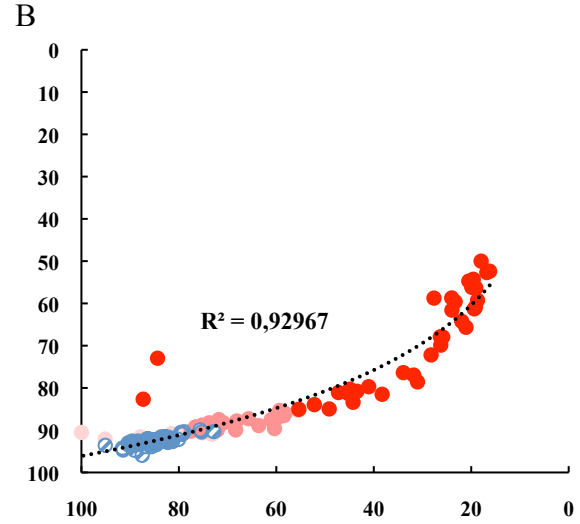
■ non arrosées phase 2 : 92,2 % >TE > 90% (n=7)

◆ non arrosées phase 4 : TE < 86% (n=9)

Plantes arrosées



Plantes non arrosées



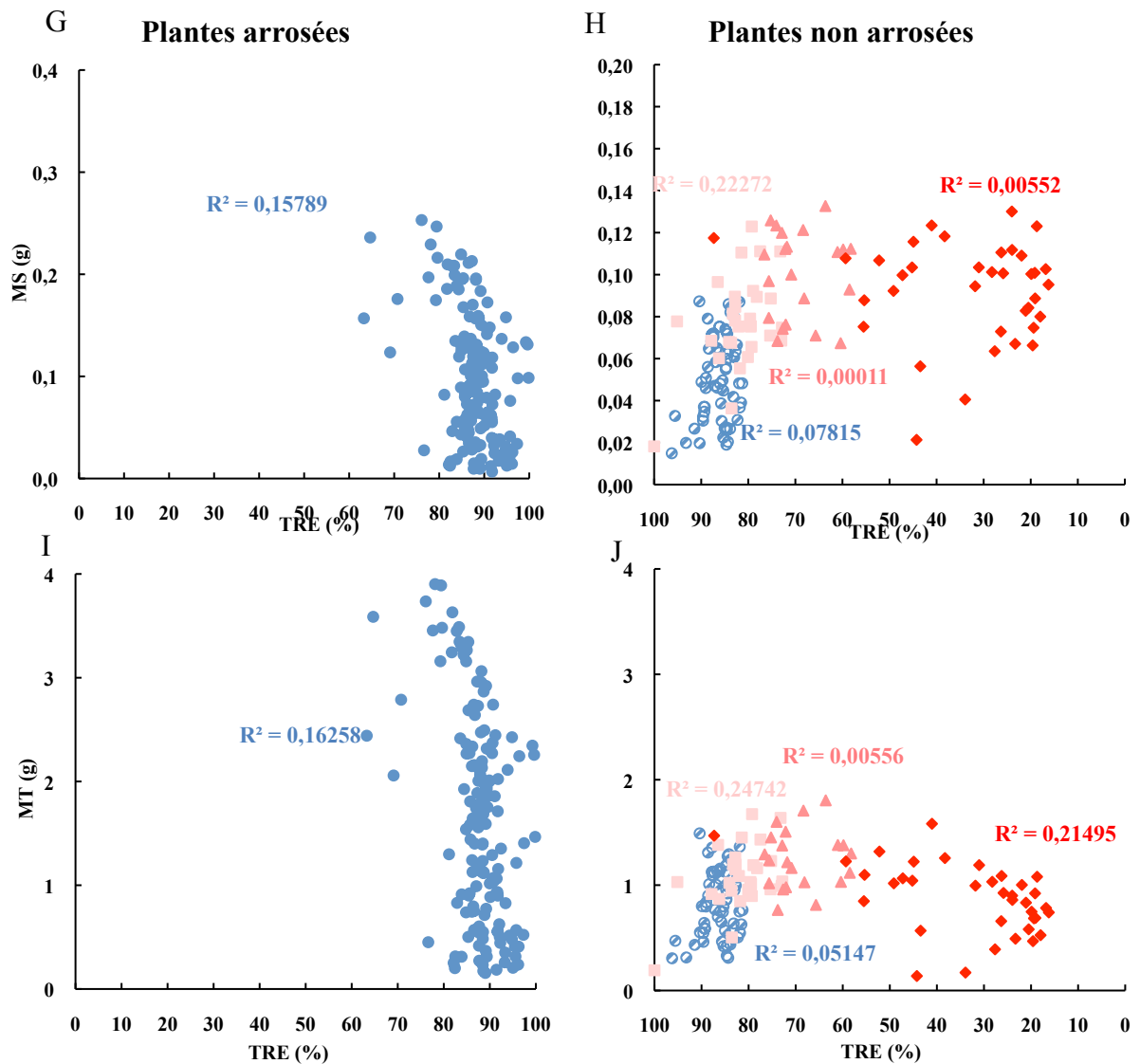
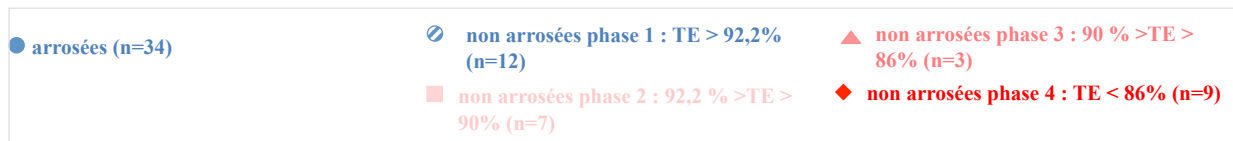


Figure 54 : corrélations entre la surface foliaire projetée (SFp), la masse fraîche (MF), la masse sèche (MS), la teneur en eau (TE) et la masse turgide (MT) et la teneur relative en eau (TRE) chez les plantes arrosées et non arrosées. Pour la SFp, les valeurs représentent les moyennes de chacune des 3 répétitions biologiques (\pm écart type, n = 5 plantes). Pour la MF, la MS, la TE, la MT et la TRE, les valeurs de chaque plantes sont représentées. Le R^2 est le coefficient de corrélation linéaire ou logarithmique pour la figure B.

confirme que la TE serait, le meilleur paramètre de référence pour caractériser l'effet de la carence en eau sur les rosettes. Il n'y a pas non plus de corrélation linéaire entre la SFp, la MF, la MS, la MT et la TRE, et ce, chez les plantes arrosées comme chez les plantes non arrosées, pour les 4 phases de TE déterminées précédemment (figures 54 B, C, D, E, G, H, I et J). L'absence de corrélation linéaire entre la TRE et la MF, la MS et la MT des rosettes de plantes arrosées entre 35 et 50 jours après semis, est liée au fait que les différentes masses augmentent alors que la TRE n'augmente pas tout au long de la cinétique. Chez les plantes arrosées, tous les paramètres mesurés évoluent de manière différente à partir du moment où la TE est inférieure à 92,2% et la TRE inférieure à 84,5%. En ce qui concerne la TRE chez les plantes non arrosées, il n'y a pas de corrélation linéaire avec la TE pour une TE supérieure à 92,2% (figure 54 B). Il y a, en revanche, une bonne corrélation pour une TE, inférieure à 92,2% et la TRE (figure 54 B, $R^2 = 0,88$). La TE et la TRE diminuent en même temps, à partir d'un seuil de 92,2 % pour la TE correspondant à une TRE de 84,5%.

3.2.4 Mesure de la conductance stomatique (CS)

De manière générale, dans une plante se développant dans des conditions hydriques favorables, à l'interface feuille/atmosphère l'eau peut passer de la plante vers l'atmosphère par le biais du processus de transpiration, au niveau des stomates, mais elle peut aussi être stockée dans les vacuoles des cellules du mésophylle. Si les valeurs de TE, MT et TRE diminuent à partir d'un certain temps après arrêt d'arrosage, c'est que l'eau vient à manquer pour la plante. La fermeture des stomates est alors un mécanisme adapté pour réduire la perte en eau due à la transpiration.

Afin de déterminer si un tel mécanisme a lieu chez *A. thaliana*, dans les conditions de carence en eau mises en place lors de la présente étude, la conductance stomatique (CS) a été mesurée à l'aide d'un poromètre.

Pour l'étude de la CS, seules deux répétitions ont été analysées (Cf Matériel et Méthodes).

La CS est stable chez les plantes arrosées, néanmoins les valeurs mesurées varient, selon les plantes, de $160,0 \pm 47,5$ à $106,0 \pm 46,0$ mmol/m²/s (figure 55 A, n=10 plantes). De ce fait, seront considérées comme semblables toutes les mesures de CS supérieures ou égales à 106 mmol/m²/s.

Dans le cas des plantes non arrosées, à partir de J8, la CS commence à diminuer (figure 55 B). Une valeur de CS inférieure ou égale à 20 mmol/m²/s peut être considérée comme reflet

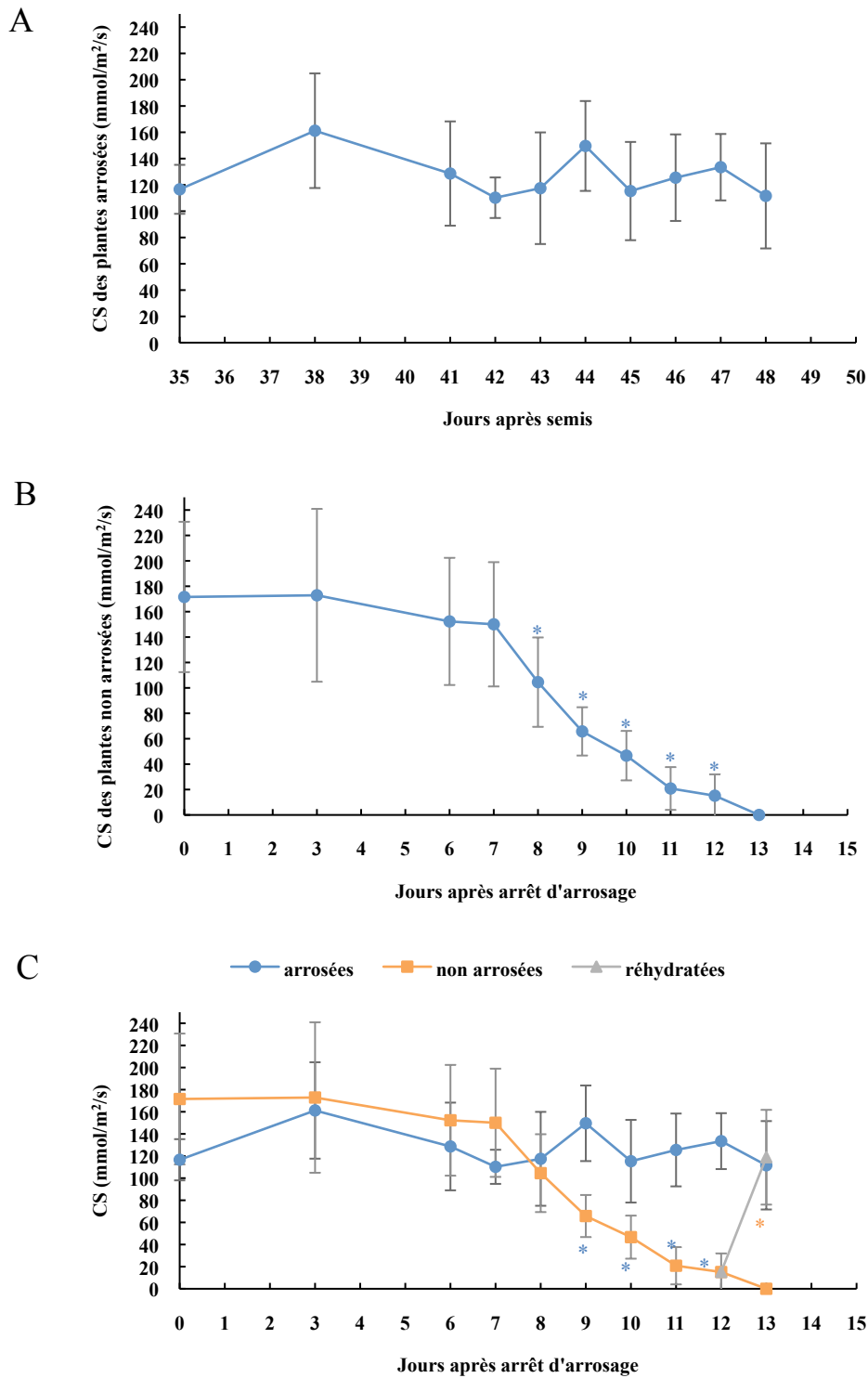


Figure 55 : analyse de la conductance stomatique (CS) chez les plantes arrosées, non arrosées et réhydratées. Les valeurs représentent les moyennes de 2 répétitions biologiques pour les jours 48 et 49 après semis , n = 10 plantes et 3 répétitions biologiques (+/- écart type) n = 15 plantes pour tous les autres jours de prélèvement. Les lettres représentent les valeurs de moyennes déterminées comme statistiquement différentes par un test de Kruskal-Wallis suivi du test Dunn de comparaisons multiples (p.value < 0,05), corrigé par Bonferroni. Les astérisques représentent des valeurs statistiquement différentes déterminées par des tests de Mann-Whitney (* = p.value < 0,05, ** = p.value < 0,0001).

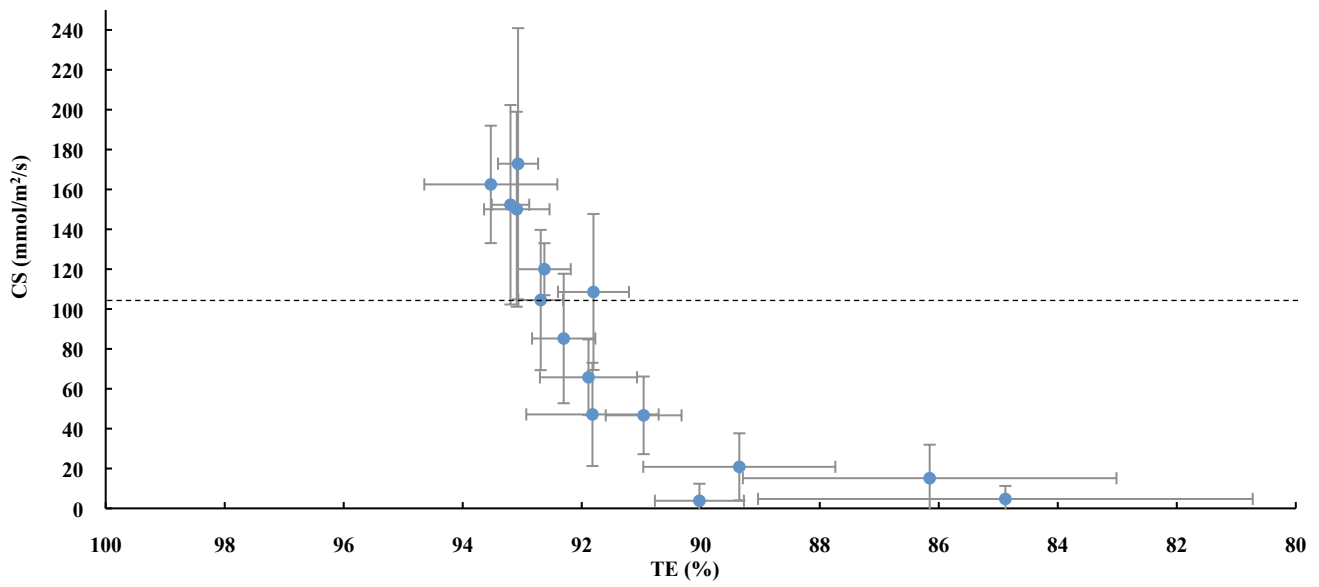


Figure 56: analyse de la conductance stomatique (CS) en fonction de la teneur en eau (TE) chez les plantes non arrosées. Les valeurs représentent les moyennes de 3 répétitions biologiques (\pm écart type), $n=15$ plantes. La barre pointillée verticale indique le seuil de valeur de la CS permettant de caractériser des plantes arrosées ($106 \text{ mmol/m}^2/\text{s}$).

d'une fermeture importante des ostioles (entre 75 % et 92 % de fermeture) et a lieu à partir de J10 (figures 55 B et C).

La CS des plantes non arrosées est statistiquement différente de la CS des plantes arrosées à partir de J9 (figure 55 C). Les conclusions qui peuvent être faites pour cette mesure sont d'ordre qualitatif (diminution, augmentation et fermeture importante des stomates), et ce en raison de la difficulté d'effectuer les mesures sur les petites plantes, lors des premiers jours de la cinétique, et lors des derniers jours en raison du flétrissement des feuilles. Néanmoins, nous pouvons conclure que la CS des plantes non arrosées diminue entre une TE de 92,2% et de 90 %. Lorsque la TE passe sous la barre des 90%, les stomates sont majoritairement fermés (figure 56) et la CS baisse d'au moins 75%. A J15, (TE < 70%), il n'est plus possible de mesurer des valeurs avec le poromètre chez les plantes non arrosées, les feuilles étant très flétries. Les plantes réhydratées ont une conductance stomatique à J15 du même ordre que celle mesurée chez les plantes arrosées (figure 55 C).

3.2.5 Comparaison de l'aspect des cellules de feuilles après 10, 12 et 15 jours de culture en condition d'arrosage ou de déficit hydrique

La CS diminue dès lors que la TE passe sous la barre des 92,2 % (J9). A J10, la CS n'est plus mesurable, ce qui correspond à la fermeture généralisée des stomates, et à une valeur de TE des plantes de 90 %. La MF et la SFp diminuent à partir d'une TE de 90 % et la MT et diminue à partir d'une TE de 86 %. La MS diminue lorsque la TE des plantes est inférieure à 76 %, soit à J13.

Les trois valeurs de TE (90 %, 86 % et 76 %) peuvent être considérées comme charnières dans l'évolution du statut hydrique des plantes non arrosées et définissent le début de la phase 3, le début de la phase 4 et la fin de la phase 4 de la carence en eau. Aussi, une observation de coupes semi-fines de feuilles a été effectuée à J10, J12 et J14 pour visualiser l'aspect des cellules dans ces trois phases.

Dans le cas des plantes arrosées, quel que soit le jour considéré les observations sont similaires et d'autre part, il n'y a pas de différence notable entre les cellules des plantes arrosées ou non arrosées à J10 (TE 90%) et à J12 (TE 86%) (figure 57).

Les cellules de l'épiderme et du mésophylle sont turgescentes ce qui est notamment mis en évidence par la présence de chloroplastes plaqués contre la membrane plasmique et la paroi, par la vacuole pleine d'eau. Les espaces intercellulaires, comme les chambres sous stomatiques et les espaces lacuneux entre les cellules sont nettement visibles (figures 57 A, B,

Plantes arrosées

Plantes non arrosées

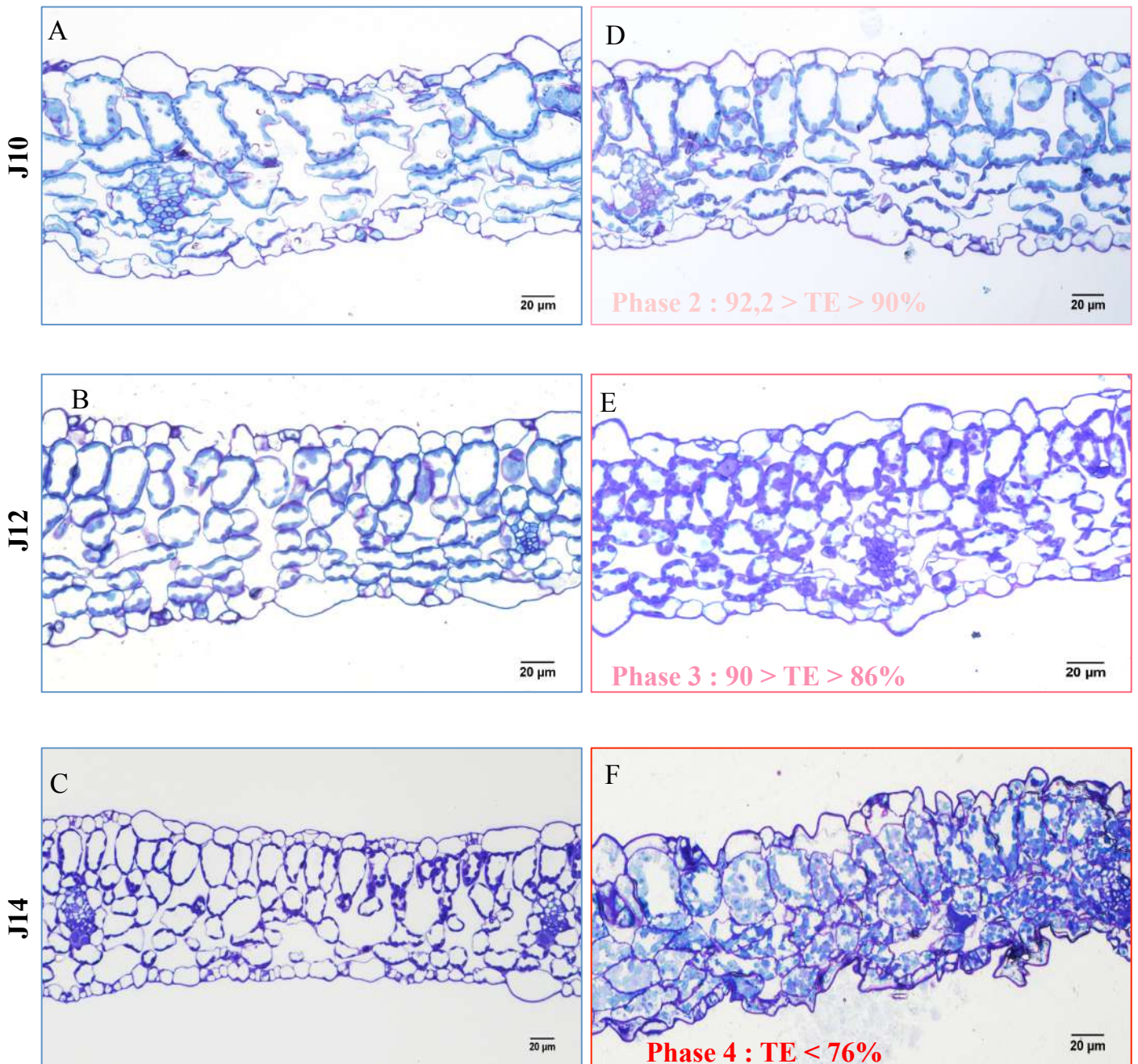


Figure 57: observations en microscopie photonique de coupes transversales de feuilles (rang 4) d'*Arabidopsis thaliana* soumises ou non à un arrêt d'arrosage. A, B et C : plantes arrosées, D, E et F : plantes non arrosées. Coloration au bleu de toluidine.

C et D). Il y a présence de grains d'amidon dans les chloroplastes. En revanche, à J14 (TE 70%), il y a de nettes différences entre les coupes de feuille de plantes arrosées et non arrosées.

A J14, les chloroplastes ne sont plus répartis de la même façon dans les cellules. Ils ne sont plus plaqués contre la membrane plasmique et la paroi, mais ils sont observables partout dans la cellule, ce qui montre que la vacuole n'occupe plus la majeure partie du volume cellulaire. Ceci atteste du fait que les cellules sont plasmolysées.

Les espaces intercellulaires sont réduits en raison de la réduction de la pression et tension dans chaque cellule du fait de la perte d'eau. Une autre conséquence de la diminution de pression engendrée par la perte en eau est la modification de la morphologie des cellules de l'épiderme ainsi que du mésophylle, avec des contours moins réguliers. L'ensemble de ces observations ; réduction des espaces intercellulaires, plasmolyse et aspect cellulaire modifié, se traduit au niveau du phénotype des rosettes par le flétrissement des feuilles.

Nous avons montré précédemment qu'il n'était plus possible de réhydrater par ré-arrosage des plantes non arrosées depuis 15 jours, dont la TE est à environ 60 %. Les observations en microscopie, montrent qu'à J12 les cellules sont turgescentes (TE = 86%) et de ce fait vivantes d'où la reprise possible de la croissance même après 12 jours de privation d'eau. A J14, la plasmolyse généralisée et sans doute irréversible des cellules, en accord avec les résultats précédents (MT et TRE très faibles, chute de la MS), explique l'incapacité des cellules des feuilles des plantes non arrosées, même en présence d'eau, d'absorber de l'eau. Ainsi, pour une TE inférieure à 76 %, une majorité des cellules semblent mortes ou en passe de l'être.

3.2.6 Estimation de la capacité des cellules à répondre à des variations de la pression osmotique du milieu extérieur

Afin d'étudier plus précisément, l'état osmotique des cellules, nous avons estimé la capacité des cellules, à J10, J12 et J14, à répondre à des variations de la pression osmotique, en plongeant des fragments de feuilles dans des solutions de saccharose de concentrations croissantes.

Avant toute analyse, il est à noter que la pression osmotique des solutions de saccharose, dans lesquelles baignent les fragments de feuilles, n'est pas totalement transposable à la pression osmotique des cellules. Cette expérimentation permet seulement d'estimer si les cellules sont capables ou non de répondre à des variations des conditions externes, reflétant

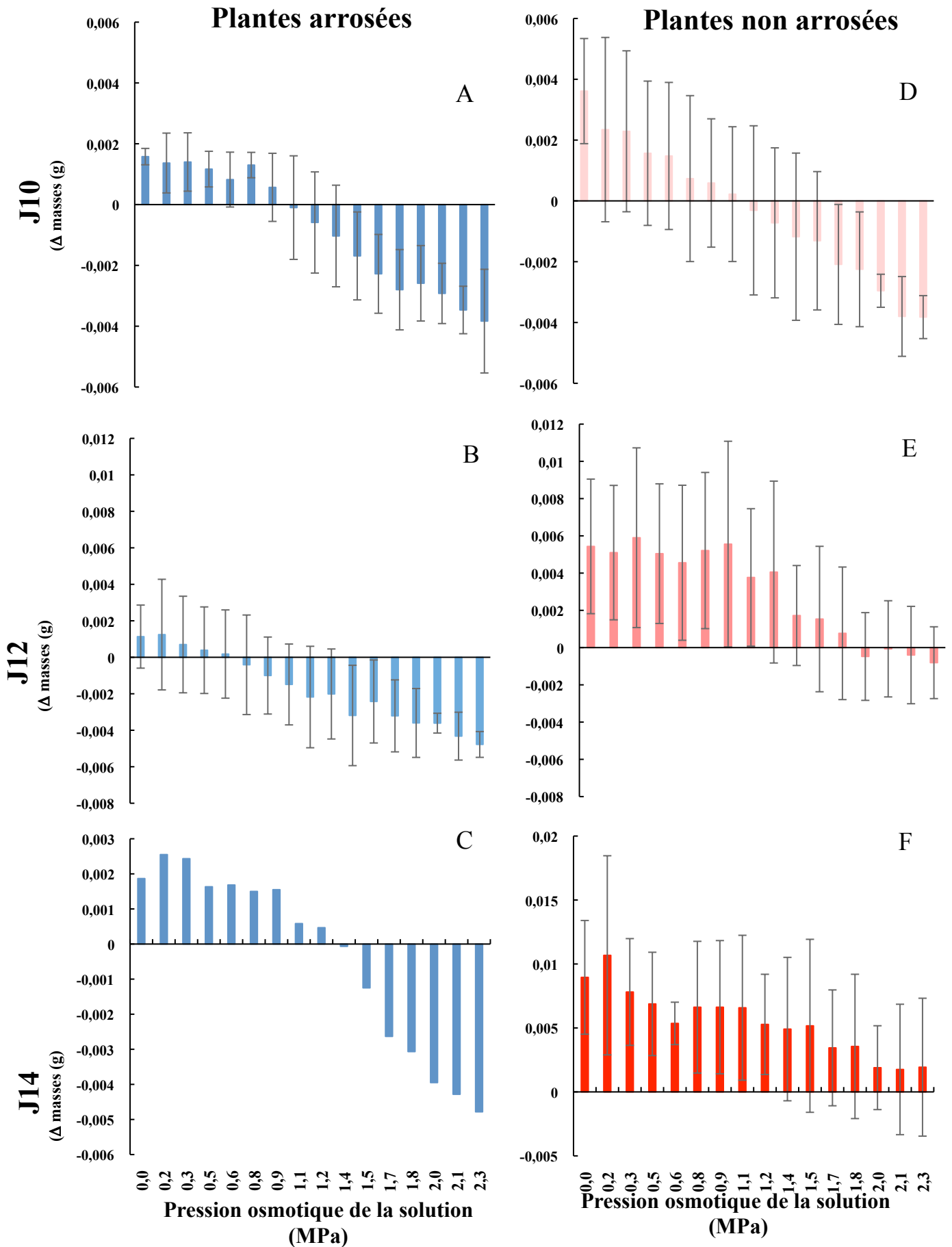


Figure 58 : différence de la masse fraîche de fragments de feuilles d'*Arabidopsis thaliana* après incubation 24 h dans des solutions de saccharose de pression osmotiques croissantes. A, B, D, E et F : les valeurs représentent la moyenne de 3 répétitions biologiques (n = 9 plantes, ± écarts types). C : les valeurs représentent la moyenne de 2 répétitions biologiques (n = 6 plantes).

ainsi leur état physiologique. Les variations de masse au-dessus de l'axe des abscisses traduisent une absorption d'eau, en dessous de l'axe des abscisses, elles traduisent une perte d'eau. Lorsque la courbe coupe l'axe des abscisses, il y a équilibre c'est-à-dire qu'il n'y a ni entrée dans les cellules, ni sortie d'eau, des cellules. Ces échanges d'eau entre le milieu intracellulaire et le milieu extérieur sont liés à des phénomènes d'osmose. D'après les lois de l'osmose pour la même concentration des solutés la solution est isotonique et il n'y a pas de pertes d'eau.

A J10, pour les plantes arrosées, le point coupant l'axe des abscisses se situe pour des valeurs de pression osmotique de la solution de saccharose comprises entre 0,9 et 1,1 MPa (figure 58 A), à J12 entre 0,6 et 0,8 MPa, (figure 58 B) et à J14 entre 1,2 et 1,4 MPa, (figure 58 C). Au regard de ces valeurs, le point coupant l'axe des abscisses, et donc indiquant l'équilibre osmotique entre les cellules et la solution de saccharose, est situé entre 0,6 et 1,4 MPa chez les plantes arrosées.

Chez les plantes non arrosées, à J10 (TE 90% - début phase 3), l'équilibre osmotique est atteint entre 1,1 et 1,2 MPa (figure 58 D), ce qui est équivalent aux valeurs déterminées pour les plantes arrosées. A J12 (TE 86% - début phase 4), l'équilibre osmotique chez les plantes non arrosées est atteint entre 1,7 et 1,8 MPa (figure 58 E), soit une fourchette supérieure à celle déterminée pour les plantes arrosées. A J14 (TE <76% - fin de phase 4), l'axe des abscisses n'est jamais coupé, même pour une pression osmotique de 2,3 MPa (figure 58 F). Deux explications à cela peuvent être défendues. Premièrement, la pression osmotique la plus forte est de 2,3 MPa, ce qui correspond à une solution de concentration de 1 M de saccharose. Au-delà de 1 M de saccharose, la solution devient visqueuse, ce qui fausse le calcul des masses, en plus de dépasser largement des valeurs physiologiques acceptables chez *Arabidopsis*. Aussi, il a été préférable de ne pas aller au-delà de cette concentration. Deuxièmement, en s'appuyant sur les résultats de microscopie, la grande majorité des cellules foliaires des plantes non arrosées depuis 14 jours sont très plasmolysées et pour beaucoup mortes. Plus aucun mécanisme actif ne peut avoir lieu. Les cellules ne peuvent donc plus ni absorber ni rejeter de l'eau. L'augmentation de la masse mesurée résulterait de phénomène adsorption.

En conclusion, l'équilibre osmotique estimé est atteint dans un même intervalle de valeurs pour toutes les plantes arrosées (TE > 92,2 %) et pour les plantes non arrosées à J10 (TE 90%). En revanche, chez les plantes à J12 (TE 86 %), l'équilibre osmotique estimé est atteint dans un intervalle de valeurs plus importantes, ce qui pourrait signifier que les cellules sont plus concentrées en solutés potentiellement, que les vacuoles sont moins remplies d'eau. .

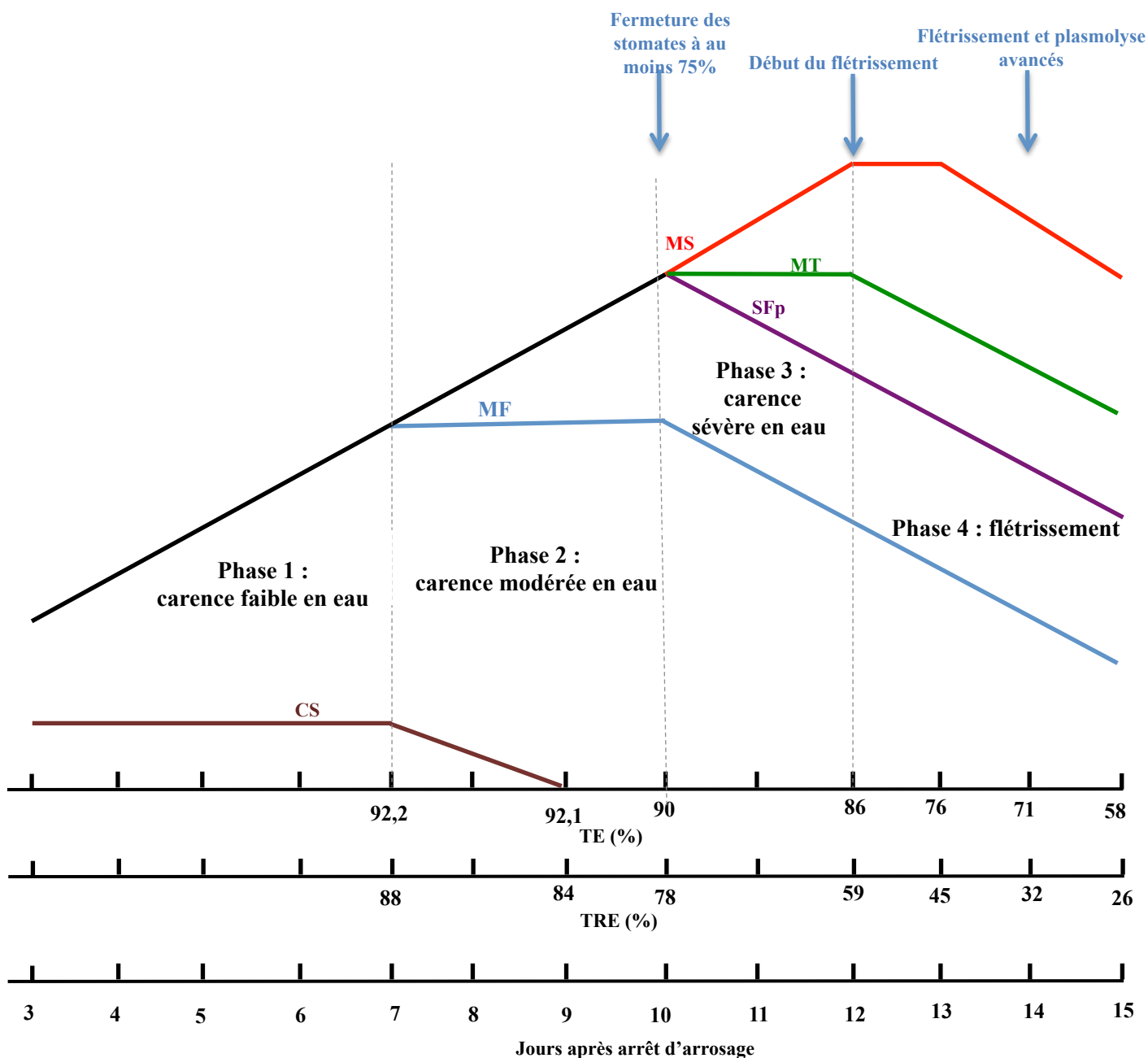


Figure 59 : bilan de l'état physiologique des rosettes d'*Arabidopsis thaliana* privées d'eau entre 35 et 50 jours après semis. Le schéma est à l'échelle des jours : 1 graduation équivaut à 1 jour. La ligne noire représente la surface foliaire projetée (SFp), la masse fraîche (MF), la masse turgide (MT) et la masse sèche (MS) qui augmentent jusqu'à un certain seuil de carence en eau. En violet la SFp, en bleu la MF, en vert la MT, en rouge la MS, en marron la conductance stomatique (CS), en orange pointillés glucose, fructose et saccharose respectivement des pointillés les plus courts aux plus longs. Chaque phase de carence en eau est délimitée par un ligne verticale pointillée. La première flèche bleue (la plus à gauche) indique le moment où une très importante diminution de la CS a été enregistrée pour les plantes non arrosées, se traduisant par la fermeture des stomates. La seconde flèche bleue indique le début du flétrissement pouvant être observé sur les photographies des rosettes. La troisième flèche bleue indique l'observation d'un fort flétrissement visible sur les photographies des rosettes et concomitant à des observations microscopiques suggérant une plasmolyse avancée des cellules, pouvant refléter la mort de beaucoup d'entre elles.

Deux hypothèses peuvent être émises : i) plus de molécules d'où une augmentation de la concentration en soluté, ii) augmentation de la concentration résultant d'un début de perte d'eau pour une même quantité de soluté. La combinaison des deux hypothèses est probable. Le début de plasmolyse à 12J est envisageable (TE et TRE qui diminues) mais elle n'est pas encore assez poussée pour être visible en microscopie. A J14, la plupart des cellules sont mortes ce qui rend impossible l'estimation de la pression osmotique.

3.2.7 Bilan sur les mesures physiologiques et définition de catégories caractérisant les différents stades de réponses physiologiques à la carence en eau.

L'ensemble des mesures physiologiques acquises nous permet de compléter la figure-bilan sur le développement des plantes en conditions de déficit hydrique (figure 59). Dans la figure 43, l'évolution des paramètres physiologiques ont été représentés en fonctions des jours après semis et des jours après arrêt d'arrosage. Cependant, même si tout a été fait pour placer les plantes dans les mêmes conditions à chaque répétition, des décalages peuvent avoir lieu entre les plantes. Ainsi, une plante sensiblement plus petite peut présenter un retard vis-à-vis de sa réponse à la carence en eau car la quantité d'eau apportée à chacune des plantes est équivalent et la consommation de l'eau dépendante de la taille de la plante. Ainsi, il nous a semblé plus judicieux d'exprimer les paramètres physiologiques en fonction des valeurs de la TE qui est le paramètre le plus stable dans les plantes témoin bien qu'il soit un moindre indicateur de l'état hydrique de la plante que la TRE.

Les plantes non arrosées sont considérées physiologiquement semblables aux plantes arrosées jusqu'à une valeur de TE de 92,2 %. Cela correspond à la phase 1 de la figure 59. Elle est caractérisée par une TE moyenne de 93,3 %, des valeurs de MF, MS, MT et de SFp qui augmentent, signe de croissance des rosettes. La CS, quant à elle, est stable, tout comme la TE et la TRE. Cette phase est la plus longue et dure en moyenne 9 jours (selon les répétitions, elle peut durer 9 ou 7 jours). Les plantes non arrosées se comportent donc, au niveau de tous les paramètres mesurés, comme les plantes arrosées jusqu'à une TE de 92,2 %. Cette phase est une phase de croissance au cours de laquelle la carence en eau est très précoce et n'a pas d'effet physiologique sur les plantes arrosées. Ensuite, la phase 2 est caractérisée par une TE entre 92,2 et 90%. Durant cette phase, la MF stagne et la CS diminue progressivement jusqu'à atteindre une valeur nulle, lorsque les rosettes des plantes non arrosées atteignent le seuil de valeur de TE de 90%. Un changement de statut hydrique s'amorce durant cette phase 2, qui se clôture par la fermeture massive et généralisée des

stomates. Les autres paramètres continuent d'augmenter progressivement, signe que la croissance tend à continuer malgré tout. La phase 2 peut être qualifiée de carence modérée en eau. Suite à la fermeture des stomates, la MF ainsi que la SFp chutent linéairement, dès la valeur seuil de 90% de TE. La MS continue d'augmenter et la MT stagne jusqu'à une valeur de TE de 86 %. C'est la phase 3. Elle est caractérisée par un changement clair de statut hydrique dû à de fortes pertes d'eau et probablement aussi de turgescence. A l'issue de cette phase 3, il est encore possible de réhydrater les plantes par ré-arrosage, et la plupart des cellules sont encore vivantes. La phase 3 est qualifiée de phase de carence hydrique sévère. Une 4^e phase a pu être mise en évidence, lorsque les plantes présentent une TE inférieure à 86 % environ et qui correspond au début du flétrissement des plantes. Durant cette phase 4, tous les paramètres mesurés diminuent hormis la MS qui stagne jusqu'à une TE de 76%, et ne diminue qu'après. De plus, il n'est plus possible de réhydrater les plantes en les ré-arrosant à l'issue de cette phase. Les observations microscopiques nous indiquent bien que la plupart des cellules sont très plasmolysées et certainement mortes. Cette phase 4 peut être qualifiée de phase de flétrissement irréversible.

Enfin, les plantes réhydratées après 12 jours de carence ont une valeur moyenne de TE de 91,9 % environ (figure 45), ce qui les classe en phase 2, c'est-à-dire en carence modérée. Néanmoins, la CS des plantes réhydratées est semblable à la CS des plantes arrosées. La CS est le premier paramètre qui diminue suite à une carence en eau, elle est aussi le premier paramètre qui se rétablit après réhydratation. De plus, si pour les autres paramètres la valeur mesurée chez les plantes réhydratées n'est pas identique à celle des plantes arrosées, cela est dû à un retard de croissance chez les plantes non arrosées. La CS n'est pas un paramètre lié à la croissance, elle peut donc se rétablir parfaitement après ré-arrosage.

3.3 Mesure de la teneur en sucres solubles par dosage enzymatique

Chez certaines plantes, une des réponses possibles à la carence en eau est une modification des réserves en sucres, favorisant les ajustements osmotiques. La teneur en saccharose, en glucose et en fructose a été mesurée par dosage enzymatique dans les rosettes des plantes arrosées et non arrosées, prélevées durant les 15 jours de cinétique.

Dans un premier temps, l'analyse de la teneur en ces 3 sucres solubles dans les rosettes des plantes arrosées a été effectuée en fonction de l'âge des plantes. L'idée est de savoir si,

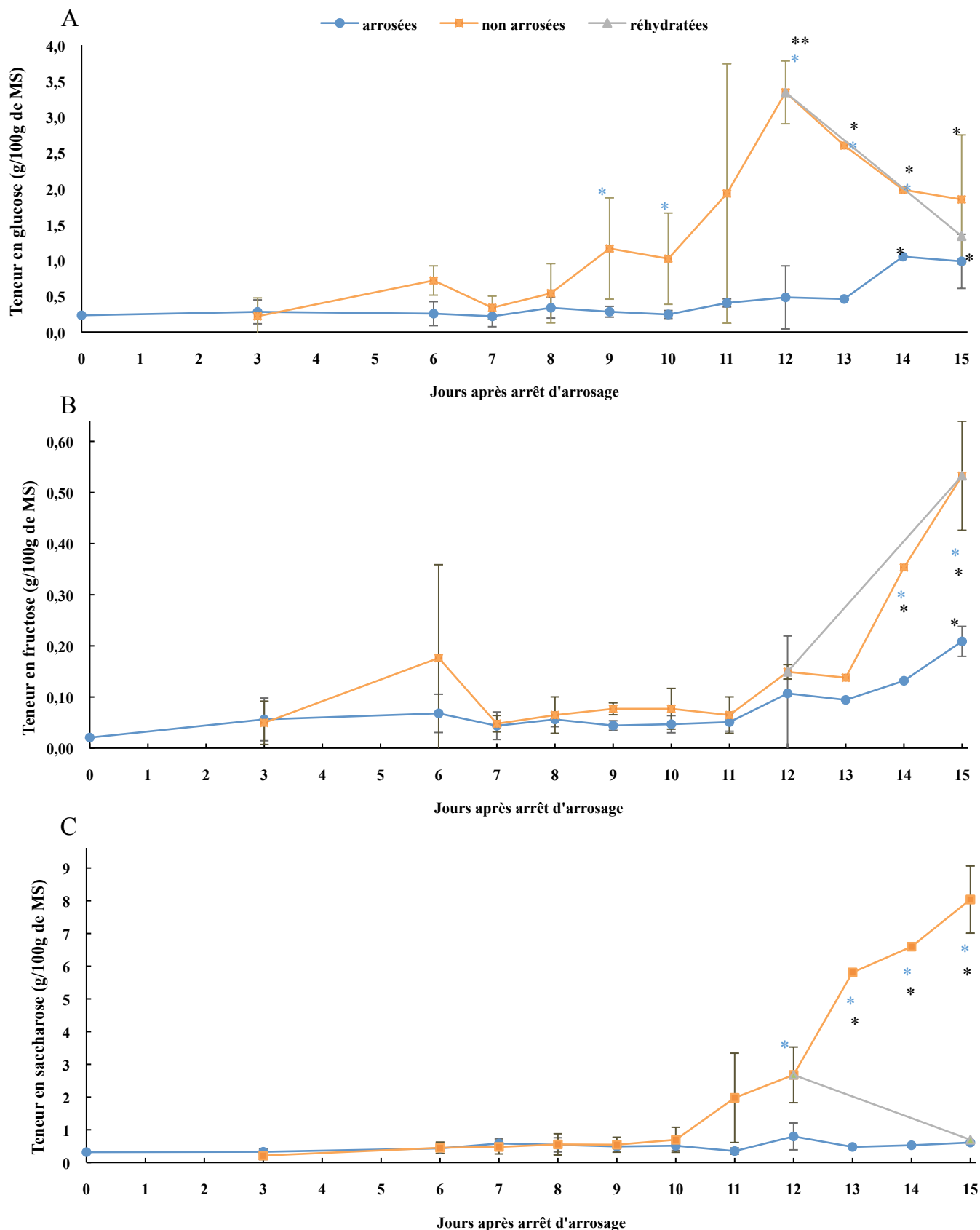


Figure 60 : teneur en sucres solubles dans les rosettes d'*Arabidopsis thaliana*. Pour J13 et J14, 2 répétitions biologiques ont été effectuées sur à chaque fois un pool de 5 demi-rosettes. Pour les autres jours de prélèvement, 3 répétitions biologiques ont été effectuées sur à chaque fois un pool de 5 demi-rosettes (moyennes \pm écart type). Les étoiles bleues correspondent, à des différences significatives par rapport à la condition « arrosée » à chaque temps de prélèvement, déterminées par des test de Mann-Whitney (p value < 0,05). Les étoiles noires correspondent à des différences significatives déterminées par le test de Kruskal-Wallis, suivi d'un test de Dunn de comparaisons multiples (* : p -value < 0,05 ; ** : p -value < 0,001).

entre 35 et 50 jours après semis, l'âge de la plante influence la teneur en sucres solubles. Entre 35 et 48 jours après semis, la teneur en glucose dans les feuilles des plantes arrosées fluctue entre 0,21 et 0,48 g/ 100g de MS. Ces valeurs ne sont pas significativement différentes, la teneur en glucose est donc stable (figure 60 A). En revanche, à 49 et 50 jours après semis, la teneur en glucose augmente jusqu'à une valeur maximale de $1,05 \pm 0,29$ g / 100 g de MS. A ce stade, les valeurs sont significativement plus importantes (figure 60 A). Il y a, chez les plantes arrosées, une augmentation de la teneur en glucose dans les feuilles à partir de 49 jours après semis. La teneur en fructose dans les feuilles des plantes arrosées est significativement stable de 35 à 49 jours après semis, avec une valeur moyenne de 0,06 g/ 100 g de MS (valeurs comprises entre de 0,02 à 0,1 g/ 100 g de MS, figure 60 B). Cinquante jours après semis, la teneur en fructose dans les feuilles des plantes arrosées est de $0,2 \pm 0,02$ g /100 g de MS, ce qui est significativement plus important que pour les autres jours (figure 60 B). Pour la teneur en saccharose dans les feuilles des plantes arrosées, il n'y a aucune différence significative entre les différents jours après semis (figure 60 C). La teneur en saccharose moyenne est de 0,50 g/ 100 g de MS et varie de 0,32 et 0,79 g / 100 g de MS.

Dans les plantes non arrosées, la teneur en glucose est stable jusqu'à J11 (figure 60 A). Elle varie de 0,2 et 1,97 g/ 100 g de MS (valeur moyenne 0,89 g / 100 g de MS). La teneur en glucose à J11 est de $1,97 \pm 1,80$ g/ 100 g de MS mais n'a pas été retenue par le test de Kruskal-Wallis comme étant significativement plus importante à cause d'un écart-type assez fort entre les 3 valeurs des 3 répétitions biologiques. Néanmoins, une augmentation de la teneur en glucose dans les feuilles des plantes non arrosées pourrait être initiée à partir de J11. En effet, à J12, la teneur en glucose augmente significativement chez les plantes non arrosées. La teneur en glucose est alors de $3,34 \pm 0,43$ g/ 100 g de MS. Au-delà de J12, bien que la teneur en glucose dans les feuilles diminue légèrement elle continue d'être significativement supérieure à la teneur en glucose entre J0 et J11 (figure 60 A). La teneur en fructose dans les feuilles des plantes non arrosées est stable jusqu'à J13 (figure 60 B). Elle est en moyenne de 0,09 g / 100 g de MS, et varie aléatoirement entre 0,05 et 0,18 g / 100 g de MS. A J14, la teneur en fructose dans les feuilles devient significativement plus importante avec des valeurs moyennes de $0,35 \pm 0,26$ et $0,53 \pm 0,10$ g /100 g de MS respectivement à 49 et 50 jours après semis (figure 60 B). La teneur en saccharose dans les feuilles des plantes non arrosées est significativement stable jusqu'à J12 (figure 60 C). Comme pour le glucose, une augmentation de la teneur en saccharose dans les feuilles des plantes privées d'eau serait initiée dès J11. Ensuite, à partir de 12 jours après arrêt d'arrosage, la teneur en saccharose dans les feuilles

augmente significativement et linéairement jusqu'à la fin de la cinétique ($1,97 \pm 1,36$; $2,68 \pm 0,85$; $5,8 \pm 2,1$; $6,6 \pm 0,45$ et $8,04 \pm 1,0$ g / 100 g de MS respectivement à J11, J12, J13, J14 et J15).

La teneur en glucose des plantes non arrosées est statistiquement plus forte que la teneur en glucose des plantes non arrosées de J9 à J14 (figure 60 A). A J15, il n'y a pas de différence significative entre la teneur en glucose dans les rosettes des plantes arrosées, non arrosées et réhydratées. L'effet de l'augmentation de glucose dans les feuilles des plantes arrosées due à l'âge est négligeable par rapport à l'augmentation de la teneur en glucose dans les feuilles des plantes non arrosées, due à la carence en eau. En effet, la valeur maximale de la teneur en glucose dans les feuilles des plantes non arrosées est de $3,34 \pm 0,43$ g / 100 g de MS à J12 alors qu'elle est de $1,05 \pm 0,29$ g / 100 g de MS chez les plantes arrosées, à J14 (valeur 3 fois plus faible et maximale 2 jours plus tard).

La teneur en fructose des plantes non arrosées est significativement supérieure à la teneur en fructose dans les plantes arrosées à J14 et J15 (figure 60 B). De la même manière que pour la teneur en glucose, l'augmentation de la teneur en fructose chez les plantes non arrosées depuis au moins 14 jours, peut être imputée directement à l'effet de la carence en eau en négligeant l'augmentation de la teneur en fructose dans les feuilles des plantes en condition contrôles 50 jours après semis. En effet, la valeur maximale de teneur en fructose chez les plantes non arrosées est de 0,53 g/100 g de MS, 50 jours après semis et de 0,2 g/100 g de MS au même jour chez les plantes arrosées, soit 2,65 fois moins.

La teneur en saccharose dans les rosettes des plantes non arrosées est significativement supérieure à la teneur en saccharose chez les plantes arrosées à partir de J12 (figure 60 C). La teneur maximale en saccharose dans les feuilles des plantes privées d'eau est de $8,04 \pm 1,0$ g / 100 g de MS, après 15 jours de privation d'eau et est 11,5 fois plus importante que la valeur moyenne de la teneur en saccharose dans les feuilles des plantes non arrosées jusqu'à 11 jours.

Afin de synthétiser et simplifier l'interprétation des résultats issus du dosage des sucres solubles dans les feuilles des plantes arrosées et non arrosées, les valeurs des teneurs en sucres ont été exprimées en fonction de la TE et des 4 phases de la carence en eau, caractérisées précédemment. Ceci a également permis d'augmenter les effectifs du nombre de valeurs issus du dosage des sucres. En effet, à chaque jour de prélèvement, une seule valeur par répétition biologique est disponible, puisque le dosage de sucres ont été effectués sur des pools de 5 demi-rosettes, 3 valeurs au maximum sont donc disponibles chaque jour. Ceci rend

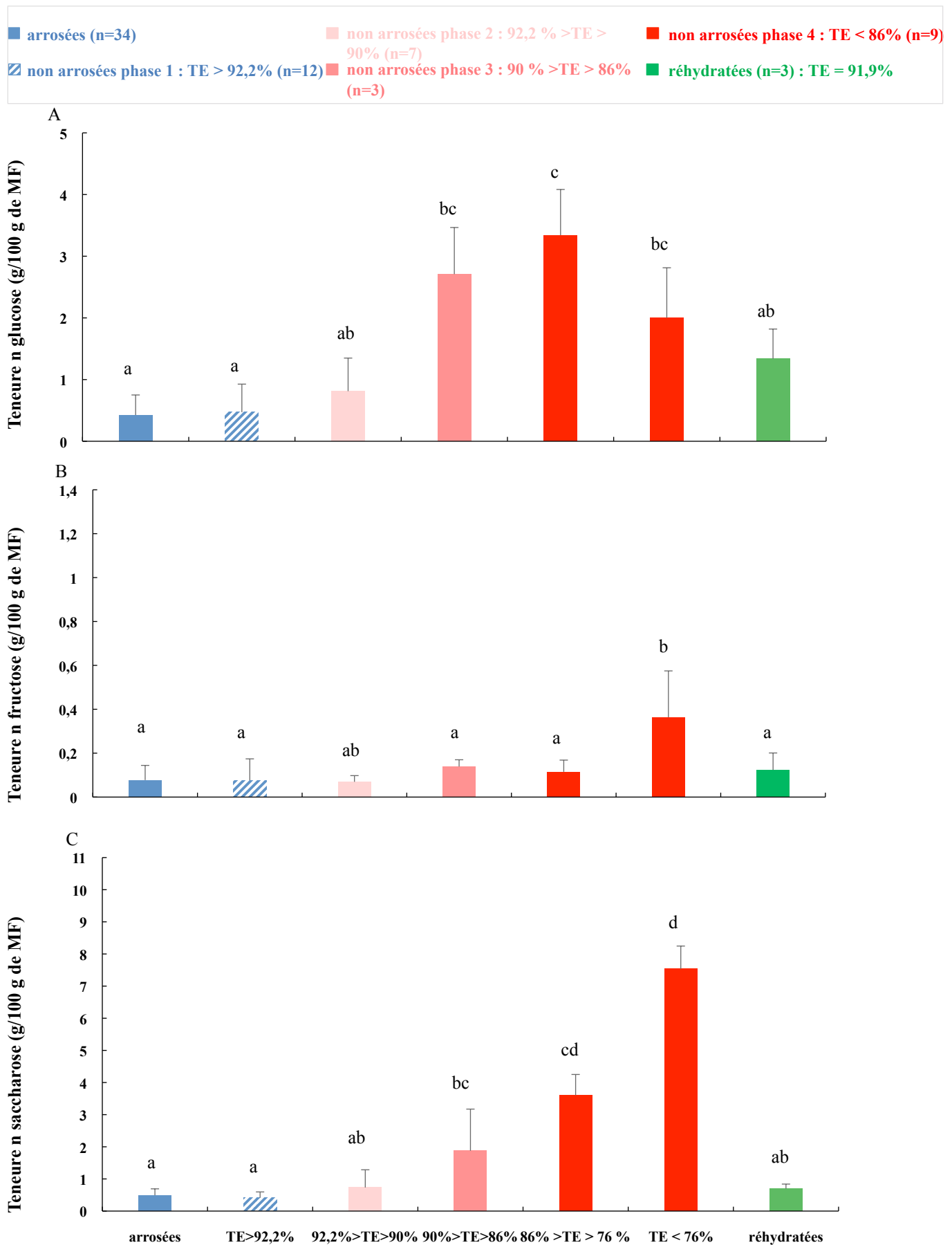


Figure 61 : teneurs en glucose, fructose et saccharose dans les feuilles des plantes arrosées non arrosées, et réhydratées. Les valeurs représentent la moyennes des teneurs en sucres dans les feuilles dans chaque phase de carence en eau déterminées précédemment (+/- écart type). Un test de Kruskal-Wallis, suivi d'un test de comparaisons multiples de Dunn (p .value < 0,05) avec la correction de Bonferroni a permis de déterminer des groupes significativement différents représentés par des lettres différentes.

l'interprétation des analyses statistiques plus difficile. En utilisant la TE, j'ai pu obtenir, pour chaque phase 3 à 34 valeurs de teneurs en sucres. Il a ainsi été plus aisé de conduire des analyses statistiques pour comparer les valeurs dans chacune des catégories.

Le résultat de cette analyse sur les 3 sucres solubles dosés est présenté dans la figure 61. Comme attendu, aucun des 3 sucres dosés n'est plus abondant dans les feuilles des plantes non arrosées en phase 1 que dans les feuilles des plantes arrosées, puisqu'elles sont dans le même état physiologique ($TE > 92,2\%$). La teneur en glucose dans les feuilles des plantes non arrosées augmente dès la phase 2 mais est clairement significativement à partir de la phase 3 (figure 61 A). Les plantes non arrosées accumulent donc du glucose à partir de la phase 2 (carence en eau modérée, $92,2\% > TE > 90\%$) et la teneur en glucose est maximale en phase 3 ($90\% > TE > 86\%$; carence en eau sévère), et elle se maintient en phase 4 ($TE < 86\%$; sénescence). La phase 4 peut être découpée en 2 phases : l'une pour les plantes ayant une TE comprise entre 86 et 76 %, l'autre pour les plantes ayant une TE inférieure à 76 %, on observe que la teneur en glucose tend à diminuer à la fin de la phase 4. Cependant, la teneur en glucose reste bien plus importante que chez les plantes arrosées. Les plantes réhydratées ont une teneur en glucose semblable aux plantes non arrosées en phase 2 ($92,2\% > TE > 90\%$) (figure 61 A).

La teneur en fructose dans les feuilles des plantes non arrosées est significativement plus importante à partir de la fin de la phase 4 (sénescence avancée et irréversible, $TE > 76\%$) : $0,21 \pm 0,20$ g de fructose / 100 g de MS en début de phase 4 et $0,51 \pm 0,08$ g de fructose / 100g de MS en fin de phase 4, soit une augmentation de 2,6 fois (figure 61 B). Les plantes réhydratées ont une teneur en fructose semblable aux plantes non arrosées en phase 2 ($92,2\% > TE > 90\%$). D'après le test de Kruskal-Wallis, dans les phases 2 et 3, les teneurs en fructose ne peuvent pas être assimilées comme statistiquement différentes aux teneurs en fructose des plantes arrosées ni aux teneurs en fructose chez les plantes en phase 4.

Enfin, le saccharose augmente progressivement de la phase 1 à la phase 4 (figure 61 C). Plus la perte d'eau est importante et plus la plante se rapproche d'un état de sénescence, plus le saccharose s'accumule. Pour chacun des sucres dosés ici, les plantes réhydratées ont une teneur en sucres semblable à celle des plantes non arrosées en phase 2 (figure 61 A, B et C).

Chez les plantes arrosées, il n'y a pas de corrélation entre la teneur en glucose dans les feuilles et la TE, la TRE et la MS (figures 62 A, B et C). A l'inverse, il y a une corrélation linéaire entre la teneur en glucose et la TE et ainsi que la TRE, chez les plantes non arrosées, en phase 3 ($90\% > TE > 86\%$). Les R^2 sont respectivement de 0,969 pour la TE (figure 62 D)

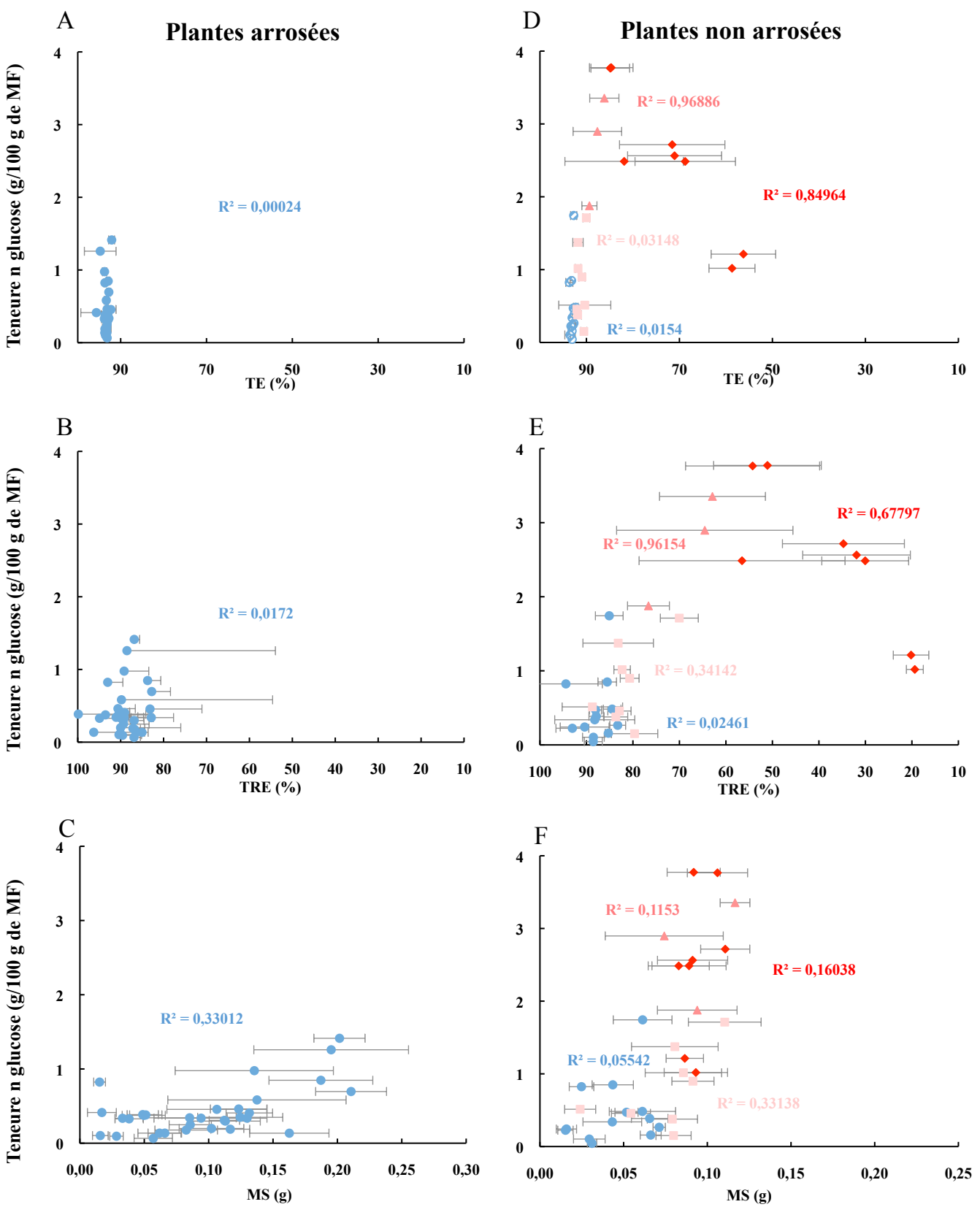
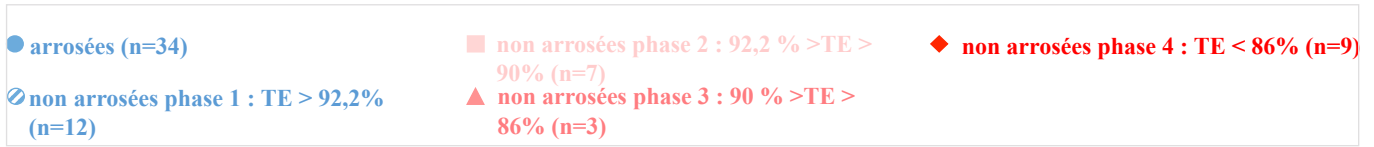


Figure 62 : teneur en glucose dans les feuilles en fonction de la teneur en eau (TE), de la teneur relative en eau (TRE) et de la masse sèche (MS). A : plantes arrosées, TE ; B : plantes arrosées , TRE; C : plantes arrosées, MS; C: plantes non arrosées TE; D : plantes non arrosées, TRE ; E : plantes non arrosées, MS. Chaque point correspond à la valeur moyenne de teneur en sucres d'un pool de 5 plantes (n = 5 plantes pour TE, TRE et MS ; n = un pool de 5 plantes pour les sucres).

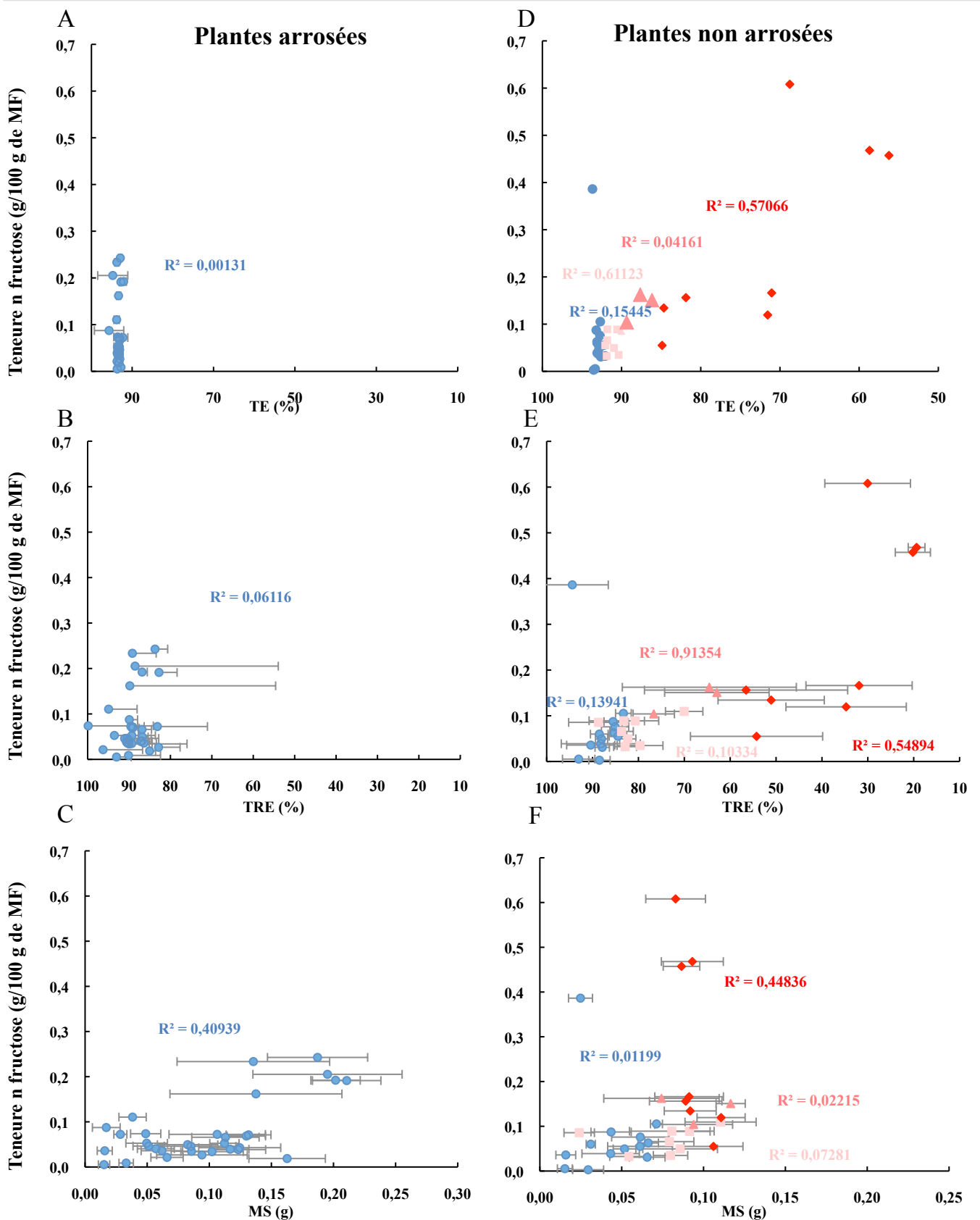
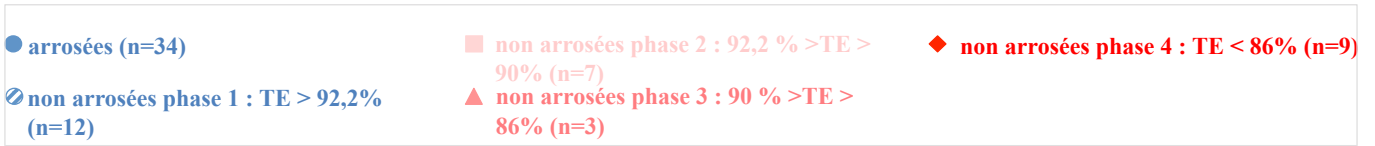


Figure 63 : teneur en fructose dans les feuilles en fonction de la teneur en eau (TE), de la teneur relative en eau (TRE) et de la masse sèche (MS). A: plantes arrosées, TE; B : plantes arrosées, TRE; C : plantes arrosées, MS; C: plantes non arrosées TE; D : plantes non arrosées, TRE; E : plantes non arrosées, MS. Chaque point correspond à la valeur moyenne de teneur en sucres d'un pool de 5 plantes (n = 5 plantes pour TE, TRE et MS ; n = un pool de 5 plantes pour les sucres).

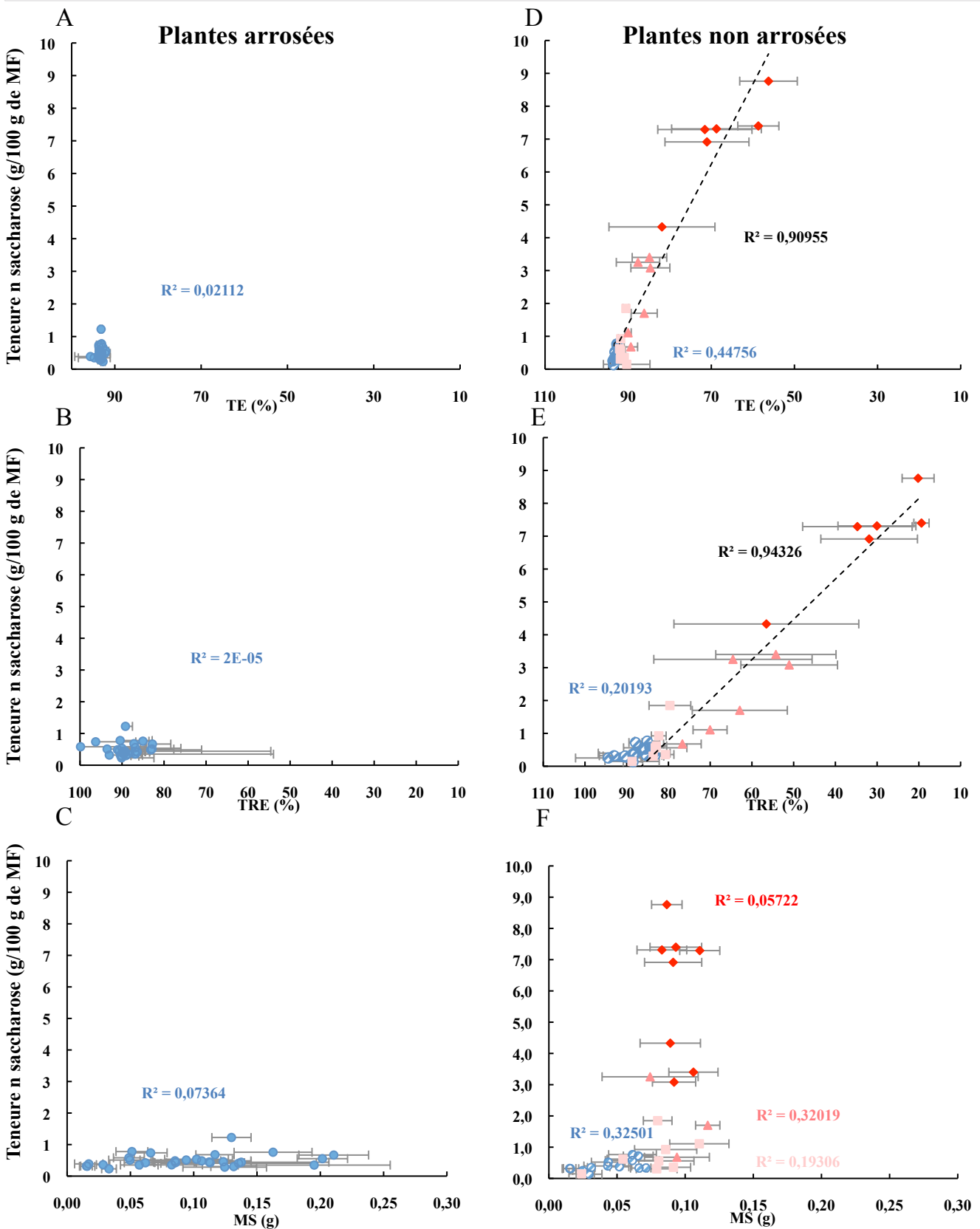
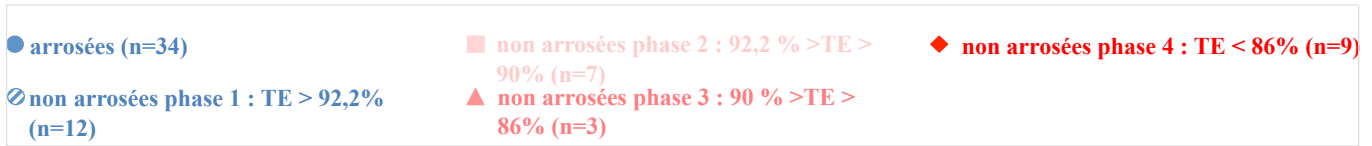


Figure 64: teneur en saccharose dans les feuilles en fonction de la teneur en eau (TE), de la teneur relative en eau (TRE) et de la masse sèche (M). A: plantes arrosées, TE; B : plantes arrosées, TRE; C : plantes arrosées, MS; C : plantes non arrosées TE; D : plantes non arrosées, TRE; E : plantes non arrosées, MS. Chaque point correspond à la valeur moyenne de teneur en sucres d'un pool de 5 plantes (n = 5 plantes pour TE, TRE et MS ; n = un pool de 5 plantes pour les sucres).

et 0,962 pour le TRE (figure 62 E). Cela suggère qu'au cours de la phase de carence sévère (entre 90 % et 86 % de TE), la teneur en glucose augmente de façon concomitante à la diminution de la TE et de la TRE. Ces observations renforcent l'idée d'une augmentation de la teneur en glucose due à la carence en eau. Il n'y a en revanche pas de corrélation linéaire entre la teneur en glucose des plantes non arrosées et leur MS (figure 62 F). Pour rappel, chez les plantes non arrosées, la MS augmente jusqu'à une TE de 86%, en deçà elle stagne puis diminue. La teneur en glucose, elle, va augmenter dès une TE comprise entre 92,2 et 90 %, pour atteindre son maximum entre 90% et 86 % de TE. L'augmentation de glucose n'étant pas corrélée à l'augmentation de MS, on ne peut pas dire que le glucose joue un rôle prédominant dans l'augmentation de MS chez les plantes arrosées jusqu'à 86% de TE. D'autres composés doivent également être accumulés.

Il n'y a pas de corrélation linéaire entre la teneur en fructose et la TE, la TRE et la MS, pour les plantes arrosées (figures 63 A, B, C), ni pour les plantes non arrosées, quelle que soit leur TE (figures 63 D, E, F). Toutefois, une corrélation entre la teneur en fructose et la TRE chez les plantes non arrosées en phase 3 (90% > TE >86 %), soutenue par un R^2 de 0,914, pourrait être un biais provenant du faible nombre de valeur dans cette catégorie (3 valeurs). Ainsi, les trois valeurs peuvent très bien être alignées sans signification de corrélation linéaire pour autant (figure 63 E).

Il n'y a pas de corrélation linéaire entre la teneur en saccharose et la TE, la TRE et la MS pour les plantes arrosées (figure 64 A, B et C). Il n'y a pas non plus de corrélation linéaire entre la teneur en saccharose et la MS des plantes non arrosées (figure 64 F). Par contre, il y a une corrélation linéaire entre la teneur en saccharose et la TE et ($R^2 = 0,910$) et la TRE ($R^2 = 0,943$) pour les plantes non arrosées de la phase 2 à la phase 4, soit dès que les feuilles atteignent une TE inférieure à 92,2% (figure 64 D et E). Cela signifie que dès que les plantes arrosées ont une TE inférieure à 92,2%, et qu'elles se détachent physiologiquement des plantes arrosées, la teneur en saccharose augmente, de façon concomitante aux diminutions de TE et de TRE. La teneur en saccharose dans les feuilles est liée à la teneur en saccharose. Le saccharose pourrait être accumulé dès la carence faible en eau, de façon à jouer un rôle d'osmoprotectant dans les cellules. Les plantes non arrosées accumulent du saccharose de façon progressive jusqu'à la phase 4, et une parfaite corrélation a été mise en évidence entre la diminution de la TE et de la TRE et l'augmentation de la teneur en saccharose. La teneur en saccharose est ainsi maximale en phase 4 lors du flétrissement avancé.

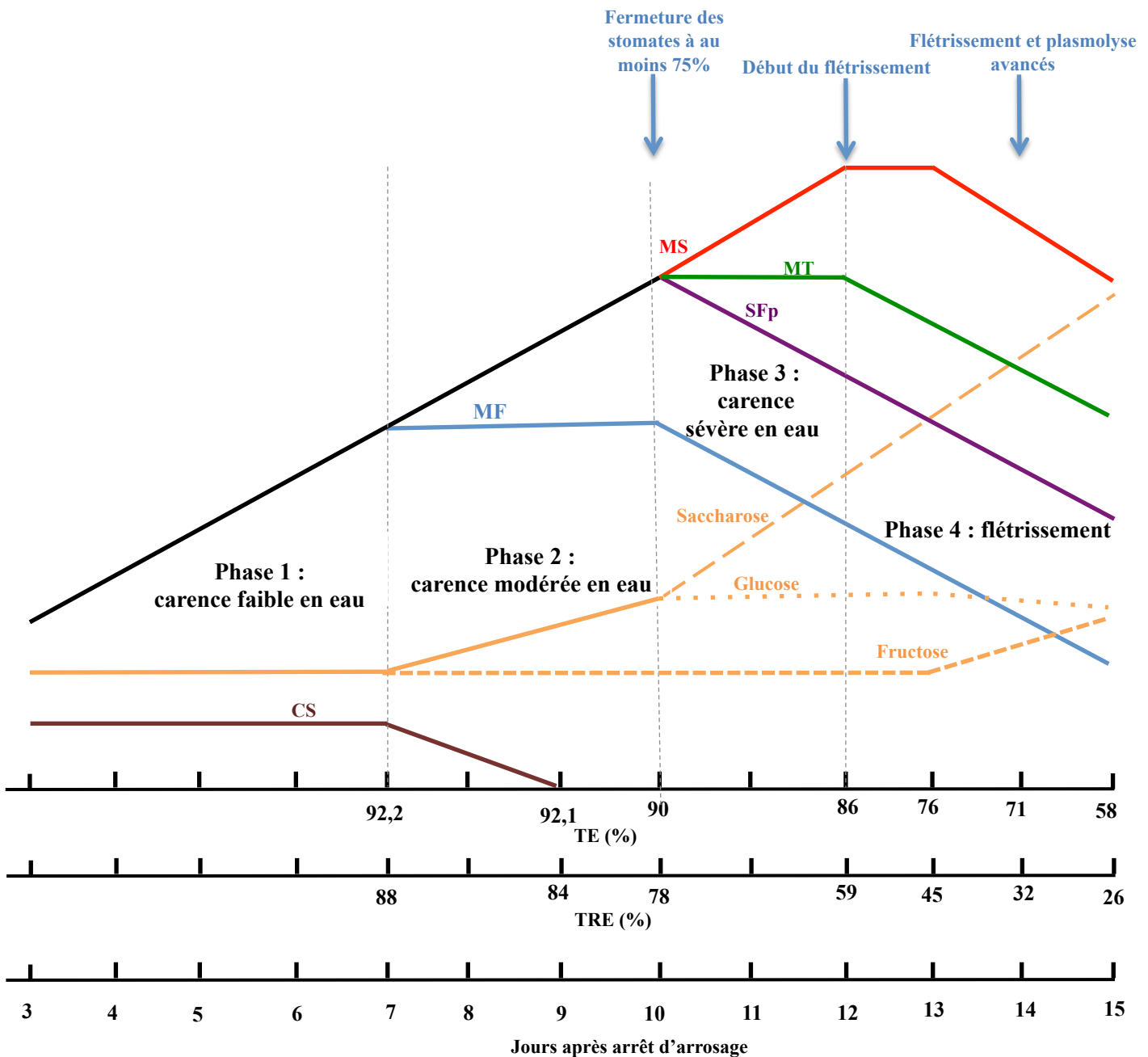


Figure 65 : bilan des mesures de croissances, physiologiques et de teneurs en sucres dans les rosettes d'*Arabidopsis thaliana* privées d'eau pendant 15 jours. Le schéma est à l'échelle des jours : 1 graduation équivaut à 1 jour. La ligne noire représente la surface foliaire (SFp), la masse fraîche (MF), la masse turgide (MT) et la masse sèche (MS) qui augmentent jusqu'à un certain seuil de carence en eau. La ligne pleine orange représente la teneur en glucose, fructose et saccharose jusqu'à une TE de 92,2 %, puis la teneur en glucose et saccharose. En violet la SFp, en bleu la MF, en vert la MT, en rouge la MS, en marron la conductance stomatique (CS), en orange pointillés glucose, fructose et saccharose respectivement des pointillés les plus courts aux plus longs. Chaque phase de carence en eau est délimitée par un ligne verticale pointillée. La première flèche bleue (la plus à gauche) indique le moment où une très importante diminution de la CS a été enregistrée pour les plantes non arrosées, se traduisant par la fermeture des stomates. La seconde flèche bleue indique le début du flétrissement pouvant être observé sur les photographies des rosettes. La troisième flèche bleue indique l'observation d'un fort flétrissement visible sur les photographies des rosettes et concomitant à des observations microscopiques suggérant une plasmolyse avancée des cellules, pouvant refléter la mort de beaucoup d'entre elles.

3.4 Discussion

La caractérisation complète des différents états de réponses physiologiques des plantes lors d'une période de 15 jours sans apport d'eau est résumée dans la figure 65. Durant la phase 1, la phase la plus longue qui peut durer de 7 à 9 jours selon les cinétiques, les plantes non arrosées se comportent, au niveau de la croissance, des paramètres physiologiques et de l'accumulation de sucres solubles, de la même manière que les plantes arrosées. Les rosettes ont une TE stable et supérieure à 92,2 %, des MF, MS et MF croissantes, une SFp croissante, et une CS ainsi que des teneurs en glucose, fructose et saccharose stables.

Lors de la phase 2, la TE des rosettes est inférieure à 92,2 %. Les premiers signes de changement physiologiques sont observés et correspondent à une diminution de la CS (figure 56), une stagnation de la MF (figure 46 B) des rosettes et une accumulation de glucose (figure 61 A) et de saccharose (figure 61 C). Tous ces paramètres reflètent une perte d'eau significative dans les rosettes. La fermeture des stomates en réponse à une chute de potentiel hydrique du sol peut être considérée comme un moyen pour les plantes de lutter contre la perte d'eau (Blouin et al. 2007; Flexas et al. 2004; França et al. 2000; Liu et al. 2005a; Galmez et al. 2013; Liu et al. 2005b; Harb et al. 2010). L'accumulation du glucose et du saccharose pourrait être assimilée à un phénomène d'ajustement osmotique, afin de maintenir le potentiel hydrique des cellules (Hare et al. 1998; Morgan 1984). En effet, il a été montré que les hexoses, le saccharose et les polyols sont impliqués dans le processus d'ajustement osmotique (Munns 2002; Moore et al. 2008; Hummel et al. 2010; Mewis et al. 2012). Les hexoses et le saccharose notamment, sont accumulés dans les feuilles d'*A. thaliana* soumise à un déficit hydrique (Hummel et al. 2010; Taji et al. 2002; Sperdoulis and Moustakas 2012). Etant donné que la SFp, continue à se maintenir semblable à celle des plantes arrosées (figures 46 A), cette phase a été définie comme une carence en eau modérée. La MS continue d'augmenter chez les plantes arrosées (figure 46 C) mais plus faiblement que chez les plantes arrosées. La croissance des feuilles n'est pas encore significativement réduite, même si une diminution de la MF équivaut à une diminution de la TE et de la TRE dans les feuilles, aboutissant à une pression de turgescence plus faible dans les cellules et donc, à un premier facteur de diminution de la croissance cellulaire. À ce stade, les plantes soumises à un arrêt d'arrosage paraissent mettre en place, d'une part, des mécanismes d'ajustement osmotique typiques de la tolérance au stress hydrique (Lawlor 2012), et d'autre part, de limitation des

pertes en eau par le biais de la fermeture des stomates, en réponse au stress hydrique modéré, typique de la stratégie d'échappement au stress hydrique (Lawlor 2012).

Lorsque la TE atteint 90%, l'ouverture des stomates est fortement réduite (75%). Les plantes entrent dans la phase 3 caractérisée par des pertes d'eau très importante, d'où son assimilation à une carence sévère en eau. La teneur en saccharose et la teneur en glucose ne cessent d'augmenter. La MS continue aussi à augmenter de façon linéaire et la MT stagne, tandis que la MF et la SFp diminuent. Il y a donc eu de fortes pertes d'eau dans les cellules foliaires des plantes non arrosées. La croissance foliaire diminue, ce qui participe à la limitation des pertes en eau (Simonneau et al. 2017). La réduction de la croissance foliaire, observée dans cette phase de stress hydrique sévère, est liée à l'arrêt de l'expansion cellulaire en tant que conséquence directe de la perte de turgescence des cellules (Hsiao 1973).

Les pertes d'eau subies jusqu'en phase 3 (carence sévère en eau) peuvent être compensées en réhydratant les plantes, qui ne sont pas mortes. Trois jours après cette réhydratation par arrosage des plantes non arrosées depuis 12 jours, tous les paramètres mesurés ont des niveaux semblables à ceux qui caractérisent la phase 2, soit la carence modérée en eau. Les pertes d'eau sont donc essentiellement dues à une chute importante du potentiel hydrique du substrat. Cependant la plante est encore physiologiquement capable d'absorber de l'eau.

Enfin, la phase 4 survient lorsque la TE est inférieure à 86 %. A l'issue de cette période, les plantes n'ont pas pu être réhydratées. Le saccharose continue son accumulation (figure 61 C) et le fructose commence à s'accumuler en fin de la phase 4 (figure 61 B). A l'inverse, la teneur en glucose stagne puis diminue légèrement lorsque la TE devient inférieure à 76 % (figure 61 A), tous les autres paramètres diminuent, y compris les paramètres de croissance (MS incluse). Les rosettes étant à un stade de flétrissement avancé, les observations microscopiques ont montré des cellules fortement plasmolysées (figure 57) et les cellules de feuilles ne réagissent plus aux variations de pression osmotiques du milieu extérieur (figure 58). Toutes ces observations suggèrent qu'un nombre important de cellules sont mortes. La plante n'est plus du tout capable de pallier le déficit hydrique, qui devient trop important. Cette dernière phase de carence en eau est la phase de flétrissement irréversible. Des études ont montré le rôle de l'accumulation des sucres solubles en tant que signaux métaboliques dans le déclenchement de la sénescence des feuilles (Rolland et al. 2006). Cette dernière phase pourrait être éventuellement considérée comme une phase de sénescence avancée des rosettes.

Des études ont montré que l'expression de certains gènes est régulée en réponse au stress hydrique chez les plantes, notamment chez *A. thaliana* (Lawlor 2012; Shinozaki and

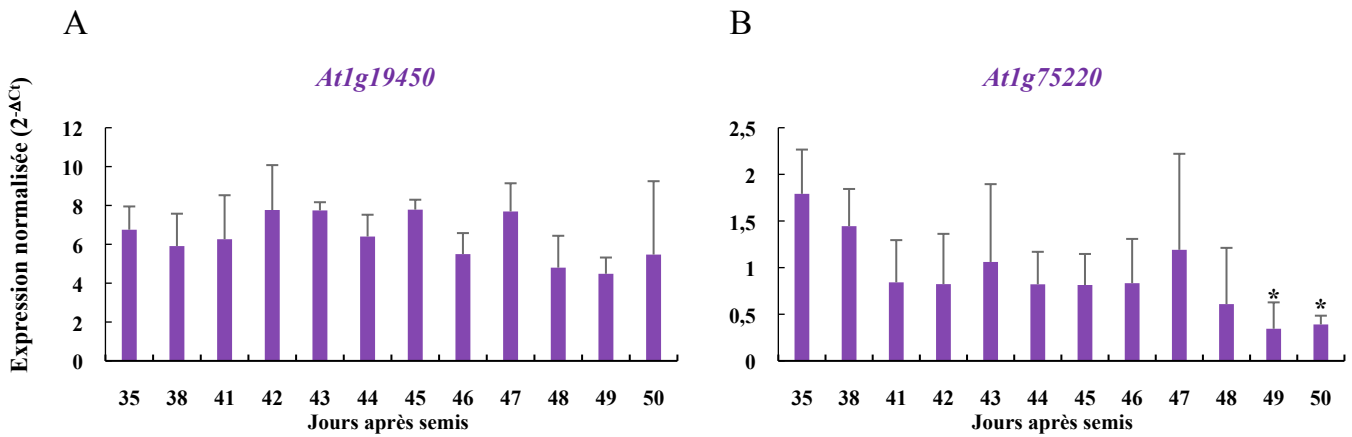


Figure 66 : expression relative des deux *ERD6-like* du groupe I de l'arbre phylogénétique, dans les feuilles, au cours du développement des plantes entre 35 et 50 jours après semis. Les valeurs représentées sont les valeurs d'expression normalisées par rapport à *AtPP2a*. Chaque valeur représente la moyenne de 3 répétitions biologiques (\pm écart-type), n = 3 lots de 5 plantes. Les astérisques représentent les valeurs significativement différentes déterminées par des tests de Kruskal Wallis suivis de test de comparaisons multiples de Dunn (p.value < 0,05) avec la correction de Bonferroni.

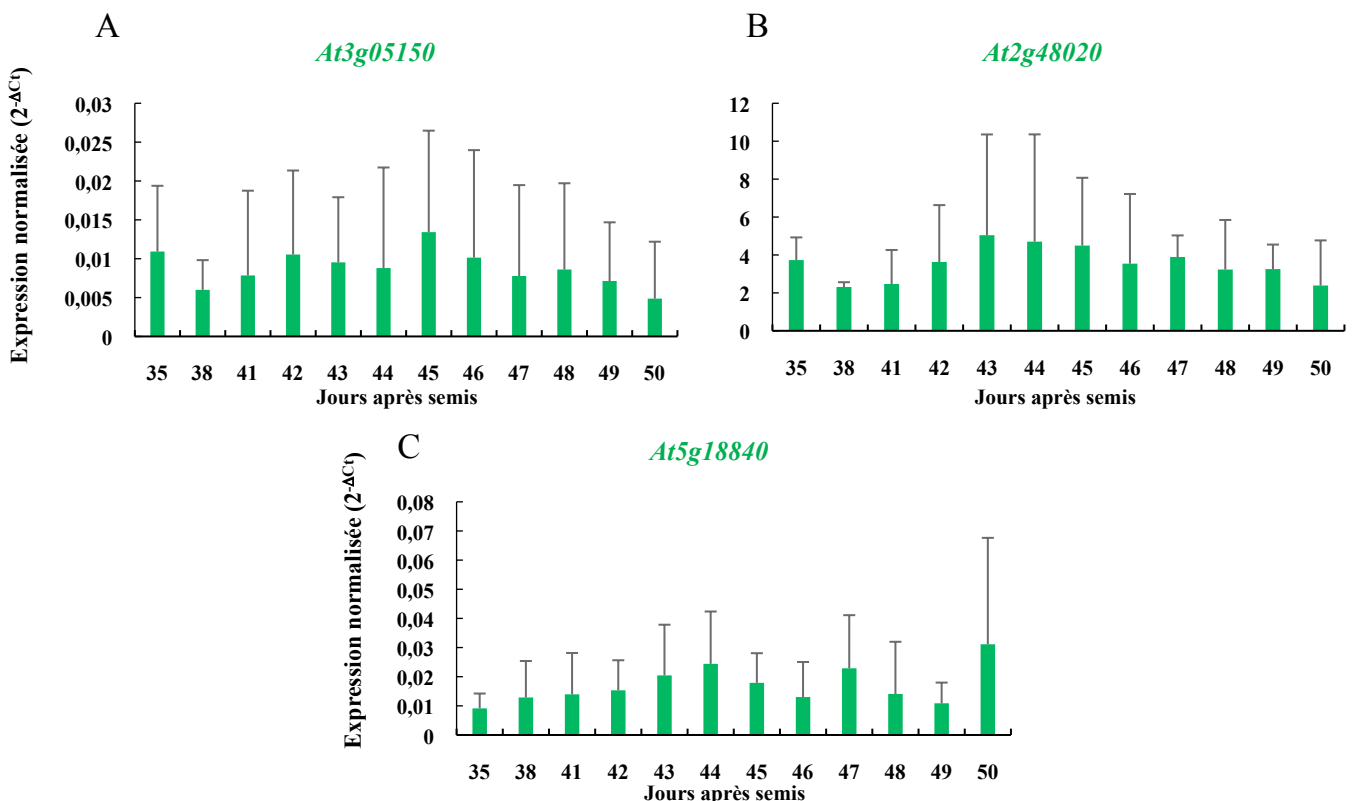


Figure 67 : expression relative des trois *ERD6-like* du groupe IIa de l'arbre phylogénétique, dans les feuilles, au cours du développement des plantes entre 35 et 50 jours après semis. Les valeurs représentées sont les valeurs d'expression normalisées par rapport à *AtPP2a*. Chaque valeur représente la moyenne de 3 répétitions biologiques (\pm écart-type), n = 3 lots de 5 plantes. Les astérisques représentent les valeurs significativement différentes déterminées par des tests de Kruskal Wallis suivis de test de comparaisons multiples de Dunn (p.value < 0,05) avec la correction de Bonferroni.

Yamagushi-Shinozaki 2007; Seki et al. 2002; Kiyosue et al. 1998). Parmi les gènes régulés par le stress hydrique modéré, se retrouvent les déhydrines, les LEA (Fang and Xiong 2015), les aquaporines, les canaux ioniques, notamment de K^+ , et des transporteurs de monosaccharides de la famille ERD6-like : *AtERD6* (Kiyosue et al. 1998) et *AtESL1* (Yamada et al. 2010).

Puisque nous avons évoqué la possibilité de divergences fonctionnelles entre dix-sept *AtERD6-like* chez *A. thaliana*, dont le nombre important dans le génome de nombreuses Eurosidées est la conséquence de nombreux évènements de duplication, et dont les copies les plus récentes montrent des patrons d'expression divers dans les organes, la réponse des 17 gènes *AtERD6-like* à la carence en eau a été analysée.

4 Réponse de l'expression de 17 gènes *AtERD6-like* à la carence en eau et à l'application d'acide abscissique exogène dans les feuilles d'*A. thaliana*

4.1 Expression de 17 AtERD6-like dans les feuilles de plantes arrosées entre 35 et 50 jours après semis

Avant d'identifier les *ERD6-like* répondant à la carence en eau, nous avons dans un premier temps, établi le profil d'expression de ces gènes dans les feuilles en conditions normales n'était pas considérablement modifié, au cours des 15 jours de développement correspondant à la durée de la cinétique de carence hydrique. Pour cela, l'expression relative de 17 *ERD6-like* a été mesurée par RT-qPCR dans les feuilles des plantes arrosées, entre 35 et 50 jours après semis.

La figure 66 montre l'expression relative pour les 2 gènes du groupe I. L'expression d'*AtIg19450* est stable chez les plantes arrosées entre 35 et 50 jours après semis (figure 66 A) et son expression relative moyenne est de $6,41 \pm 1,86$. Le développement des plantes, dans cet intervalle de temps, n'influence donc pas l'expression de ce gène. En revanche, l'expression relative d'*AtIg75220* diminue significativement à 49 et 50 jours après semis (figure 66 B). De 35 à 48 jours après semis, l'expression relative moyenne d'*AtIg75220* est de $1,04 \pm 0,59$, tandis qu'après 48 jours, elle est de $0,37 \pm 0,16$, soit une diminution d'un facteur 2,8.

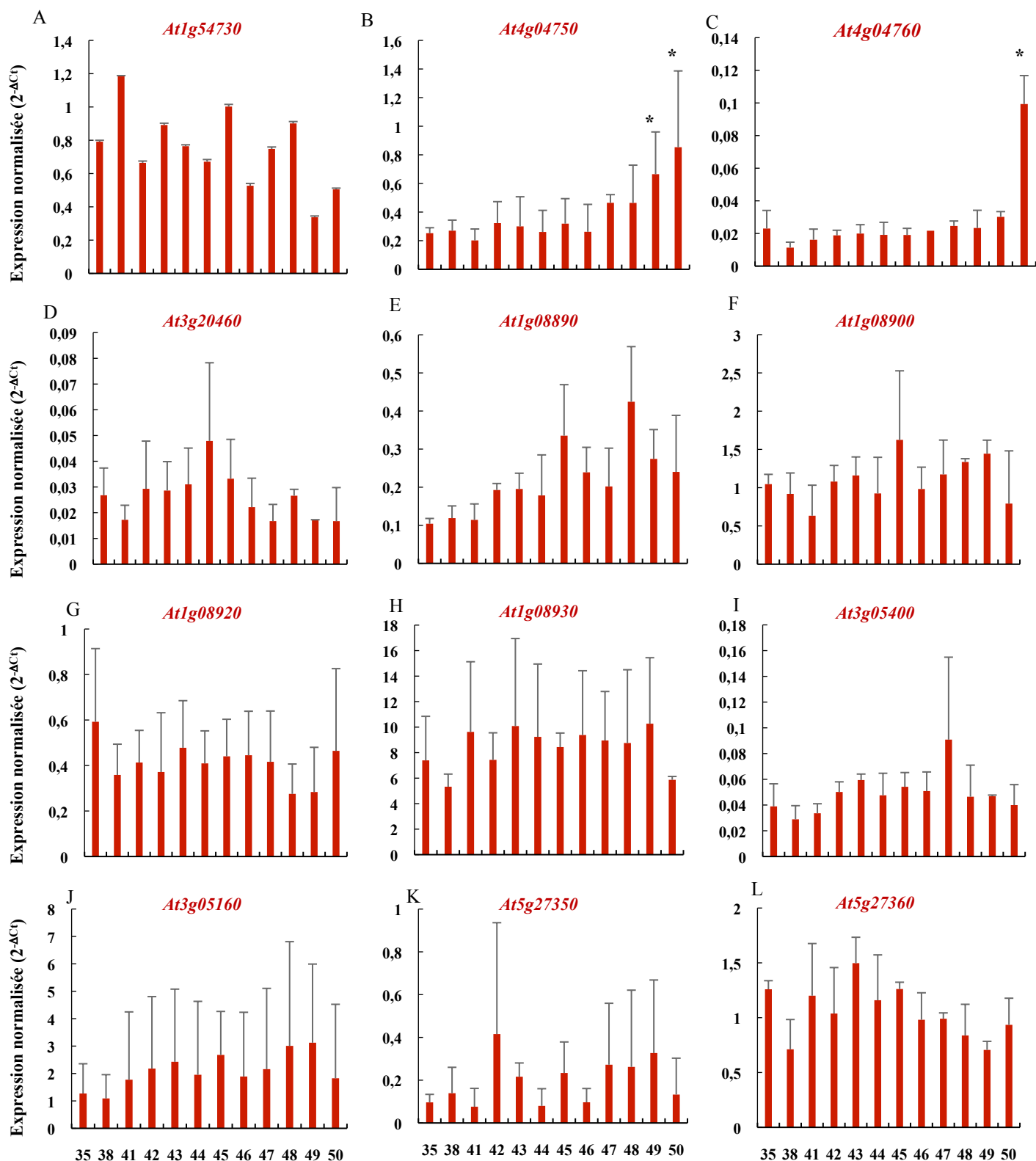


Figure 68 : expression relative de douze *ERD6-like* du groupe IIb de l'arbre phylogénétique, dans les feuilles, au cours du développement des plantes entre 35 et 50 jours après semis. Les valeurs représentées sont les valeurs d'expression normalisées par rapport à *AtPP2a*. Chaque valeur représente la moyenne de 3 répétitions biologiques (\pm écart-type), n = 3 lots de 5 plantes. Les astérisques représentent les valeurs significativement différentes déterminées par des tests de Kruskal Wallis suivis de test de comparaisons multiples de Dunn (p.valeur < 0,05) avec la correction de Bonferroni. L'expression de *At1g05165* n'a pas pu être analysée car il n'a pas été possible de définir un couple d'amorces spécifique. L'expression de *At1g05155* (gène tronqué) n'a pas pu être analysée car aucun produit d'amplification n'a été détecté.

Tableau 17 : expression relative moyenne de 17 *AtERD6-like* dans les feuilles d'*Arabidopsis thaliana* cultivée en condition normale d'arrosage.

Les valeurs représentent des moyennes (\pm écart type) de valeurs d'expression normalisée par rapport à *AtPP2a* (n= 3 répétitions biologiques et 5 plantes par répétition).

<i>Gènes</i>	<i>Expression relative moyenne entre 35 et 50 jours après semis</i>
<i>At1g19450</i>	6,41 \pm 1,86
<i>At1g75220</i>	1,04 \pm 0,59 (35 à 48 jours) 0,37 \pm 0,16 (49 à 50 jours)
<i>At3g05150</i>	0,009 \pm 0,009
<i>At2g48020</i>	0,02 \pm 0,02
<i>At5g18840</i>	3,59 \pm 2,80
<i>At1g54730</i>	0,81 \pm 0,55
<i>At4g04750</i>	0,31 \pm 0,15 (35 à 48 jours) 0,78 \pm 0,42 (49 à 50 jours)
<i>At4g04760</i>	0,03 \pm 0,006 (35 à 49 jours) 0,1 \pm 0,01 (à 50 jours)
<i>At3g20460</i>	0,03 \pm 0,02
<i>At1g08890</i>	0,20 \pm 0,11
<i>At1g08900</i>	1,10 \pm 0,42
<i>At1g08920</i>	0,43 \pm 0,20
<i>At1g08930</i>	8,53 \pm 3,83
<i>At3g05400</i>	0,05 \pm 0,02
<i>At3g05160</i>	0,81 \pm 0,55
<i>At5g27350</i>	0,19 \pm 0,22
<i>At5g27360</i>	1,07 \pm 0,33

L'expression de ce gène semble être dépendante du développement de la plante, elle est réduite en fin de croissance végétative.

La figure 67 montre que, l'expression des 3 gènes du groupe IIa (*At3g05150*, *At2g48020* et *At5g18840*), est stable chez les plantes arrosées entre 35 et 50 jours après semis (figures 67 2, A, B et C). Le développement des plantes, dans l'intervalle de temps considéré, n'influence pas, de façon significative, l'expression des trois gènes du groupe IIa. De 35 à 50 jours après semis, l'expression relative d'*At1g05150*, d'*At2g48020* et *At5g18840* est, respectivement de $0,009 \pm 0,009$, de $3,59 \pm 2,80$ et de $0,02 \pm 0,02$.

La figure 68 montre que, parmi les 12 gènes du groupe IIb de l'arbre analysés, seuls *At4g4750* et *At4g04760* sont induits, de façon significative, chez les plantes arrosées et ce, respectivement à partir de 49 jours et 50 jours après semis (figures 68 B et C). L'expression relative d'*At4g04750* de 35 à 48 jours après semis est de $0,31 \pm 0,15$ et de $0,78 \pm 0,42$ entre 49 et 50 jours après semis, soit une augmentation de 2,5 fois. L'expression relative d'*At4g04760* est de $0,03 \pm 0,06$ entre 35 et 49 jours après semis et de $0,10 \pm 0,01$, 50 jours après semis, soit une augmentation de 3,3 fois.

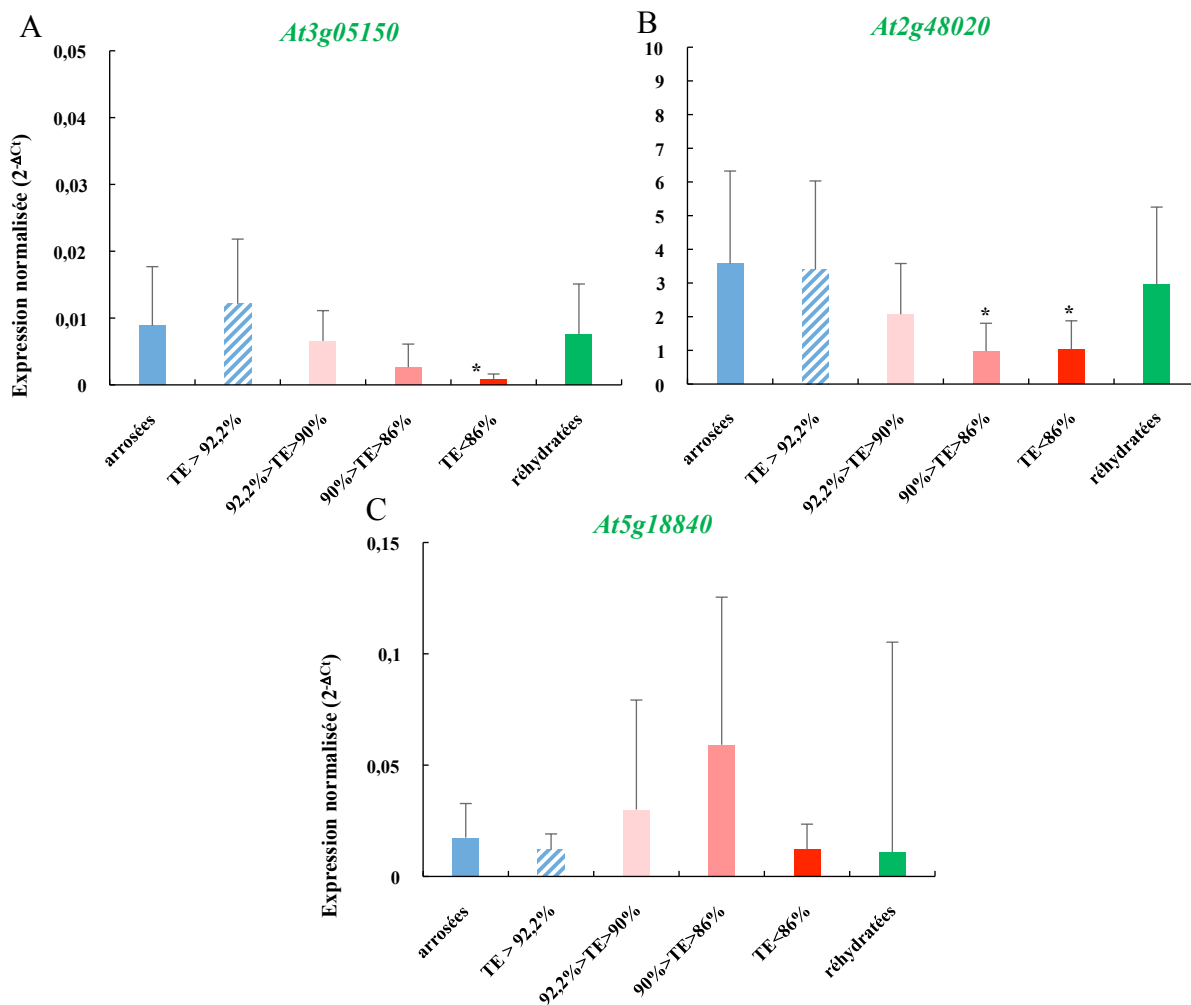
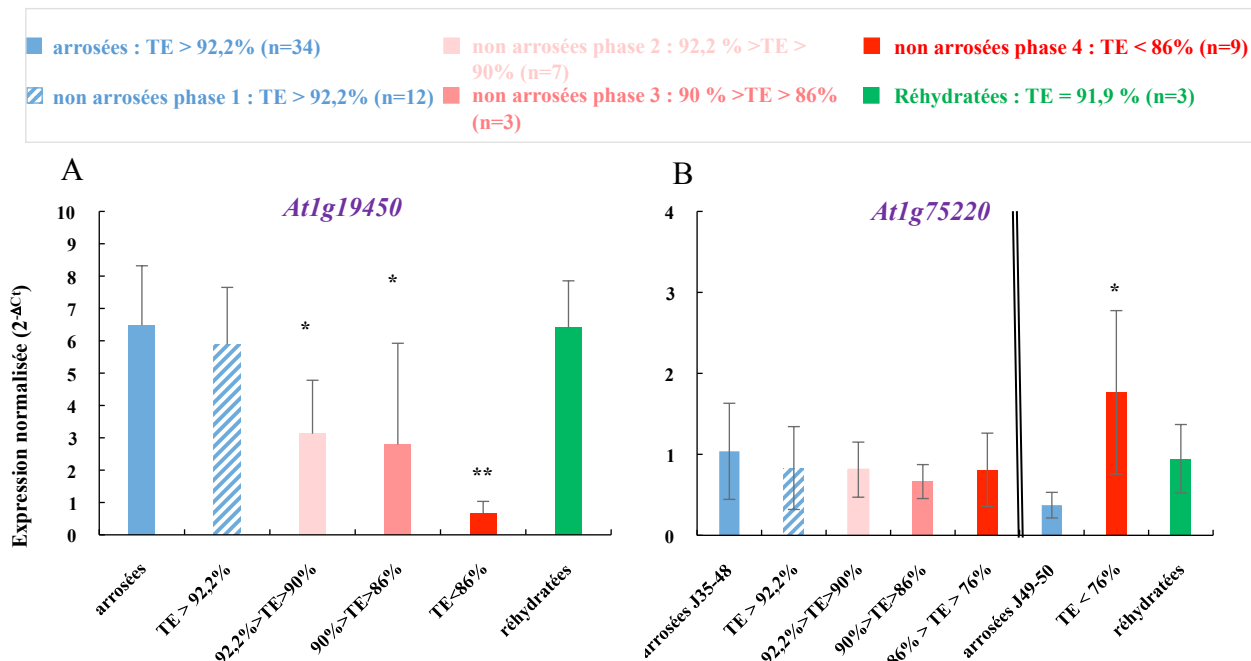
Pour tous les autres gènes analysés du groupe IIb (*At1g54730*, *At1g08890*, *At1g08900*, *At3g20460*, *At1g08920*, *At1g08930*, *At3g05400*, *At3g05160*, *At5g27350* et *At5g27360*), il n'y a pas de différence significative dans l'expression relative aux différents jours de prélèvement chez les plantes arrosées.

Toutes les valeurs moyennes de niveau d'expression pour les 17 AtERD6-like étudiés sont répertoriées dans le tableau 17.

Au bilan, l'expression relative de 14 *ERD6-like* sur 17 est stable dans les feuilles des plantes arrosées. Par contre, *At1g75220* du groupe I est réprimé à partir de 49 jours après semis, et *At4g04750* et *At4g04760* du groupe IIb sont induits respectivement à partir de 49 et 50 jours après semis.

4.2 Expression de 17 ERD6-like dans les feuilles de plantes en condition de carence hydrique et après réhydratation

Afin d'identifier les *ERD6-like* dont l'expression relative répond à une carence en eau, l'expression relative des 17 *ERD6-like* étudiés a été comparée pour des plantes arrosées, non arrosées pendant 15 jours (J35 à J50) et des plantes ayant subi une carence pendant 12 jours (J35 à J27) suivie d'une réhydratation. Les données d'expression obtenues sont présentées en



fonction de la teneur en eau et des 4 phases de la carence définies précédemment (figure R SH4, R SH5, R SH6)

La figure 69 permet de comparer le niveau d'expression relatif des 2 *ERD6-like* du groupe I.

At1g19450 est réprimé dès lors que la TE dans les rosettes est inférieure à 92,2% (phase 2). En effet, l'expression relative d'*At1g19450* est de $6,41 \pm 1,86$ chez les plantes arrosées, $5,89 \pm 1,75$ chez les plantes non arrosées en phase 1 (TE >92,2%) et $3,77 \pm 1,94$ chez les plantes non arrosées en phase 2 (92,2 % > TE > 90 %) soit 1,7 fois moins que chez les plantes arrosées. Cette répression s'accroît dès que la TE est inférieure à 90% (phases 3 et 4) avec une expression relative de $0,76 \pm 0,51$ en phase 3 (90% > TE > 86%) et de $0,89 \pm 0,47$ en phase 4 (TE < 86%), soit respectivement 8,4 et 7,2 fois moins que chez les plantes arrosées. Chez les plantes réhydratées, l'expression relative d'*At1g19450* a une valeur similaire à celle des plantes arrosées et non arrosées en phase 1 ($6,41 \pm 1,44$), ce qui soutient le fait que c'est réellement le manque d'eau qui engendre la répression de ce gène dans les feuilles (figure 69 A).

Selon l'analyse de la figure 66 B, *At1g75220* est réprimé dans les feuilles des plantes arrosées à 49 et 50 jours après semis, jours correspondant, chez les plantes non arrosées, à J14 et J15. Il s'agit des derniers jours de la cinétique de carence en eau, durant lesquels les plantes non arrosées ont une TE très faible, généralement inférieure à 76%. Ces plantes sont d'un point de vue des réponses d'ordre physiologiques, considérées en fin de phase 4. Pour ces raisons, sur la figure 69 B, l'expression relative d'*At1g75220* chez les plantes non arrosées ayant une TE inférieure à 76% est comparée à celles des plantes arrosées à 49 et 50 jours après semis, d'où la présence de deux barres d'histogramme supplémentaires. Les autres plantes sont traitées comme à l'habitude. *At1g75220* est induit chez les plantes non arrosées en fin de phase 4 (TE < 76%). L'expression relative de ce gène est de $0,37 \pm 0,18$ chez les plantes arrosées à J49 et J50 et de $1,77 \pm 1,00$ dans les plantes non arrosées ayant une TE inférieure à 76% (fin de la phase 4), soit une induction de 4,8 fois. Lors d'une carence en eau, la répression de *At1g75220* à 49 et 50 jours après semis n'est plus observable. Dans les plantes réhydratées, le niveau d'expression d'*At1g75220* est similaire à celui détecté dans les plantes arrosées et dans les plantes non arrosées des autres phases. Il est toutefois plus élevé que les plantes non arrosées à J49-J50. *At1g75220* est donc induit tardivement par la carence en eau. Cette induction apparente pourrait refléter une non-répression du gène *At1g75220* par le stress hydrique à la fin de la cinétique. Néanmoins, par rapport à son niveau d'expression

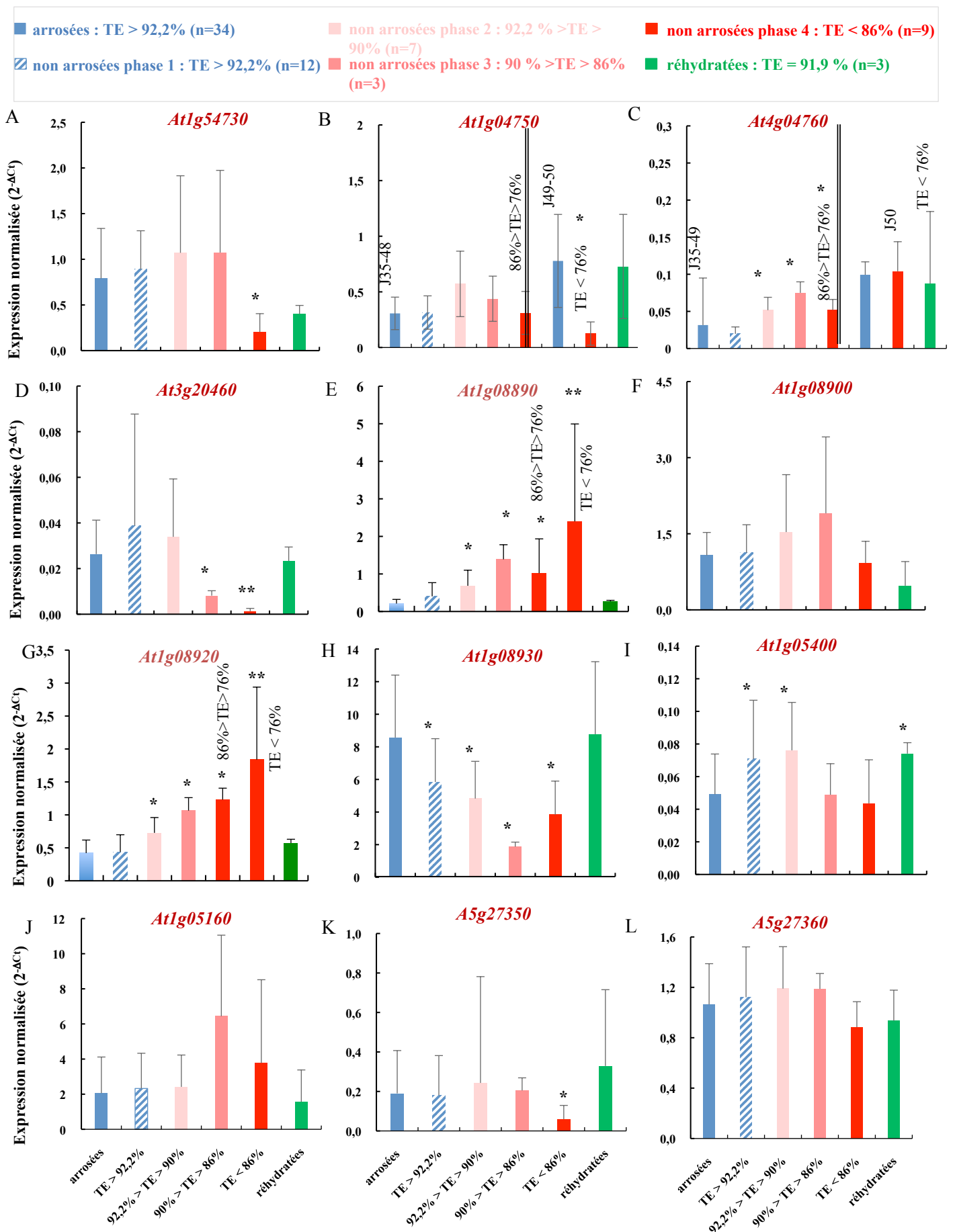


Figure 71: expression de douze *ERD6-like* du Groupe IIb dans les feuilles des plantes arrosées, non arrosées et réhydratées. Les valeurs correspondent à des moyennes de 3 répétitions biologiques (\pm écart type) de niveau d'expression normalisé par rapport à *AtPP2a*. Les astérisques représentent des valeurs significativement différentes déterminées par un test de Kruskal Wallis suivi du test de comparaisons multiples de Dunn (* p.value < 0,05 ; ** p.value < 0,0001) avec la correction de Bonferroni.

entre 35 et 48 jours après semis, *At1g75220* est tout de même 1,7 fois plus exprimé en phase 4. Etant donné que la phase 4 est une phase de flétrissement avancé et irréversible, et qu'*At1g75220* est induit uniquement à la fin de cette phase 4, nous pouvons émettre l'hypothèse que cet *ERD6-like* ne serait pas induit par la sénescence, engendrée ici par l'arrêt d'arrosage, plutôt que par la carence en eau directement.

La figure 70 représente l'expression relative des 3 gènes du groupe IIa dans les 3 conditions de culture imposées (arrosées, non arrosées et réhydratées).

At3g05150 est réprimé d'un facteur 10 en phase 4 (TE < 86%) avec une expression relative de $0,009 \pm 0,009$ chez les plantes arrosées et de $0,0009 \pm 0,0007$ chez les plantes non arrosées en phase 4 (figure 70 A). Bien que cette répression semble importante, les niveaux d'expression relative calculés sont relativement bas. La réhydratation des plantes permet à *At3g05150* de retrouver un niveau d'expression similaire à celui des plantes arrosées ($0,008 \pm 0,008$), ce qui conforte l'hypothèse selon laquelle c'est le manque d'eau qui a entraîné la répression de ce gène.

At2g48020 est réprimé dans les feuilles des plantes non arrosées ayant une TE inférieure à 90 % (figure 70 B). Cette répression est de 3,7 fois comparé au niveau d'expression relative de $3,58 \pm 2,80$ chez les plantes arrosées et de $0,98 \pm 0,83$ et $1,02 \pm 0,86$ chez les plantes non arrosées respectivement en phase 3 et 4. La réhydratation des plantes permet à *At2g48020* de retrouver un niveau d'expression similaire à celui des plantes arrosées ($2,94 \pm 2,31$), ce qui conforte également l'hypothèse que la répression de ce gène est liée au manque d'eau.

Le niveau d'expression relative d'*At5g18840* est stable dans les feuilles des plantes arrosées pour chacune des conditions de culture analysées. Il est en moyenne de $0,02 \pm 0,02$ (figure 70 C). Ce gène ne répond pas à la carence en eau dans les conditions de cette étude.

La figure 71 représente l'expression relative de 12 gènes du groupe IIb dans les 3 conditions de culture imposées (arrosées, non arrosées, réhydratées).

At1g54730 est réprimé 3,9 fois en phase 4 (TE < 86%) avec une expression relative de $0,81 \pm 0,55$ chez les plantes arrosées et de $0,21 \pm 0,20$ chez les plantes non arrosées en phase 4 (figure 71 A). La réhydratation des plantes permet à *At1g54730* de retrouver un niveau d'expression similaire à celui des plantes arrosées ($0,73 \pm 0,04$), ce qui conforte l'hypothèse selon laquelle c'est le manque d'eau qui a entraîné la répression de ce gène.

Selon l'analyse de la figure 68 B, *At4g04750* est induit dans les feuilles des plantes arrosées à 49 et 50 jours après semis. Ces jours correspondent, chez les plantes non arrosées, à J14 et J15, qui sont les derniers jours de la cinétique de carence en eau, durant lesquels les

plantes non arrosées ont une TE très faible, généralement inférieure à 76%. Ces plantes sont donc considérées en fin de phase 4. Pour ces raisons, sur la figure 71 B, l'expression relative d'*At4g04750* chez les plantes non arrosées ayant une TE inférieure à 76% est comparée à celle des plantes arrosées à 49 et 50 jours après semis. Les autres plantes sont classées en fonction de leur TE. *At4g04750* est réprimé chez les plantes non arrosées uniquement en fin de phase 4 (TE < 76%). L'expression relative de ce gène est de $0,78 \pm 0,42$ chez les plantes arrosées à J49 et J50 et de $0,13 \pm 0,11$ chez les plantes non arrosées ayant une TE inférieure à 76% (fin de la phase 4). Ce qui fait une répression de 6 fois. L'induction d'*At1g04750*, en condition d'arrosage à partir de 49 et 50 jours après semis (figure 68 B) n'est plus observable en condition de carence en eau. En fin de phase 4, *At1g04750* apparaît réprimé non seulement par rapport aux plantes arrosées à 49 et 50 jours après semis mais également par rapport à la moyenne des niveaux d'expression, des 4 phases de la carence en eau. Cette moyenne est de $0,34 \pm 0,19$, c'est-à-dire 3 fois plus élevée que le niveau d'expression relative d'*At1g04750* en fin de phase 4. Tout comme ce qui a été expliqué pour l'expression d'*At1g75220*, la sénescence pourrait jouer un rôle dans la répression d'*At4g04750* chez les plantes non arrosées ayant une TE inférieure à 76%.

Selon l'analyse de la figure 68 C, *At4g04760* est induit dans les feuilles des plantes arrosées à 50 jours après semis. Ce jour correspond, chez les plantes non arrosées, à J15, qui est le dernier jour de la cinétique de carence en eau, durant lequel les plantes non arrosées ont une TE très faible, inférieure à 76%. Ces plantes sont comme précédemment considérées en fin de phase 4. Pour ces raisons, sur la figure 71 C, l'expression relative d'*At4g04760* chez les plantes non arrosées ayant une TE inférieure à 76% est comparée à l'expression relative des plantes arrosées à 50 jours après semis. Les autres plantes sont traitées comme à l'habitude. *At4g04760* est induit chez les plantes non arrosées dès la phase 2 (TE < 92,2%). L'expression relative de ce gène est de $0,03 \pm 0,06$ chez les plantes arrosées entre 35 et 49 jours après semis et de $0,06 \pm 0,05$ chez les plantes non arrosées ayant une TE comprise entre 92,1% et 76% (moyenne des valeurs pour les phases 2, 3 et début de phase 4). Ce qui fait une induction de 2 fois. Néanmoins, il faut tout de même préciser que le niveau d'expression relative est plutôt faible. Le niveau d'expression d'*At4g04760* pour les plantes réhydratées n'est pas significativement différent de celui des plantes arrosées de 35 à 49 jours après semis ($0,09 \pm 0,03$ chez les plantes réhydratées contre $0,03 \pm 0,06$ chez les plantes arrosées de 35 à 49 jours après semis). Néanmoins les écarts types sont importants, il est donc difficile d'affirmer que la réhydratation des plantes lève l'induction d'*At4g04760* observée chez les plantes non arrosées. L'acquisition de données supplémentaires permettrait de valider ces observations.

De façon similaire le niveau d'expression des plantes réhydratées n'est pas significativement différent de ceux des plantes arrosées à J50 ($0,01 \pm 0,01$) et des plantes non arrosées à J50 ($0,11 \pm 0,03$). Il est donc, à ce stade, difficile de trancher entre induction due à l'âge des plantes et induction due à la carence en eau. En revanche, *At4g04760* apparaît être un gène intéressant à étudier dans un contexte de carence en eau étant donné qu'il est induit assez tôt dans les rosettes des plantes non arrosées (phase 2 = carence modérée).

At3g20460 est réprimé 4,4 fois dans les plantes non arrosées en phase 3 ($90\% > TE > 86\%$) avec un niveau d'expression relative de $0,006 \pm 0,003$ et de $0,03 \pm 0,02$ dans les plantes arrosées. Il est réprimé également 30 fois en phase 4 ($TE < 86\%$) avec un niveau d'expression de $0,0009 \pm 0,0009$ (figure 71 D). La réhydratation des plantes permet à *At3g20460* de retrouver un niveau d'expression similaire à celui des plantes arrosées ($0,02 \pm 0,006$), ce qui conforte l'hypothèse selon laquelle c'est le manque d'eau qui a entraîné la répression de ce gène. Le niveau d'expression relative d'*At3g20460* est faible dans chacune des conditions de culture analysées. Mais, il est 30 fois plus faible en phase 4 que dans la condition arrosée ce qui le rend presque indétectable en RT-qPCR. Ce gène est donc très réprimé lors de la phase de sénescence chez les plantes non arrosées.

At1g08890 est induit 3,3 fois dans les plantes non arrosées en phase 2 ($92,2\% > TE > 90\%$) avec un niveau d'expression relative de $0,68 \pm 0,42$ contre $0,20 \pm 0,11$ dans les plantes arrosées. Son induction perdure tout au long de la cinétique de stress hydrique et est maximale durant la fin de phase 4 ($TE < 76\%$) avec un niveau d'expression de $2,39 \pm 2,59$, soit une induction de près de 12 fois par rapport à Col-0 (figure 71 E). L'induction de ce gène est précoce, dès la carence modérée en eau et s'amplifie en même temps que la TE diminue dans les rosettes des plantes non arrosées. La réhydratation des plantes permet à *At1g08890* de retrouver un niveau d'expression similaire à celui des plantes arrosées ($0,29 \pm 0,07$), ce qui conforte l'hypothèse selon laquelle c'est bien le manque d'eau qui a entraîné l'induction de ce gène.

Le niveau d'expression relative d'*At1g08900* est stable dans chacune des conditions de culture analysées. Il est en moyenne de $1,13 \pm 0,64$ (figure 71 F). Ce gène ne répond pas à la carence en eau dans les conditions de cette étude.

At1g08920 est induit 1,7 fois en phase 2 ($92,2\% > TE > 90\%$) avec une expression relative de $0,42 \pm 0,19$ chez les plantes arrosées et de $0,73 \pm 0,23$ chez les plantes non arrosées. Son induction perdure tout au long de la cinétique de stress hydrique et est maximale durant la fin de phase 4 ($TE < 76\%$) avec un niveau d'expression de $1,84 \pm 1,09$, soit une induction de 4,4 fois par rapport à Col-0 (figure 71 G). L'induction de ce gène est précoce dès la carence

modérée en eau et s'amplifie en même temps que la TE diminue dans les rosettes des plantes non arrosées. La réhydratation des plantes permet à *At1g08920* de retrouver un niveau d'expression similaire à celui des plantes arrosées ($0,57 \pm 0,06$), ce qui conforte l'hypothèse selon laquelle c'est le manque d'eau qui a entraîné l'induction de ce gène.

At1g08930 est réprimé 1,5 fois en phase 1 (plantes non arrosées dont la TE est supérieure à 92,2% et qui ne présentent aucune différence au niveau des mesures physiologiques avec les plantes arrosées) avec une expression relative de $5,80 \pm 2,66$ en phase 1, en comparaison avec $8,53 \pm 3,83$ pour les plantes arrosées. Il est réprimé 2,3 fois en phase 2 (92,2% > TE > 90%) avec une expression relative $3,68 \pm 2,41$, réprimé 3,9 fois en phase 3 (90% > TE > 86%) avec une expression relative de $2,20 \pm 1,34$ et est réprimé 1,7 fois en phase 4 (TE < 86%) avec une expression relative de $5,05 \pm 1,67$ (figure 71 H). La répression de ce gène est précoce et pourrait avoir lieu avant même que les plantes ne montrent des signes de carence en eau au niveau des teneurs en sucres solubles, de la TE, de la CS, des SFp et des masses des rosettes. Cette répression s'amplifie en parallèle de la diminution de la TE dans les rosettes des plantes non arrosées jusqu'à la phase 3. Pour des valeurs de TE inférieure à 86%, la répression d'*At1g08930* est toujours présente mais moins marquée. La réhydratation des plantes permet à *At1g08930* de retrouver un niveau d'expression similaire à celui des plantes arrosées ($8,74 \pm 4,45$), ce qui conforte l'hypothèse selon laquelle c'est le manque d'eau qui a entraîné la répression de ce gène. Il se pourrait que la répression de ce gène participe à aider la plante non arrosée depuis 7 jours à maintenir tous les paramètres physiologiques mesurés à des valeurs normales, c'est-à-dire non différentes des plantes arrosées tous les 3 jours.

At3g05400 est induit 1,4 fois en phase 1 avec une expression relative de $0,05 \pm 0,02$ chez les plantes arrosées et de $0,07 \pm 0,04$ en phase 1. Il est induit 1,5 fois en phase 2 (92,2% > TE > 90%) et chez les plantes réhydratées avec une expression relative $0,08 \pm 0,03$ en phase 2 et de $0,07 \pm 0,007$ chez les plantes réhydratées (figure 71 I). L'induction précoce de ce gène peut toutefois être mise en doute à cause du niveau d'expression très bas et des facteurs d'induction peu élevés (1,4 et 1,5 fois). L'acquisition de données supplémentaires permettrait de confirmer ou infirmer ces observations.

Le niveau d'expression relative d'*At3g05160* est stable dans chacune des conditions de culture analysées. Il est en moyenne de $2,63 \pm 2,77$ (figure 71 J). Ce gène ne répond pas à la carence en eau dans les conditions de cette étude.

At5g27350 est réprimé 2,9 fois en phase 4 (TE < 86%) avec une expression relative de $0,07 \pm 0,08$ chez les plantes non arrosées et de $0,19 \pm 0,22$ chez les plantes arrosées (figure 71 K). Etant donné que la phase 4 est une phase de sénescence irréversible et avancée, et

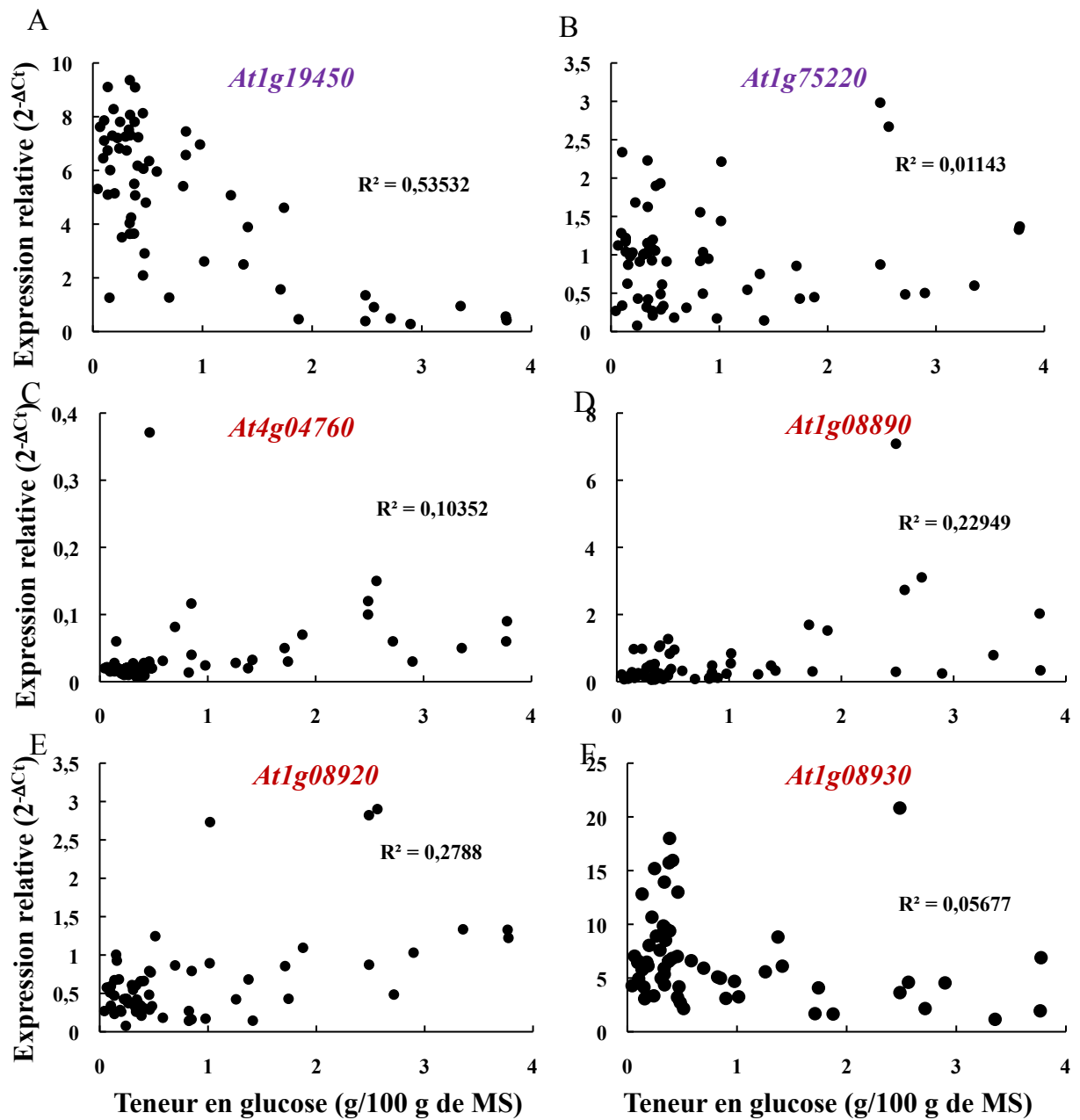


Figure 72 : corrélations entre la teneur en glucose et le niveau d'expression de 6 *AtERD6-like* dans les feuilles d'*Arabidopsis thaliana*. Chaque point représente les valeurs d'expression normalisée par rapport à *AtPP2a* et la teneur en glucose d'un pool de 5 demi-rosettes. Les R^2 représentent les coefficients de corrélation.

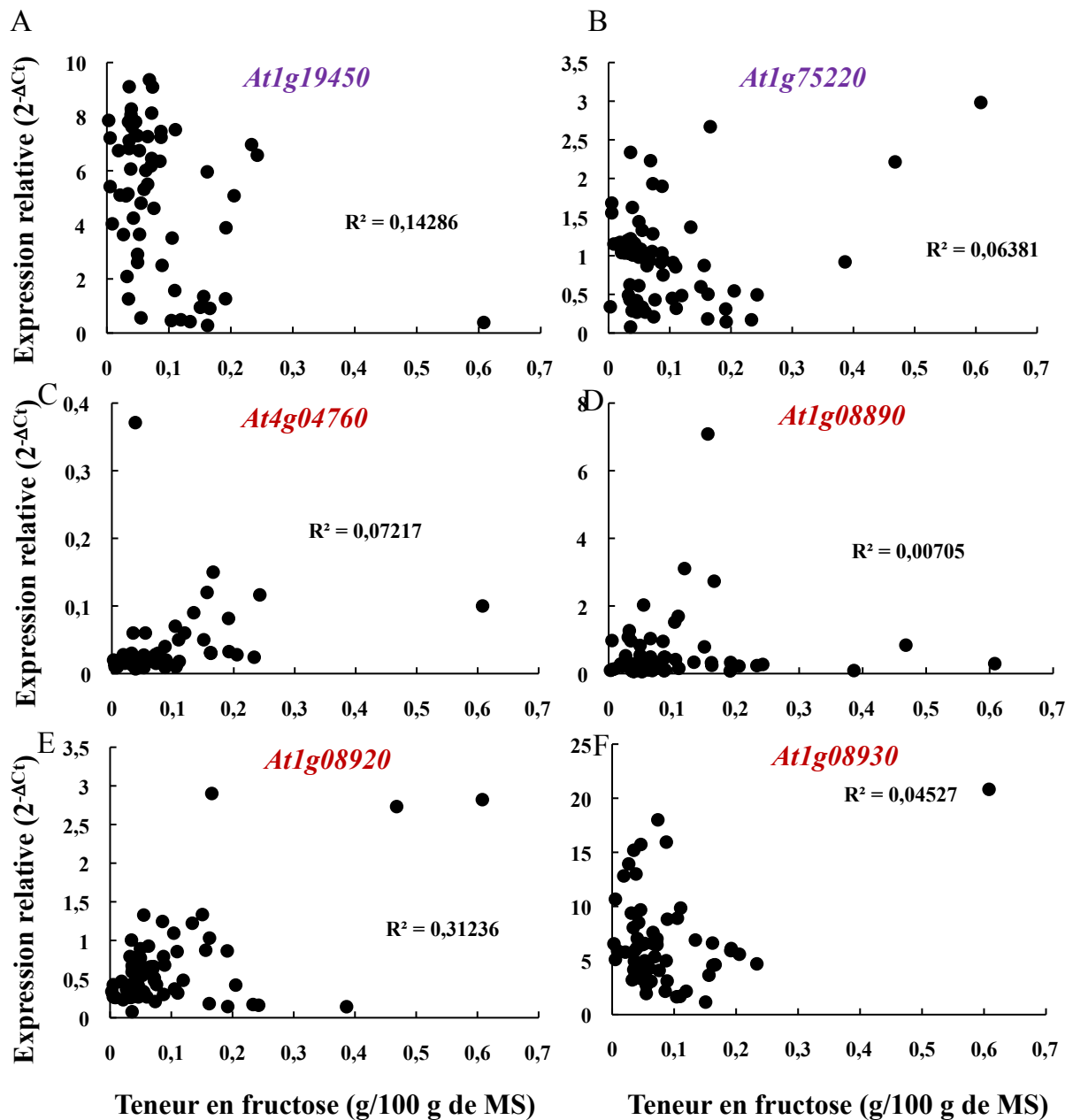


Figure 73: corrélations entre la teneur en fructose et le niveau d'expression de 6 *AtERD6-like* dans les feuilles d'*Arabidopsis thaliana*. Chaque point représente les valeurs d'expression normalisée par rapport à *AtPP2a* et de teneurs en glucose d'un pool de 5 demi-rosettes. Les R² représentent les coefficients de corrélation.

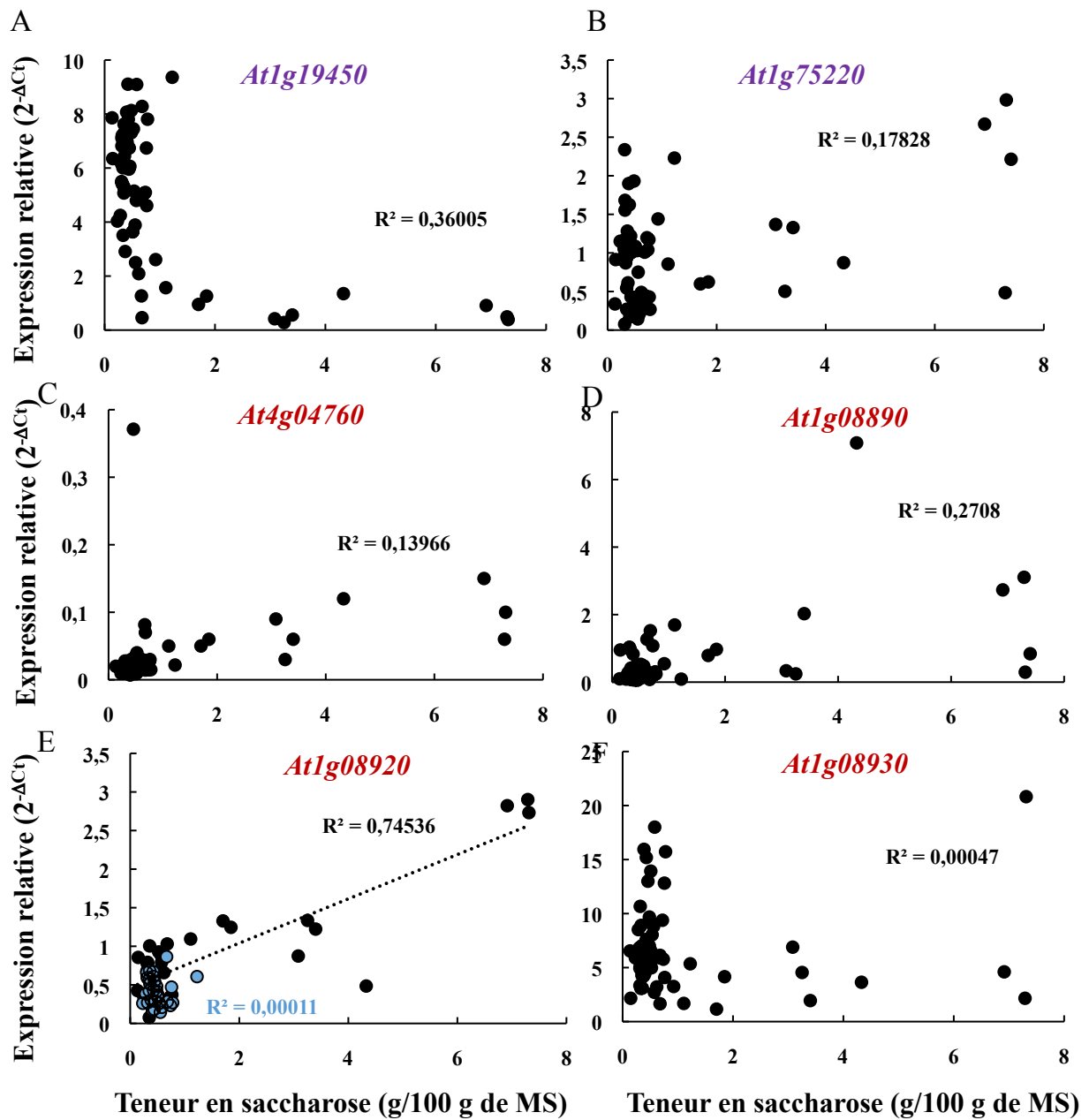


Figure 74 : corrélations entre la teneur en saccharose et le niveau d'expression de 6 *AtERD6-like* dans les feuilles d'*Arabidopsis thaliana* non arrosée. Chaque point représente les valeurs d'expression normalisée par rapport à *AtPP2a* et de teneurs en glucose d'un pool de 5 demi-rosettes. Les R^2 représentent les coefficients de corrélation. A, B, C, D et F : phases 1 à 4. E : en bleu : phase 1, en noir : phases 2 à 4.

qu'*At5g27350* est réprimé uniquement à la fin de cette phase 4, nous pouvons émettre l'hypothèse que cet *ERD6-like* ne serait pas réprimé en sénescence, engendrée par l'arrêt d'arrosage, plutôt que par la carence en eau directement.

Le niveau d'expression relative d'*At5g27360* est stable dans chacune des conditions de culture analysées. Il est en moyenne de $1,07 \pm 0,32$ (figure 71 L). Ce gène ne répond pas à la carence en eau dans les conditions de cette étude.

L'induction des quatre *AtERD6-like* par la carence en eau pourrait être corrélée à l'augmentation des teneurs en saccharose, glucose et fructose. De même, la répression d'*At1g19450* et d'*At1g08930* paraissent progressives et pourraient être corrélée de façon négative à l'augmentation progressive de la teneur en saccharose au fur et à mesure du stress hydrique. Des graphiques de corrélation ont de ce fait été réalisés (figures 72, 73 et 74) en incluant la valeur de chacune des répétitions, chaque valeur correspondant à un pool de 5 plantes. Pour le glucose, aucune corrélation flagrante n'a été mise en évidence avec la réponse de chacun des 6 gènes étudiés (figure 72), avec des R^2 allant de 0,011 à 0,535. Il en va de même pour le fructose dont l'accumulation en fin de phase 4 n'est pas corrélée à l'induction ou la répression des 6 gènes étudiés (figure 73), même pour *At1g75220* semblant pourtant lui-même induit en fin de phase 4 (R^2 de 0,007 à 0,312). Enfin, pour le saccharose, une seule corrélation linéaire a pu être établie, avec le gène *At1g08920*, de la phase 2 à la phase 3 (figure 74 E, $R^2 = 0,745$). L'accumulation progressive de saccharose des phases 2 à 4 est donc potentiellement accompagnée de l'induction progressive d'*At1g08920*.

4.3 Réponse de quelques *AtERD6-like* à l'application exogène d'acide abscissique par pulvérisation foliaire

Afin de déterminer si la régulation de l'expression de ces 5 *AtERD6-like* lors d'une carence en eau pourrait être liée à un signal ABA, l'expression relative de ces 5 *AtERD6-like* a été quantifiée suite à un traitement à l'ABA (750 μ M) par pulvérisation foliaire. Cette analyse a aussi été menée sur les copies de ces gènes dupliquées en tandem (*At1g75220*, *At4g04750* et *At1g08900*).

Dans le but de vérifier que le traitement à l'ABA par pulvérisation a bien déclenché une réponse et les voies de signalisation ABA, l'expression du gène *AtSWEET15* (anciennement *AtSAG29*), décrit comme un gène marqueur de la réponse à la sénescence *via*

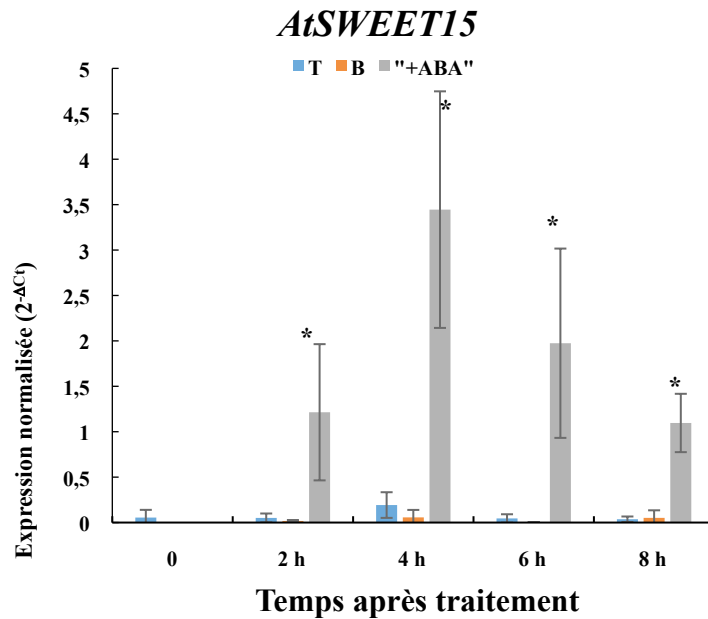


Figure 75 : réponse d'*AtSweet15* au traitement à l'ABA par pulvérisation foliaire. T = témoin, plantes non traitées ; B = blanc, plantes traitées au DMSO ; +ABA = plantes traitées avec une solution d'ABA dans un tampon DMSO. Les valeurs représentées sont les valeurs moyennes de 3 répétitions biologiques (\pm écart type), du niveau d'expression relative normalisée par rapport à *AtPP2a*. Des tests de Kruskal Wallis ont été effectués suivis de test de comparaisons multiples de Dunn corrigé par Bonferroni. Les valeurs statistiquement sont représentées par des astérisques (p.value < 0,05).

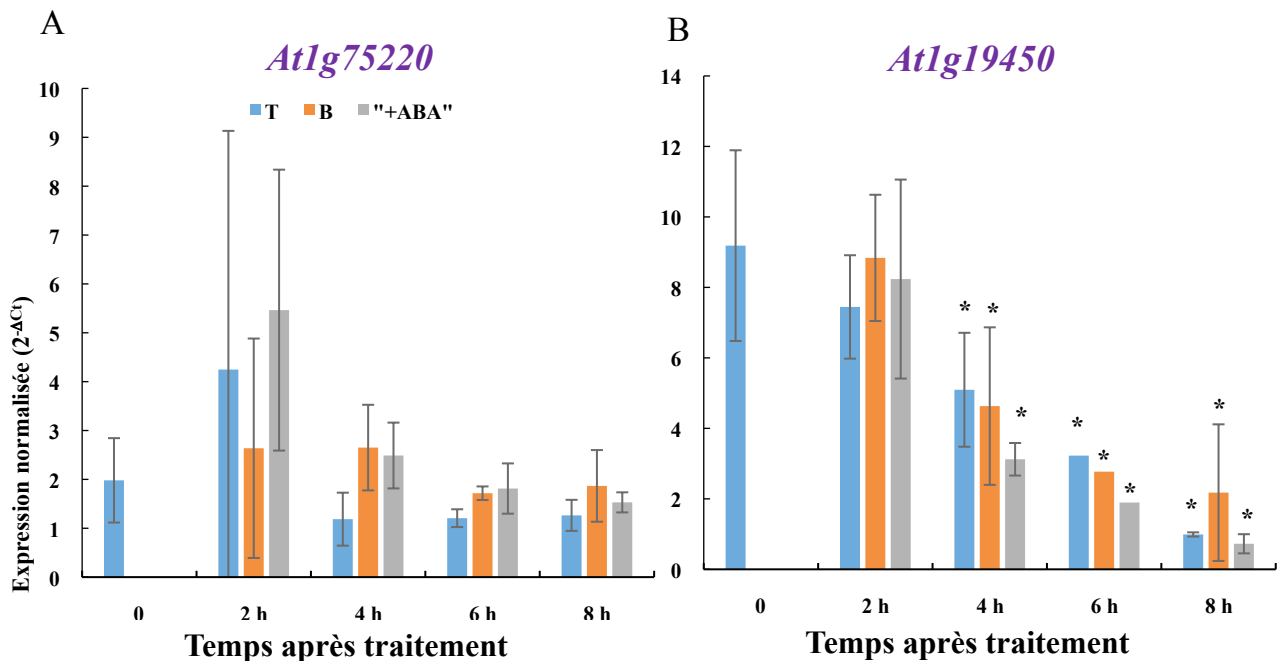


Figure 76 : réponse de l'expression d'*At1g75220* et d'*At1g19450*, deux *AtERD6-like* dupliqués en tandem du groupe I, au traitement à l'ABA par pulvérisation foliaire. T = témoin, plantes non traitées ; B = blanc, plantes traitées au DMSO ; +ABA = plantes traitées avec une solution d'ABA dans un tampon DMSO. Les valeurs représentées sont les valeurs moyennes de 3 répétitions biologiques (\pm écart type), du niveau d'expression relative normalisée par rapport à *AtPP2a*. Des tests de Kruskal Wallis ont été effectués suivis de test de comparaisons multiples de Dunn corrigé par Bonferroni. Les valeurs statistiquement sont représentées par des astérisques (p.value < 0,05).

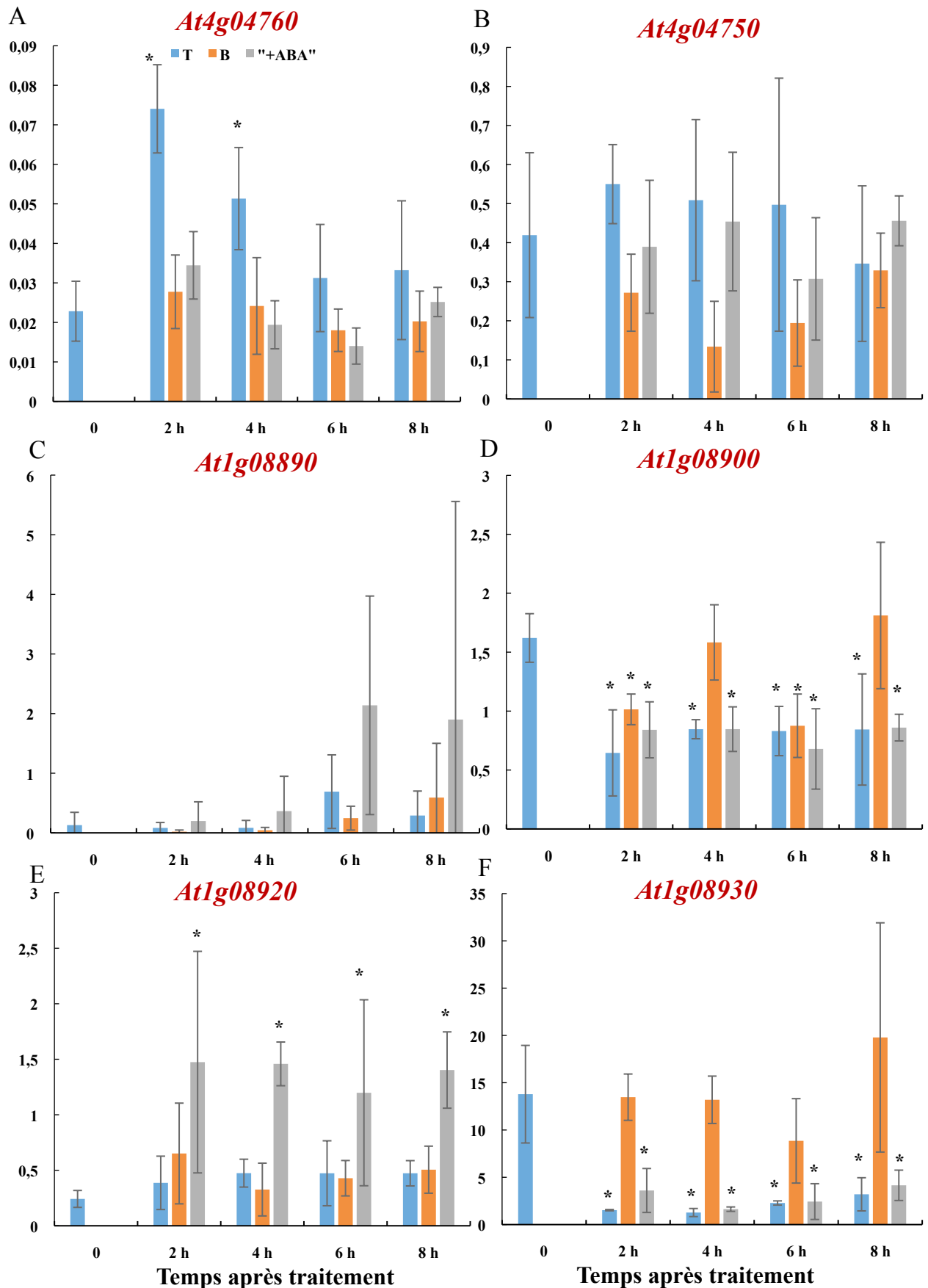


Figure 77 : réponse de 6 *AtERD6-like* dupliqués en tandem du groupe IIb, au traitement à l'ABA par pulvérisation foliaire. T = témoin, plantes non traitées ; B = blanc, plantes traitées au DMSO ; +ABA = plantes traitées avec une solution d'ABA dans un tampon DMSO. Les valeurs représentées sont les valeurs moyennes de 3 répétitions biologiques (\pm écart type), du niveau d'expression relative normalisée par rapport à *AtPP2a*. Des tests de Kruskal Wallis ont été effectués suivis de test de comparaisons multiples de Dunn corrigé par Bonferroni. Les valeurs statistiquement différentes sont représentées par des astérisques (p .value < 0,05).

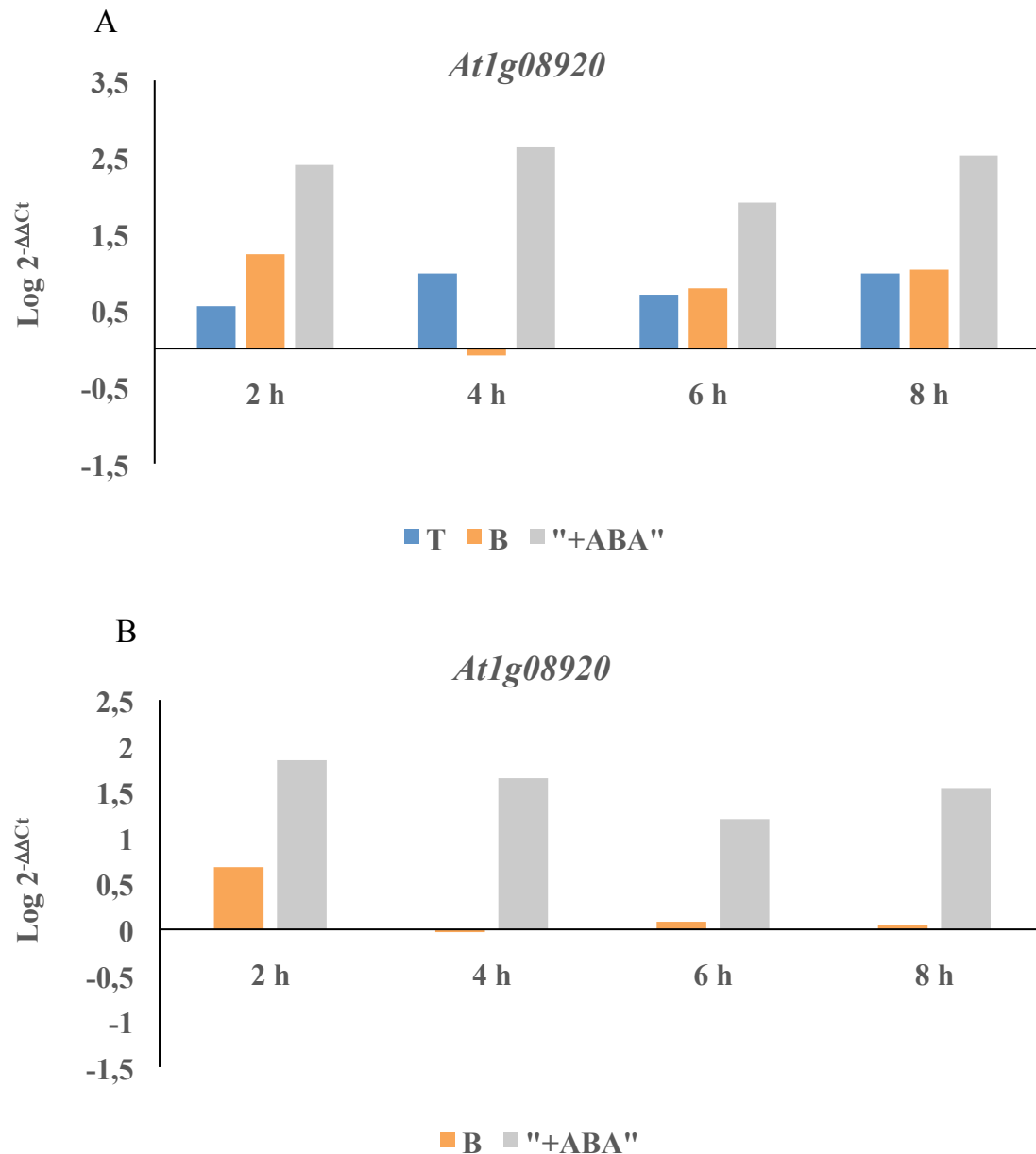


Figure 78 : induction d'*At1g08920* du groupe IIb, au traitement à l'ABA par pulvérisation foliaire. T = témoin, plantes non traitées ; B = blanc, plantes traitées au DMSO ; +ABA = plantes traitées avec une solution d'ABA dans un tampon DMSO. Les valeurs représentées sont les valeurs moyennes de 3 répétitions biologiques (\pm écart type), du niveau d'expression relative en valeur logarithmique. A : normalisation par rapport au gène *AtPP2a* et par rapport à la valeur T0, B : normalisation par rapport au gène *AtPP2a* et par rapport aux valeurs témoins à chaque point de prélèvement.

son induction par l'ABA (Seo et al. 2011) a été déterminée. La figure 75 montre que la pulvérisation foliaire d'ABA dilué dans un tampon DMSO a bien permis l'induction de l'expression relative d'*AtSWEET15*. En effet, *AtSWEET15* est induit dans les feuilles des plantes ayant été traitées à l'ABA, et ce dès 2 h après le traitement. Il est induit 22,1 fois 2 h après le traitement à l'ABA par rapport à l'expression du témoin non pulvérisé à T0 ; 62,7 fois après 4 h ; 35,9 fois après 6 h et 20 fois après 8 h. L'expression relative d'*AtSWEET15* montre un pic 4 h après traitement des feuilles à l'ABA.

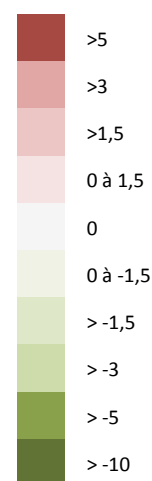
La figure 76 montre les effets du traitement ABA sur l'expression relative des 2 *AtERD6-like* du groupe I. A priori, *At1g75220* et *At1g19450* ne répondraient pas à la pulvérisation foliaire d'une solution d'ABA. Ce résultat n'est pas surprenant étant donné que *At1g75220* est induit uniquement en fin de phase 4 lors d'une carence hydrique (sénescence avancée et irréversible). Nous pouvons également noter que le niveau d'expression relative de *At1g19450* diminue progressive entre 0 et 8 h après traitement, aussi bien pour les plantes contrôles que les plantes pulvérisées à l'ABA. Quatre heures après le traitement, l'expression d'*At1g19450* est réduite de 2,1 fois par rapport à la condition témoin à T0. Six heures après le traitement, elle est réduite de 3,5 fois et après 8 h de traitement elle est réduite de 7,1 fois. Considérant que le prélèvement T0 a lieu au moment où la lumière de la chambre de culture s'allumait, il est possible que les 4 points de cinétique correspondent à 2h, 4h, 6h et 8h après traitement à l'ABA et également à 2, 4, 6, 8 h de lumière après une période prolongée d'obscurité (nuit). *At1g19450* pourrait donc être réprimé par la lumière.

La figure 77 montre les effets du traitement ABA sur l'expression relative des 6 *AtERD6-like* du groupe IIb. Il apparaît que :

- L'expression d'*At4g04760* et d'*At4g04750* n'est pas affectée par le traitement foliaire à l'ABA (figures 77 A et B).
- L'expression relative d'*At1g08890* ne semble pas affectée par un traitement foliaire à l'ABA, au vu des écarts types importants représentant des valeurs d'expression hétérogènes pour les 3 répétitions biologiques (figure 77 C). L'expression d'*At1g08900* ne semble pas particulièrement affectée par un traitement à l'ABA mais, le niveau moyen d'expression de ce gène semble réprimé, dans toutes les conditions, dans les 2 premières heures du traitement ABA. En moyenne, cette répression est de 1,7 fois (figure 77 D). Tout comme pour le gène du groupe I *At1g19450*, il est possible ce gène soit réprimé par la lumière.
- L'expression relative d'*At1g08920* est clairement induite, d'un facteur de $5,7 \pm 0,5$, par le traitement foliaire à l'ABA (figures 77 E et 78), dès 2 h de traitement. Cette

	Phase 1	Phase 2	Phase 3	Phase 4		Réhydratées
	TE > 92,2%	92,2% > TE > 90%	90% > TE > 86%	86% > TE > 76%	TE < 76%	TE ????
At1g19450 (B1)		1,7	8,4	7,2	7,2	
At1g75220 (B1)					4,8	
At2g48020 (B2)			3,7	3,7	3,7	
At3g05150 (B3)				10	10	
At5g18840 (B4)						
At1g54730 (B5)				3,9	3,9	
At4g04750 (B6)					6	
At4g04760 (B6)		2	2	2		
At3g20460 (B7)			4,4	30	30	
At1g08890 (B8)		3,75	6,8	9,5	9,5	
At1g08900 (B8)						
At1g08920 (B9)		1,9	2,6	4,1	4,1	
At1g08930 (B9)	1,5	2,3	3,9	1,7	1,7	
At3g05400 (B10)	1,4	1,5				1,5
At3g05160 (B10)						
At5g27350 (B11)				2,9	2,9	
At5g27360 (B11)						

Figure 79 : bilan de l'expression des 17 *AtERD6-like* analysés chez les plantes non arrosées et réhydratées en comparaison avec l'expression de ces gènes chez les plantes arrosées. Les cases de couleur verte représentent une répression par rapport à la valeur d'expression relative chez les plantes arrosées, les cases de couleur rouge représentent une induction par rapport à la valeur d'expression relative chez les plantes arrosées et les cases restées grisées représentent une valeur d'expression relative semblable à la valeur calculée pour les plantes arrosées. Les gènes dont le nom est inscrit en violet appartiennent au groupe I, ceux dont le nom est inscrit en vert appartiennent au groupe IIa et ceux dont le nom est inscrit en rouge appartiennent au groupe IIb.



induction est maintenue au moins pendant les 8 heures qui suivent le traitement. L'expression relative d'*At1g08930* n'est pas régulée par le traitement foliaire à l'ABA (figure 77 F). En revanche, nous pouvons observer une répression de son niveau d'expression relative chez les plantes non pulvérisées et les plantes pulvérisées à l'ABA à partir de 2 h après le traitement, par rapport à la condition témoin T0. Cette répression est en moyenne de $2,5 \pm 1,0$ fois ; elle n'est pas observée chez les plantes pulvérisées au DMSO. A l'image des gènes *At1g19450* et *At1g08900*, l'expression du gène *At1g08930* n'est pas régulée par l'ABA mais pourrait être réprimé par la lumière.

4.4 Discussion

La figure 79 présente un bilan des données d'expression des 17 *ERD6-like* étudiés pour les plantes non arrosées pendant les 4 phases de la carence en eau et pour les plantes réhydratées. La figure 80 intègre ces données d'expression au bilan précédemment établi à partir des données de mesures physiologiques. Ces illustrations donnent une vision globale de la réponse des *ERD6-like* à la carence en eau dans les conditions de notre étude.

Au final, 12 *ERD6-like* sur les 17 analysés répondent à la carence en eau dans les conditions de cette étude (figure 79). Les 5 qui ne répondent pas à la carence en eau sont *At5g18840* (groupe IIa), *At1g08900* (groupe IIb), *At1g05160* (groupe IIb), *At5g27360* (groupe IIb) et potentiellement *At1g05400* (groupe IIb). Pour ce dernier, l'induction reste incertaine à cause du niveau d'expression très bas et des facteurs d'induction peu élevés (1,4 et 1,5 fois).

La première étude des *ERD6-like* chez les plantes avait mis en exergue l'induction d'*At1g08930* dans les feuilles d'*A. thaliana* lors d'un stress hydrique (Kiyosue et al. 1998), et ce, de manière précoce après le début du déficit hydrique. Cette induction a été confirmée par deux autres études lors d'analyses d'expression par Microarray, Northern blot et RT-qPCR (Seki et al. 2002 ; Yamada et al. 2010). Dans tous les cas, l'induction, a été précoce et visible dès 1 à 2 heures après le début de la déshydratation. Les modes de cultures de ces 3 études étaient très différents des nôtres. Dans l'étude de Seki et ses collaborateurs (2002), les plantes étaient cultivées sur milieu gélosé et la déshydratation a été effectuée en retirant les plantules de ce milieu constitué à plus de 90 % d'eau. Il en est de même pour l'étude de Yamada et ses collaborateurs (2010) qui ont cultivé les plantes sur milieu gélosé avec 3 % de saccharose et les ont transférés dans un milieu liquide en hydroponie juste avant de les laisser sécher sur un parafilm pour induire une déshydratation.

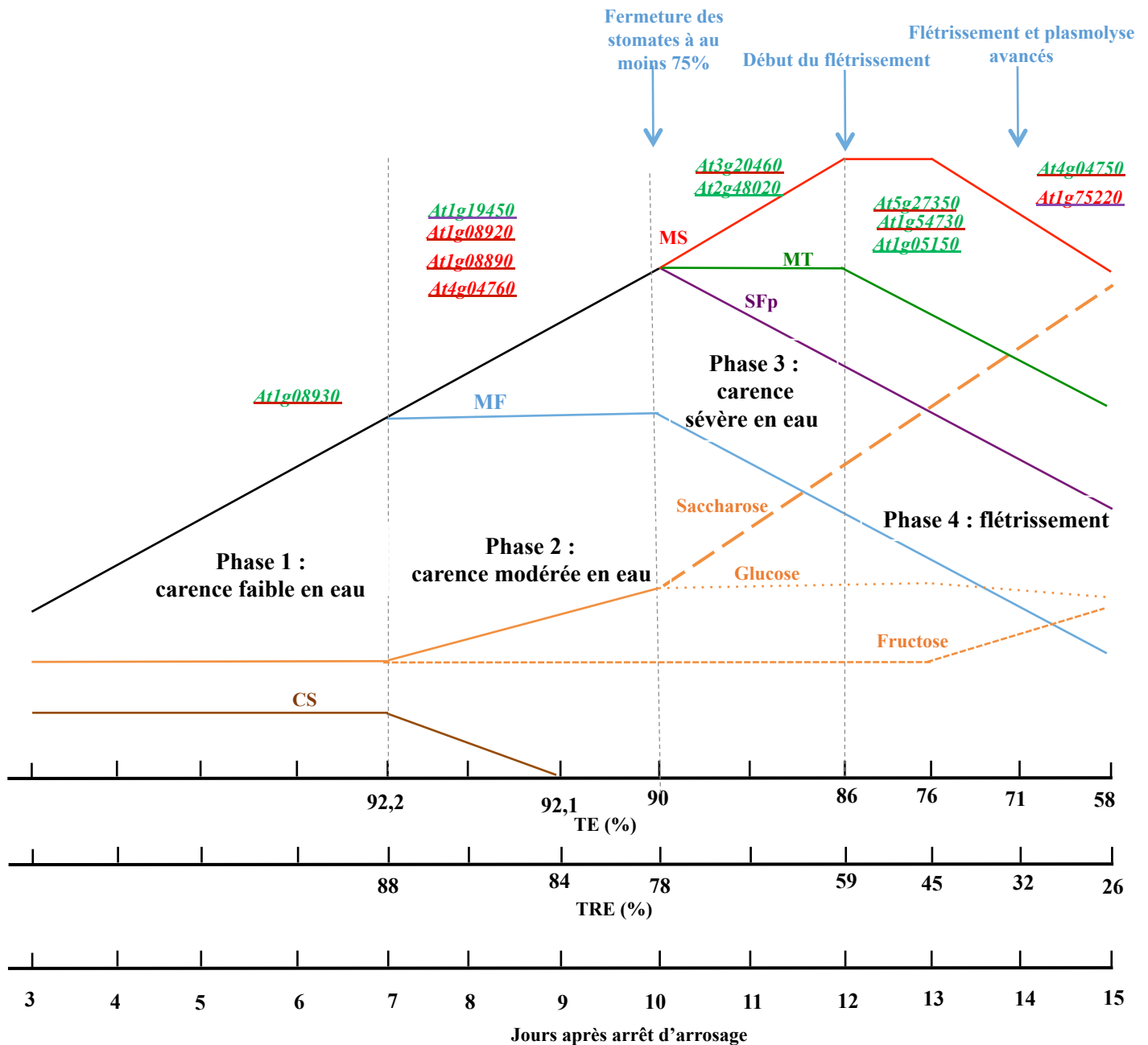


Figure 80 : bilan des réponses à la carence en eau dans les feuilles d'*Arabidopsis thaliana* soumise à une carence en eau par arrêt d'arrosage. Le schéma est à l'échelle des jours : 1 graduation équivaut à 1 jour. La ligne noire représente la surface foliaire projetée (SFp), la masse fraîche (MF), la masse turgide (MT) et la masse sèche (MS) qui augmentent toutes jusqu'à un certain seuil de carence en eau. La ligne pleine orange représente la teneur en glucose, fructose et saccharose jusqu'à une TE de 92,2 %, puis la teneur en glucose et saccharose. En violet la SFp, en bleu la MF, en vert la MT, en rouge la MS, en marron la conductance somatique (CS), en orange pointillés glucose, fructose et saccharose respectivement des pointillés les plus courts aux plus longs. Chaque phase de carence en eau est délimitée par un ligne verticale pointillée. Les *AtERD6-like* induits (rouge) et réprimés (verts) dans chacune des 4 phases de carence en eau sont soulignés d'un trait représentant la couleur du groupe phylogénétique auquel ils appartiennent (violet, groupe I ; vert, groupe IIa ; rouge, groupe IIb). La première flèche bleue (la plus à gauche) indique le moment où une très importante diminution de la CS a été enregistrée pour les plantes non arrosées, se traduisant par la fermeture des stomates. La seconde flèche bleue indique le début du flétrissement pouvant être observé sur les photographies des rosettes. La troisième flèche bleue indique l'observation d'un fort flétrissement visible sur les photographies des rosettes et concomitant à des observations microscopiques suggérant une plasmolyse avancée des cellules, pouvant refléter la mort de beaucoup d'entre elles.

Dans le cadre des analyses effectuées au cours de ce travail, il est impossible d'observer une réponse au déficit hydrique aussi rapide, et pour cause, les plantes ont été cultivées sur terreau et le stress hydrique a été imposé par arrêt d'arrosage. Le potentiel hydrique du substrat n'a logiquement pas encore suffisamment diminué pour induire une réponse des plantes au déficit hydrique en 2 heures. Nos résultats révèlent qu'*AtERD6* (*At1g08930* ; groupe IIb) pourrait être un gène de réponse précoce à la carence en eau, puisqu'il est réprimé dès la phase 1 chez les plantes non arrosées c'est-à-dire alors qu'aucun paramètre physiologique et de croissance ne montre de différence significative avec les plantes arrosées (figure 80). Le fait que nous ayons constaté une répression précoce d'*AtERD6* dans cette étude et non pas une induction précoce, comme cela a été décrit (Kiyosue et al. 1998, Seki et al. 2002, Yamada et al. 2010) pourrait être dû, encore une fois, à la méthode de culture utilisée. Dans nos conditions de culture, sa répression pourrait participer à une réponse précoce à un arrêt d'arrosage d'une semaine et permettrait donc aux plantes de maintenir une croissance et un métabolisme identique aux plantes arrosées régulièrement. Puisqu'*At1g08930* est fortement exprimé dans tous les organes, y compris dans les racines (figure 37) et plus spécifiquement au niveau du rhizoderme (Yamada et al. 2010), on peut imaginer que le transporteur *At1g08930* (*AtERD6*) pourrait avoir un rôle de perception du signal précoce (pression membranaire, contenu en solutés à activité osmotique, turgescence, autres ...) de la diminution du potentiel hydrique au niveau des racines. La perception de ce signal au niveau racinaire pourrait entraîner *via* des signaux à longue distance (ABA, ROS, réseaux transcriptionnels, etc.) une répression de son expression dans les feuilles, en réponse à une faible diminution du potentiel hydrique n'ayant pas de répercussion physiologique pour la plante.

Pendant la phase 2, qualifiée de phase de carence en eau modérée, *At1g19450* (groupe I) est réprimé alors qu'*At4g04760*, *At1g08890* et *At1g08920* (groupe IIb) sont induits. Ces réponses peuvent être considérées comme plutôt rapides car la TE chute de moins de 2 % par rapport aux plantes arrosées, la CS diminue progressivement mais n'est pas encore fortement réduite, et la croissance n'est pas encore perceptiblement réduite. Les pertes d'eau dans les feuilles sont modérées. Notre étude corrobore l'induction d'*AtESL1* (*At1g08920*) par le stress hydrique dans les feuilles d'*A. thaliana* (Yamada et al. 2010). Bien que les données de Yamada et al. (2010) soient obtenues dans des conditions de déshydratation assez drastiques de jeunes plantules, nos résultats montrent aussi qu'*AtESL1* répond à la carence en eau un peu plus tard qu'*AtERD6*, mais pas dans un laps de temps aussi court que ce qui a été proposé (5 à 10 h après le début de la déshydratation pour *AtESL1*). Durant la phase 2 (carence en eau

modérée), la MF stagne, la teneur en saccharose augmente ainsi que la teneur en glucose, mais, la conductance stomatique diminue fortement et rapidement. Or, l'induction de la fermeture des stomates est contrôlée par des cascades de signalisation impliquant l'hormone Acide abscissique (ABA), hormone pouvant également jouer un rôle dans la réponse de certains gènes à des stimuli environnementaux par l'activation de facteurs de transcription spécifiques (Wilkinson and Davis 2002 ; Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki 2007). En effet, *At1g08920*, *AtERD6-like* est également induit par le traitement foliaire à l'ABA 750 μM (figure 78) comme par des concentrations plus faibles en ABA (100 μM , Kiyosue et al. 1998). Ceci est également confirmé par les données d'expression issues de Genevestigator. De ce fait, l'ABA pourrait jouer un rôle direct dans l'induction de ce gène lors de la carence en eau. En effet, il a été montré que bon nombre de gènes sont régulés lors d'une carence en eau, par une voie dépendante de l'ABA (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki 2007 ; Seki et al. 2002; Rabbani et al. 2003).

Pendant la phase 3 de carence sévère en eau, les gènes *At2g48020* (groupe IIa) et *At3g20460* (groupe IIb) sont réprimés.

Dès le début de la phase 4 alors que la TE dans les rosettes se situe entre 86% et 76%, soit une phase pouvant être assimilée au début du flétrissement, *At1g05150* (groupe IIa), *At1g54730*, et *At5g27350* (groupe IIb) sont réprimés. La réponse de ces gènes est donc tardive et arrive en phase de flétrissement avancé (même plasmolyse). Tous les paramètres physiologiques chutent à l'exception de la MS, ainsi que de la teneur en glucose qui n'augmente plus et la teneur en saccharose qui augmente. *At1g27350* (*AtSFPI*) a été décrit comme induit par la sénescence dans des feuilles flétries d'*A.thaliana* et ce, dès le début de la dégradation des chlorophylles (Lohman et al. 1994; Quirino et al. 2001). Si *AtSFPI* dans nos conditions est réprimé en phase 4 (flétrissement), nous pouvons proposer que : i) le processus de sénescence associé au stress hydrique sévère est enclenché dans les feuilles les plus matures uniquement, ce qui attribuerait la répression de *AtSFPI* en début de phase 4 à une conséquence directe de la carence en eau ; ii) les conditions de culture et la différence d'âge des plantes par rapport à l'étude de Lohman et al. (1994) entraîne une différence de réponse de *AtSFPI*, bien que dans notre étude, aucune mesure de photosynthèse n'ait été effectuée, nous pouvons supposer que la dégradation de la chlorophylle survient dès le début de la phase 4, qui pourrait alors être représentative du début de la sénescence. Etant donné que les deux études d'expression retrouvées dans la base de données Genevestigator suggèrent que l'ABA induit l'expression du gène *AtSFPI* dans les feuilles et les germinations, il est intrigant de le retrouver, dans nos conditions, réprimé par le déficit hydrique dans une phase de flétrissement

avancé caractérisée par la fermeture des stomates. Nous pouvons spéculer que le maintien de la fermeture des stomates et le blocage de leur réouverture par la signalisation activée de l'ABA dans cette phase de sénescence impose la répression de *AtSFPI*. L'accumulation d'ABA dans les cellules de garde n'induit manifestement pas l'expression de *AtSFPI* dans les feuilles d'*A. thaliana*. Peut-être est-ce la localisation de l'ABA accumulé qui est importante pour l'induction de *AtSFPI*.

En fin de phase 4 de flétrissement avancé irréversible, voire de mort cellulaire, quand la TE est inférieure à 76% et que tous les paramètres chutent sauf les teneurs en saccharose et en fructose qui augmentent, *At1g75220* (groupe I) est induit et *At4g04750* (groupe IIb) est réprimé. Ces deux gènes sont donc probablement plus régulés par le flétrissement causé par la carence sévère en eau. *At1g75220* (*AtERDL6*) est induit lors de processus d'export de glucose depuis la vacuole vers le cytosol afin de palier la forte demande énergétique (Poschet et al. 2011). En fin de phase 4, lorsque la TE est inférieure à 76%, les feuilles matures sont probablement sénescents ce qui pourrait induire la remobilisation des sucres au sein de la plante, afin de permettre la redistribution des ressources carbonées vers les organes puits (jeunes feuilles et racines). Si *AtERDL6* est induit en fin de phase 4 de carence en eau, alors il est possible qu'il soit en partie responsable de l'export de glucose de la vacuole, puisqu'il a été caractérisé en tant que symporteur H⁺/glucose responsable de l'export de glucose vers le cytosol (Klemens et al., 2013).

Un résultat marquant de cette partie de la thèse concerne le fait qu'aucun gène dupliqué ne répond à la carence hydrique de la même manière que sa copie en tandem (figure 79). *At1g19450* est réprimé à partir de la phase 2 alors qu'*At1g75220* est induit à la fin de la phase 4 (TE < 76%). *At4g04750* est réprimé en fin de phase 4 (TE < 76%) tandis qu'*At4g04760* est induit en phase 2 (92,2% > TE > 90%). *At1g08890* est induit en phase 2 (92,2% > TE > 90%) tandis qu'*At1g08900* n'est pas régulé par la carence en eau. *At1g08920* est induit à partir de la phase 2 (92,2% > TE > 90%) tandis qu'*At1g08930* est réprimé par la carence en eau dès la phase 1. *At5g27350* est réprimé en phase 4 (TE < 86%) tandis qu'*At5g27360* n'est pas régulé par la carence en eau. Ces réponses différentielles à la carence en eau, chez des gènes dupliqués en tandem ou issus de duplications segmentales, traduisent des rôles potentiels distincts dans la réponse au stress hydrique. L'analyse de l'effet de certaines contraintes environnementales sur l'expression des *AtERD6-like* sur la base de données Genevestigator a montré que les *ERD6-like* dupliqués en tandem sont régulés par des stress différents ou même par le même stress mais dans le sens inverse et cela corrobore nos résultats et montre bien que les *ERD6-like* dupliqués en tandem présentent potentiellement des fonctions différentielles,

acquises lors de la phase de détermination (Innan and Kondrashov 2010) des copies dupliquées, et préservées ensuite, notamment dans le genre *Arabidopsis*, par sélection purifiante.

Ces résultats suggèrent également que l'expression des gènes *Atlg19450*, *Atlg08930* (*AtERD6*) et *Atlg08890* pourraient être réprimée par la lumière ou dépendante du rythme circadien. Cela a déjà été démontré pour de nombreux gènes, chez les procaryotes et les eucaryotes (Quail 1991; Wang and Tobin 1998). Les données issues de Genevestigor montrent également un lien entre l'obscurité et l'induction d'*Atlg08930* (*ERD6*). De ce fait, ce gène pourrait parfaitement être induit lors du passage de l'obscurité à la lumière, et réprimé lors du passage de l'obscurité à la lumière, comme dans nos conditions.

5 Etude du comportement de 3 mutants d'insertions *aterd6*-like vis-à-vis de la carence en eau, dans les feuilles d'*A. thaliana*

5.1 Identification de lignées mutantes d'Arabidopsis thaliana pour les gènes AtERD6-like induits lors de la carence hydrique

Dans la partie précédente, il a été démontré que l'expression de quatre *AtERD6-like* (*Atlg75220*, *At4g04760*, *Atlg08890* et *Atlg08920*) est induite lors d'une carence en eau. Pour essayer de définir le rôle de ces 4 gènes, dans la réponse de la plante à la carence hydrique, une approche de génétique fonctionnelle à l'aide de lignées mutantes d'*Arabidopsis* a été choisie. Des lignées d'insertion T-DNA, fournies par le NASC, ont été criblées pour déterminer leur homozygotie au niveau de l'insertion T-DNA dans le gène *AtERD6-like* d'intérêt. La méthode de criblage des mutants homozygotes pour l'insertion est détaillée dans la partie Matériels et Méthodes. Ce criblage a permis d'identifier une lignée mutante homozygote pour les gènes *Atlg75220*, *Atlg04760* et *Atlg08920* mais aucune pour le gène *Atlg08890* qui est, cependant, le gène le plus fortement induit par la carence en eau. Par conséquent, les analyses moléculaires et physiologiques présentées ci-dessous ont été restreintes aux trois mutants d'insertion : *atlg75220*, *at4g04760* et *atlg08920*. Ces trois mutants permettent donc d'étudier le rôle de deux gènes induits progressivement à partir de la phase 2 (*Atlg04760* et *Atlg08920*) de la carence hydrique et d'un gène (*Atlg75220*) induit tardivement en fin de phase 4.

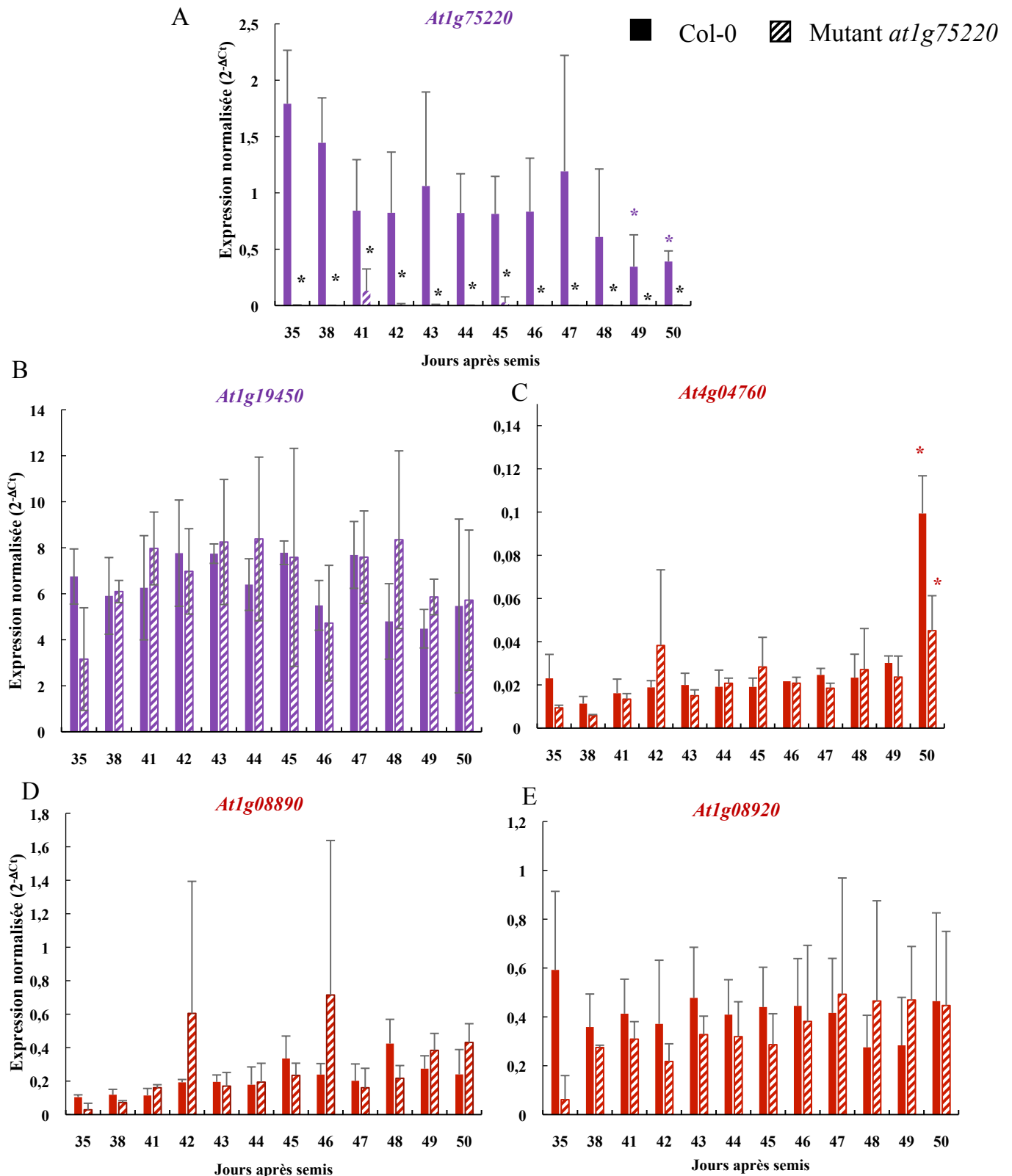


Figure 81 : expression relative de 5 ERD6-like chez le mutant *at1g75220* chez les plantes arrosées de 35 à 50 jours après semis et comparaison avec Col-0. En violet : groupe I ; en rouge : groupe IIb. Les valeurs représentées sont les valeurs d'expression normalisée par rapport à *AtPP2a*. Chaque valeur représente la moyenne de 3 répétitions biologiques (\pm écart-type). Des tests de Kruskal Wallis ont été effectués suivis de test de comparaisons multiples de Dunn. Les valeurs statistiquement différentes sont marquées par des astérisques (p.value < 0,05). Un astérisque de couleur représente une valeur significativement différente des autres valeurs mesurée sur la cinétique pour le génotype en question. Un astérisque noire représente une valeur différente chez le mutant par rapport à la valeur calculée pour le sauvage Col-0. Les barres pleines représentent Col-0 et les barres hachurées le mutant *at1g75220*.

5.2 Comparaison de l'expression des gènes *AtERD6-like* dans les feuilles des 3 mutants *aterd6-like* avec celle de l'écotype sauvage *Col-0* en condition normale d'arrosage

Pour déterminer si le niveau d'expression relative des 4 gènes *AtERD6-like* induits par la carence en eau (*At1g75220*, *At4g04760*, *At1g08890* et *At1g08920*) sont modifiés dans les feuilles des 3 mutants en condition normale d'arrosage, entre 35 et 50 jours après semis, l'expression relative de ces gènes, dans chacun des mutants, a été comparée avec celle mesurée dans les plantes *Col0* en condition normale d'arrosage. De plus, l'expression de leurs copies dupliquées en tandem (*At1g19450*, *At4g04750*, *At1g08900* et *At1g08930*) a été mesurée afin de déterminer si l'expression de ces copies pouvaient être induite pour compenser la perte d'expression des gènes cibles.

Dans le mutant *at1g75220*, l'expression du gène *At1g75220* est presque indétectable en comparaison avec *Col0* quel que soit le stade de développement. A 35 jours après semis, le niveau d'expression relative d'*At1g75220* pour *Col-0* est de $1,79 \pm 0,47$ contre $0,004 \pm 0,004$ pour le mutant. Ce qui traduit une répression de 99,77%. Le pourcentage d'inhibition de l'expression est de 95 % à 50 jours. Ainsi, une indéniable répression du niveau d'expression du gène muté est constatée dans le mutant quel que soit le stade de développement. Ce niveau d'expression relative étant presque nul, il est possible de considérer ce mutant comme un mutant knock-out (KO) (figure 81 A). L'expression du gène *At1g19450* (issu d'une duplication segmentale) ne varie pas entre 35 et 50 jours après semis, dans les feuilles des plantes arrosées (valeur moyenne de $6,89 \pm 2,49$, figure 81 B) et aucun changement par rapport à *Col0* n'est observable. Le gène *At4g04760* (figure 81 C), tout comme pour *Col-0*, est significativement plus exprimé 50 jours après semis que pendant tout le reste de la cinétique. En effet, le niveau d'expression relative est de $0,02 \pm 0,01$ de 35 à 49 jours après semis et de $0,05 \pm 0,01$ à 50 jours après semis, ce qui représente une augmentation de 2,5 fois. Néanmoins, tout comme cela avait été observé pour *Col-0*, le niveau d'expression relative d'*At4g04760* reste faible dans les feuilles de 35 à 50 jours après semis. Le niveau d'expression relative des gènes *At1g08890* ($0,29 \pm 0,36$) et *At1g08920* ($0,34 \pm 0,21$) est constant entre 35 à 50 jours après semis dans le mutant *at1g75220* arrosé (figures 81 D et E).

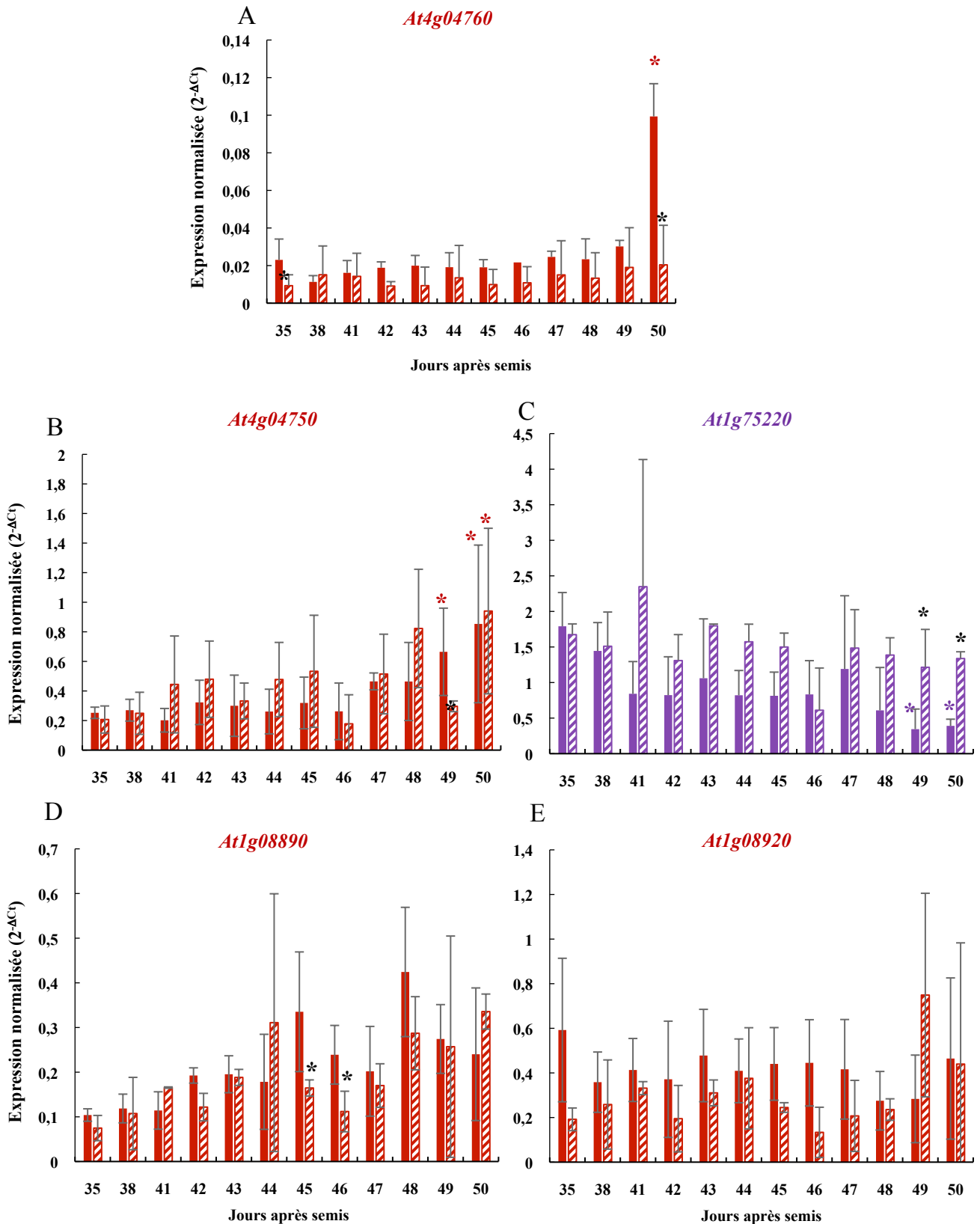


Figure 82 : expression relative de 5 ERD6-like chez le mutant *at4g04760* chez les plantes arrosées de 35 à 50 jours après semis et comparaison avec Col-0. En violet : groupe I ; en rouge : groupe IIb. Les valeurs représentées sont les valeurs d'expression normalisée par rapport à *AtPP2a*. Chaque valeur représente la moyenne de 3 répétitions biologiques (\pm écart-type). Des tests de Kruskal Wallis ont été effectués suivis de test de comparaisons multiples de Dunn. Les valeurs statistiquement différentes sont marquées par des astérisques (p .value < 0,05). Un astérisque de couleur représente une valeur significativement différente des autres valeurs mesurée sur la cinétique pour le génotype en question. Un astérisque noire représente une valeur différente chez le mutant par rapport à la valeur calculée pour le sauvage Col-0.

Les niveaux d'expression relative de ces deux gènes sont identiques dans le fond génétique mutant *at1g75220* et dans le fond génétique sauvage Col-0.

Pour le mutant *at4g04760*, à 35 jours, le niveau d'expression du gène *At4g04760* est réprimé d'un facteur 2,2 ($0,009 \pm 0,006$) par rapport à Col-0 ($0,023 \pm 0,01$) soit 55 % de répression. Ce pourcentage de répression est maintenu jusqu'à J49. L'expression de ce gène *At4g04760* est réduite en comparaison avec Col0 mais cette réduction est partielle (en moyenne 37 % de réduction du niveau d'expression relative jusqu'à 49 jours après semis). Ce mutant ne peut donc pas être considéré comme un knock-out (figure 82 A). A 50 jours après semis, il n'y a pas d'induction du niveau d'expression d'*At4g04760* chez le mutant *at4g04760* par rapport à Col-0 (figure 82 A) avec une valeur de $0,10 \pm 0,10$ pour Col-0 et $0,02 \pm 0,02$ pour le mutant, soit une réduction d'un facteur 5. Même si le mutant *at4g04760* n'est pas un knock-out, le gène *At4g04760* n'est pas induit à la fin de la cinétique dans les feuilles des plantes arrosées. Le gène *At4g04750* (gène en tandem) est significativement plus exprimé 50 jours après semis (figure 82 B). L'expression du gène *At1g75220* ne varie pas entre 35 et 50 jours après semis, dans les feuilles des plantes mutantes (valeur moyenne de $1,46 \pm 0,65$, figure 82 C) alors que chez Col-0, son niveau d'expression relative diminue à 49 et 50 jours après semis. Il y a donc une levée de la répression d'*At1g75220* à partir de 49 jours après semis dans les feuilles du mutant *at4g04760* arrosé. Ce qui pourrait traduire une compensation du gène *At4g04760* par *At1g75220* en fin de cinétique. Pour les gènes *At1g08890* et *At1g08920*, les niveaux d'expression relative pour le mutant *at4g04760* arrosés sont stables de 35 à 50 jours après semis (figures 82 D et E). Les niveaux d'expression d'*At1g08890* et d'*At1g08920* sont identiques au niveau d'expression observé pour Col0.

Pour le mutant *at1g08920*, l'expression relative du gène *At1g08920* n'est pas totalement réprimée. A 35 jours, le niveau d'expression est réprimé 5,4 fois dans les feuilles du mutant *at1g08920* ($0,11 \pm 0,02$) par rapport à Col-0 ($0,59 \pm 0,05$) soit une répression de 81,4%. Celle-ci est en moyenne de 70,5% par rapport à Col0 entre 35 et 46 jours après semis. Cependant, à partir de 47 jours, la répression n'est plus visualisée. Ces observations suggèrent que le mutant *at1g08920* n'est pas un mutant knock-out (figure 83 A). L'expression d'*At1g08930* (gène dupliqué en tandem) semble légèrement réduite par rapport à celle observée pour Col-0 mais les écarts types importants ne permettent pas vraiment de montrer des différences significatives (figure 83 B). Le niveau d'expression du gène *At1g75220* n'est pas modifié par rapport à celui observé pour Col-0 entre 35 et 48 jours après semis (valeur moyenne de $1,57 \pm 0,57$, figure 83 C). Cependant la répression observée à 49 et 50 jours après

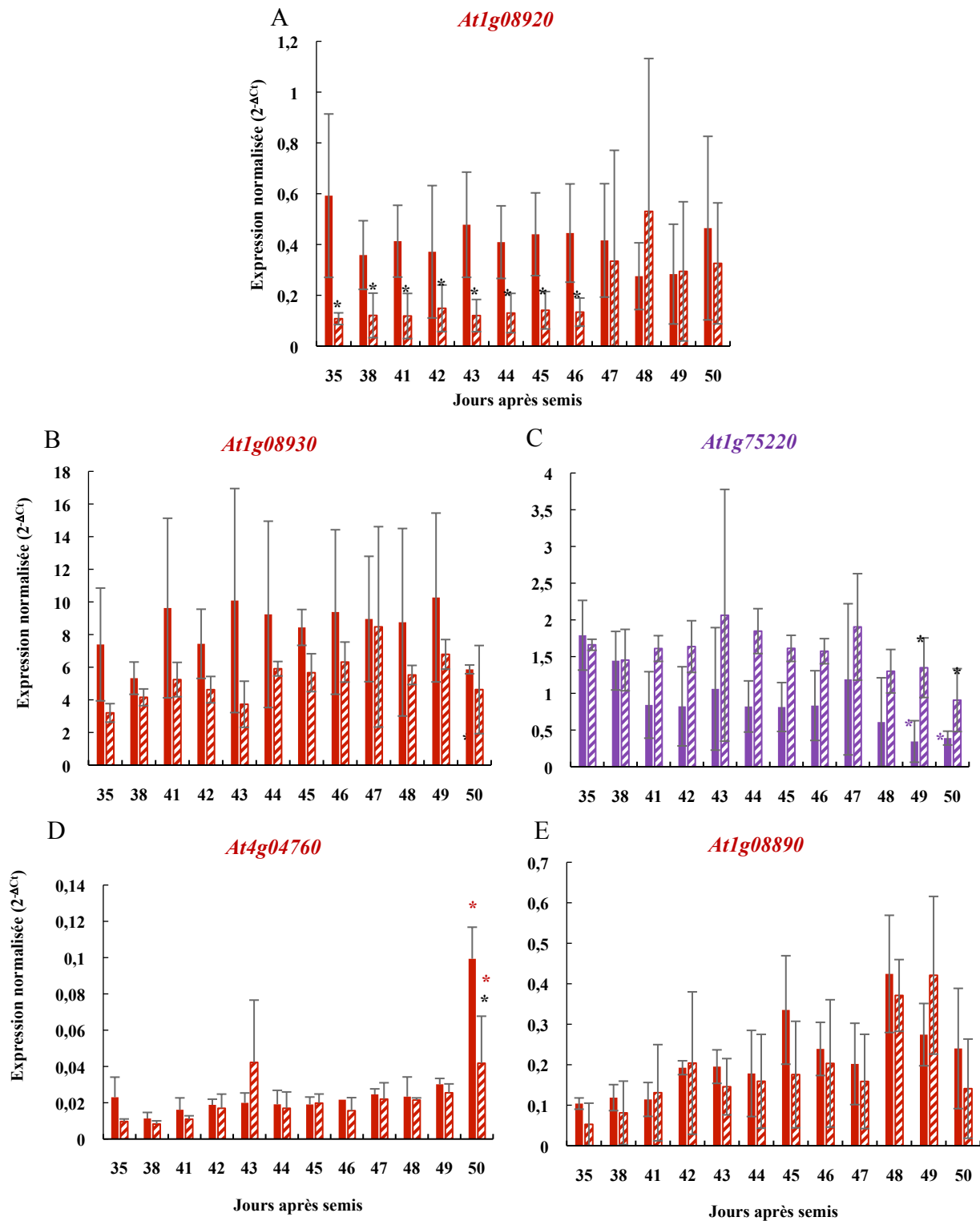


Figure 83 : expression relative de 5 ERD6-like chez le mutant *at1g08920* chez les plantes arrosées de 35 à 50 jours après semis et comparaison avec Col-0. En violet : groupe I ; en rouge : groupe IIb. Les valeurs représentées sont les valeurs d'expression normalisée par rapport à *AtPP2a*. Chaque valeur représente la moyenne de 3 répétitions biologiques (\pm écart-type). Des tests de Kruskal Wallis ont été effectués suivis de test de comparaisons multiples de Dunn. Les valeurs statistiquement différentes sont marquées par des astérisques (p .value < 0,05). Un astérisque de couleur représente une valeur significativement différente des autres valeurs mesurée sur la cinétique pour le génotype en question. Un astérisque noire représente une valeur différente chez le mutant par rapport à la valeur calculée pour le sauvage Col-0.

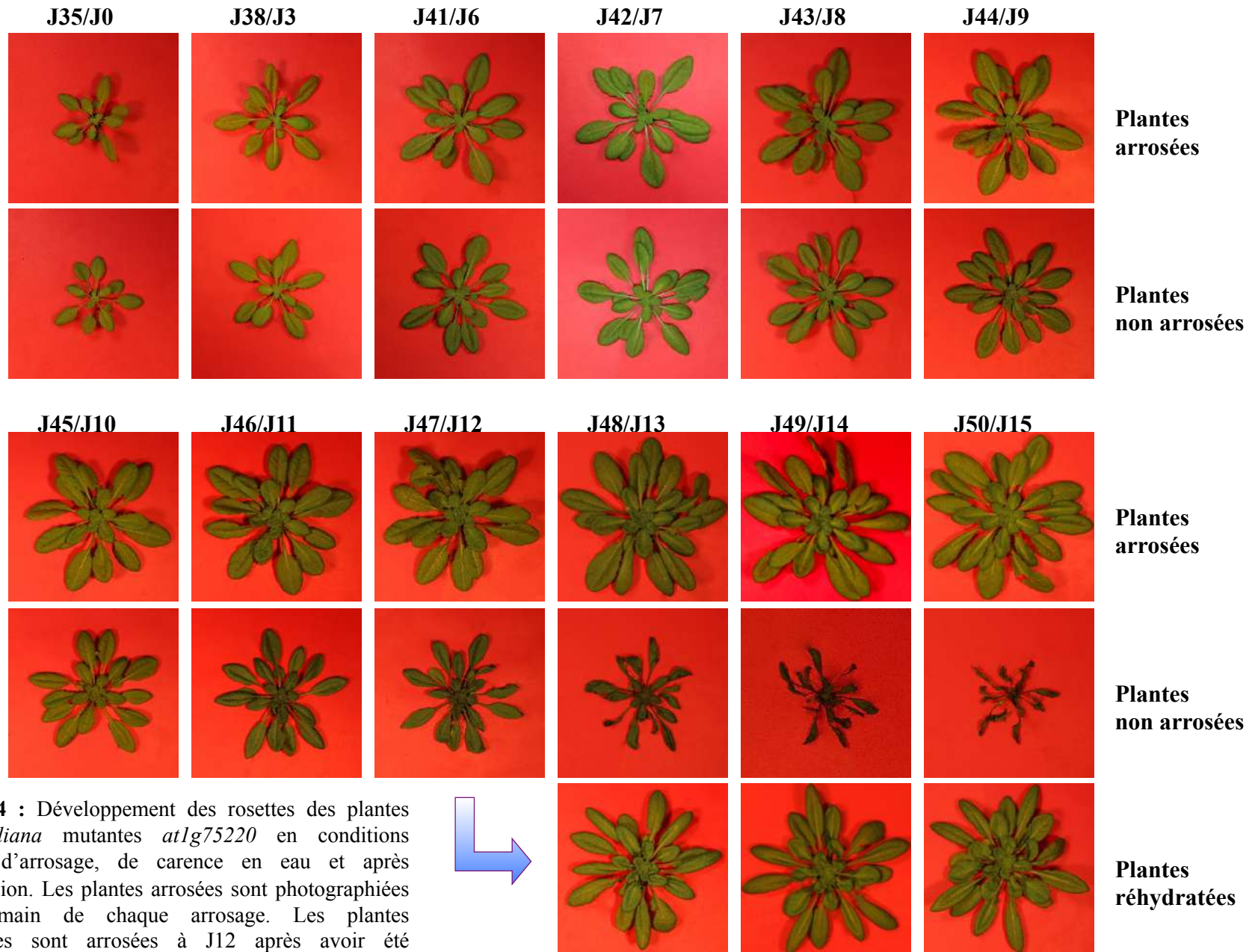
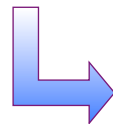


Figure 84 : Développement des rosettes des plantes *d'A. thaliana* mutantes *at1g75220* en conditions normale d'arrosage, de carence en eau et après réhydratation. Les plantes arrosées sont photographiées le lendemain de chaque arrosage. Les plantes réhydratées sont arrosées à J12 après avoir été photographiées. JXX/JXX indique les jours après semis et les jours après arrêt d'arrosage.



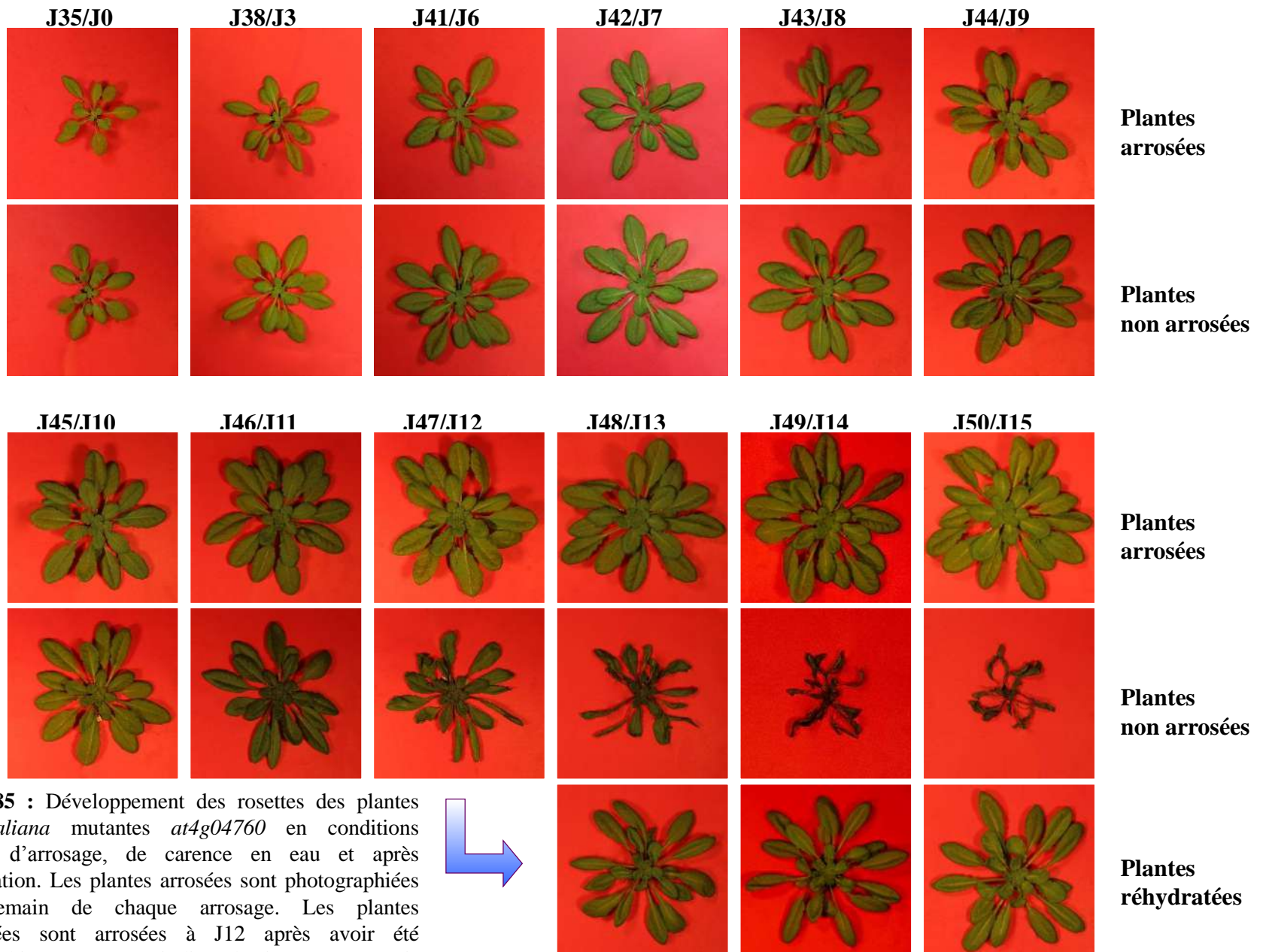
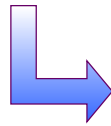


Figure 85 : Développement des rosettes des plantes *d'A. thaliana* mutantes *at4g04760* en conditions normale d'arrosage, de carence en eau et après réhydratation. Les plantes arrosées sont photographiées le lendemain de chaque arrosage. Les plantes réhydratées sont arrosées à J12 après avoir été photographiées. JXX/JXX indique les jours après semis et les jours après arrêt d'arrosage.



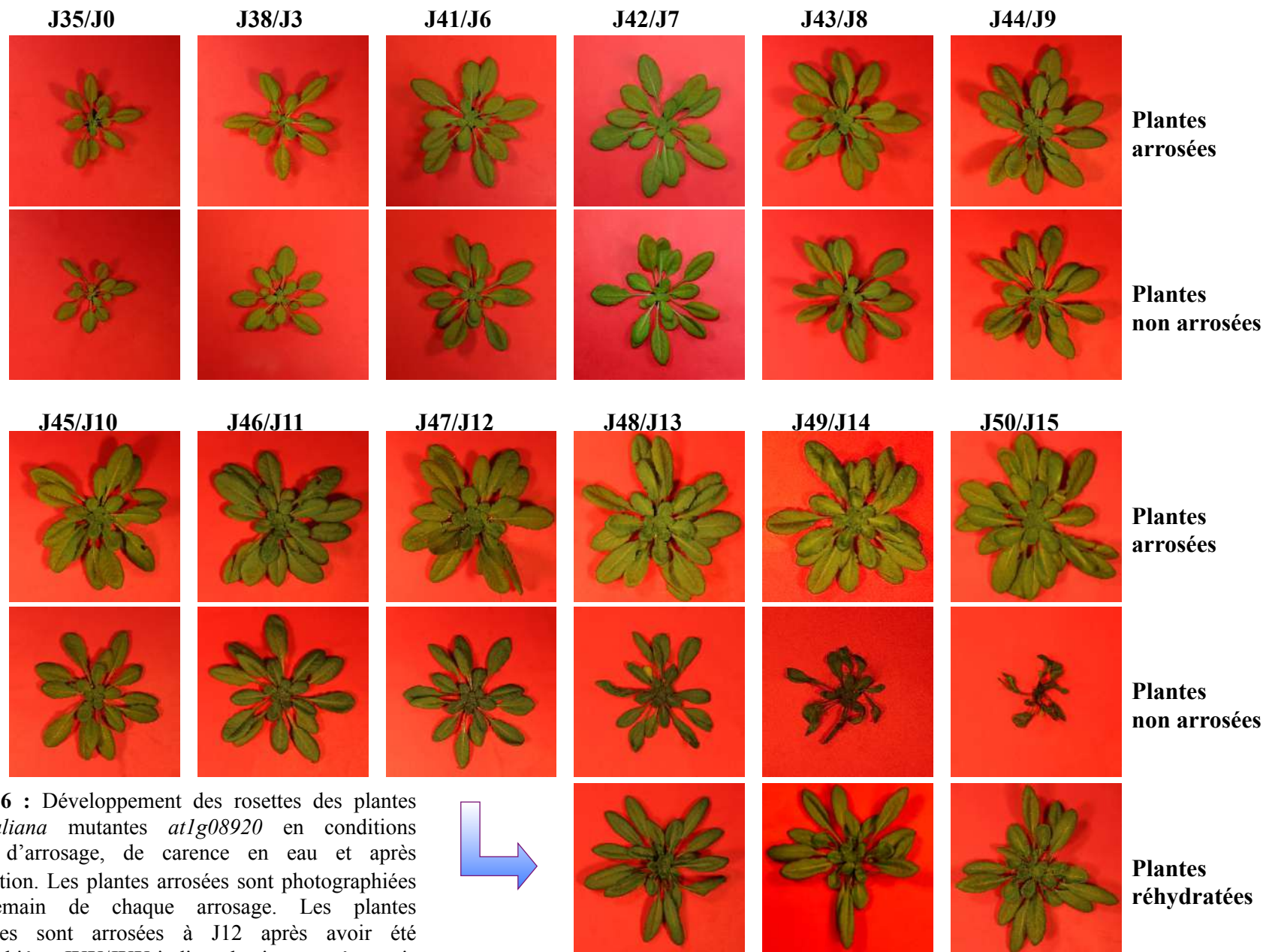
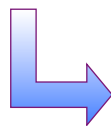


Figure 86 : Développement des rosettes des plantes *d'A. thaliana* mutantes *at1g08920* en conditions normale d'arrosage, de carence en eau et après réhydratation. Les plantes arrosées sont photographiées le lendemain de chaque arrosage. Les plantes réhydratées sont arrosées à J12 après avoir été photographiées. JXX/JXX indique les jours après semis et les jours après arrêt d'arrosage.

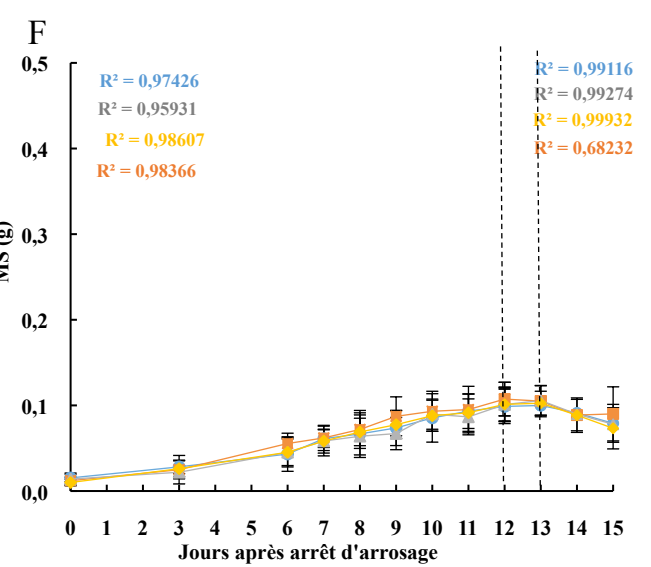
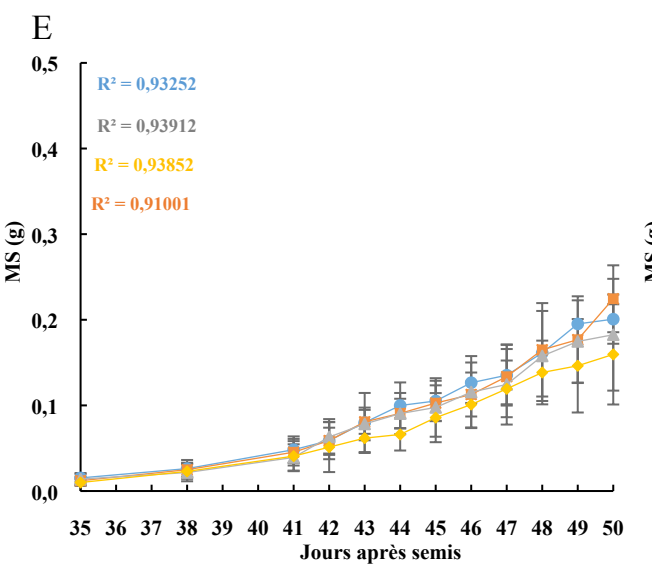
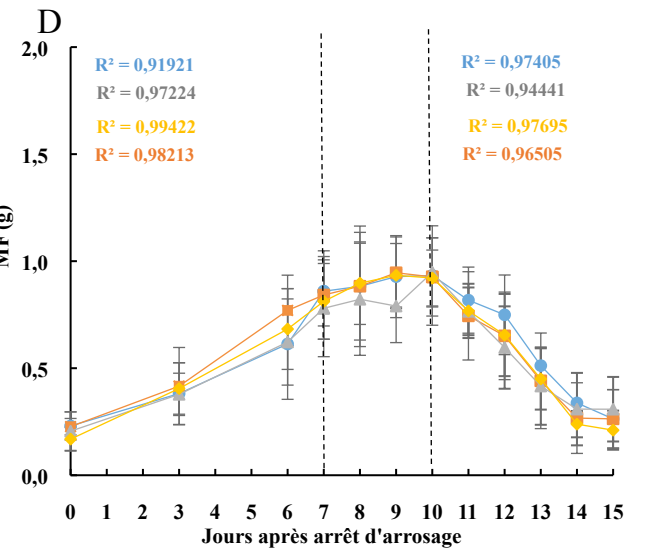
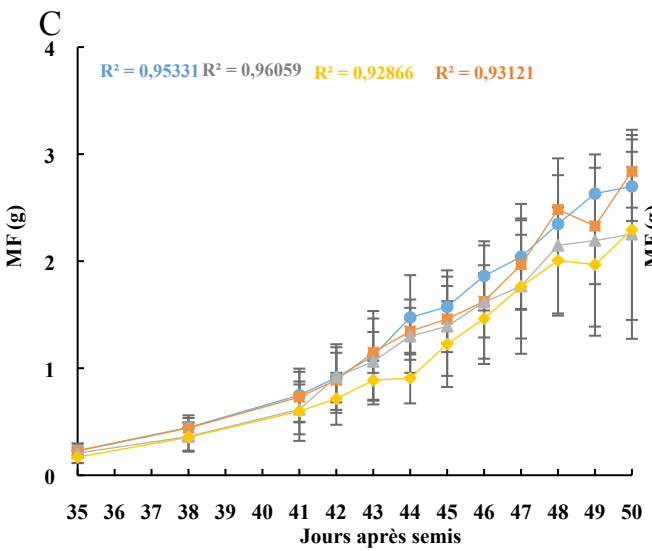
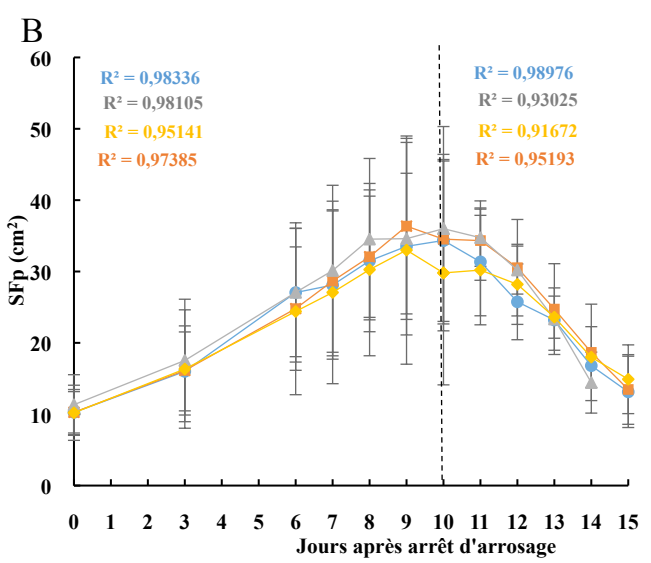
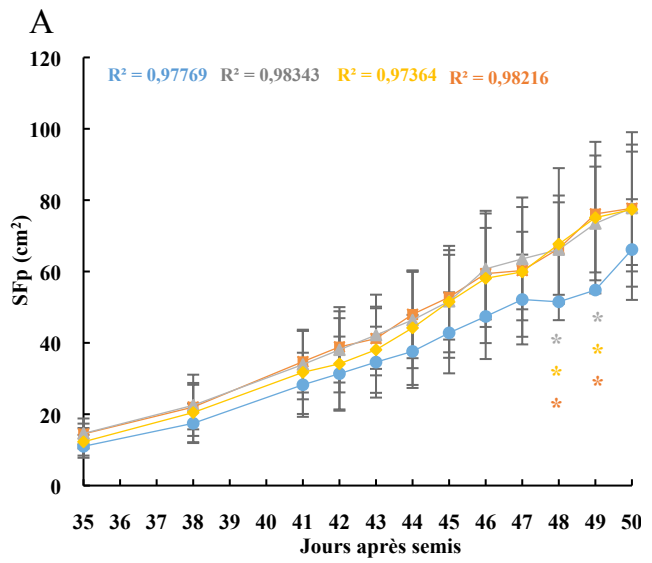


semis pour Col-0 n'est pas visible dans les feuilles du mutant *at1g08920*. Le niveau d'expression du gène *At4g04760* est faible et identique à celui détecté dans Col-0. De plus, la plus forte expression détectée 50 jours après semis dans Col-0 est également retrouvée dans le mutant *at1g08920*. Le niveau d'expression relative est de $0,009 \pm 0,001$ de 35 à 49 jours après semis et de $0,04 \pm 0,03$ 50 jours après semis, soit une augmentation de 4,4 fois (figure 83 D). Toutefois, on note un niveau d'expression plus faible 50 jours après semis dans les feuilles du mutant *at1g08920* par rapport à Col-0. Le niveau d'expression du gène *At1g08890* ne paraît pas être modifié entre 35 et 50 jours après semis dans les feuilles du mutant *at1g08920* par rapport à Col-0 (figure 83 E).

Pour les deux derniers mutants, le pourcentage de répression des gènes d'intérêt paraît faible par rapport à celui qui est observé pour le mutant *at1g75220*. Ceci peut être dû au fait que l'expression de ces deux gènes dans les feuilles de Col-0 est naturellement assez faible. Toutefois, d'une répression par rapport à Col-0 traduit une extinction partielle des 2 gènes étudiés dans les mutants correspondant. Compte-tenu que l'expression des trois gènes est réprimée dans les trois lignées mutantes correspondantes, ces trois lignées ont donc été caractérisées entre 35 et 50 jours après semis dans des conditions normales d'arrosage et de déficit hydrique. Leur comportement physiologique vis-à-vis de leur croissance en condition normale et de leur réponse à la carence en eau a été comparé avec celui de l'écotype sauvage Col-0.

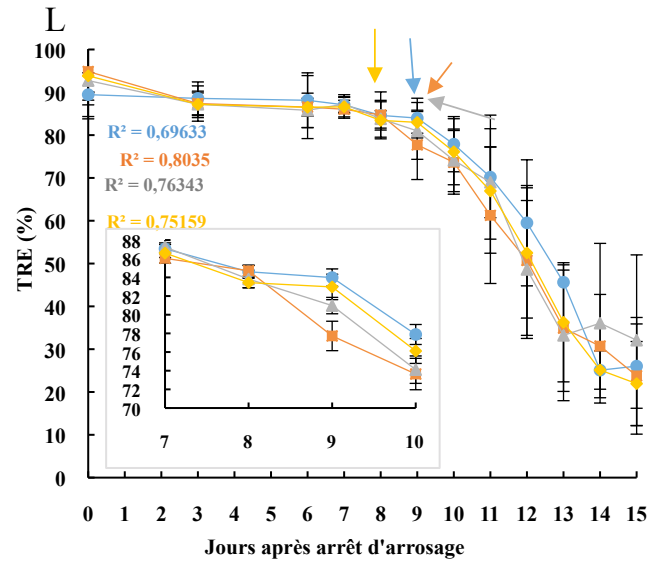
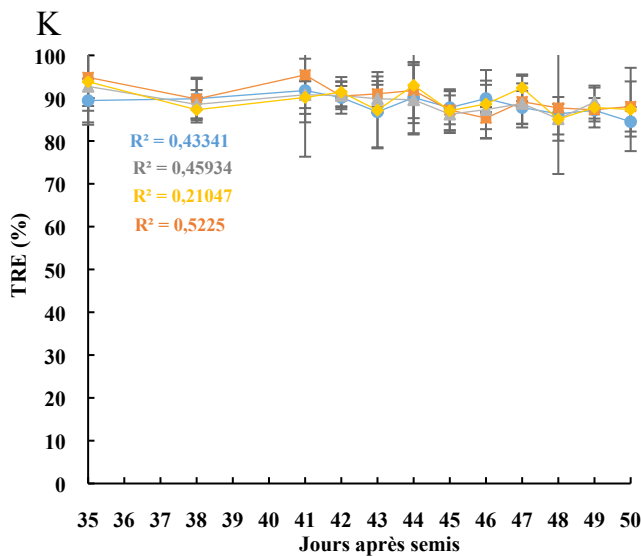
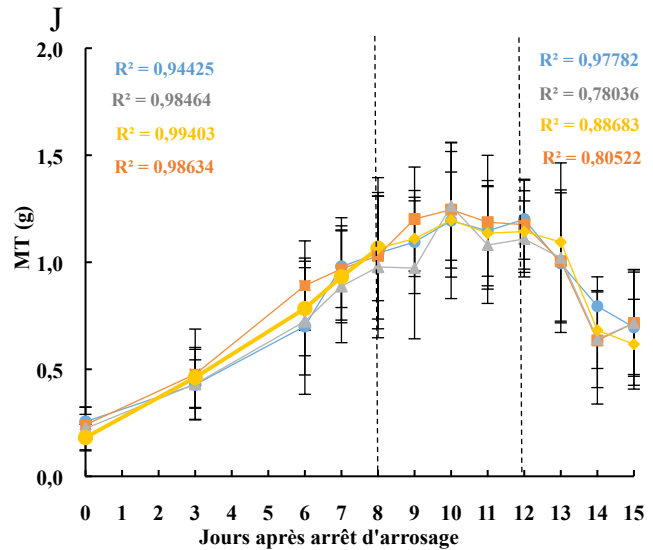
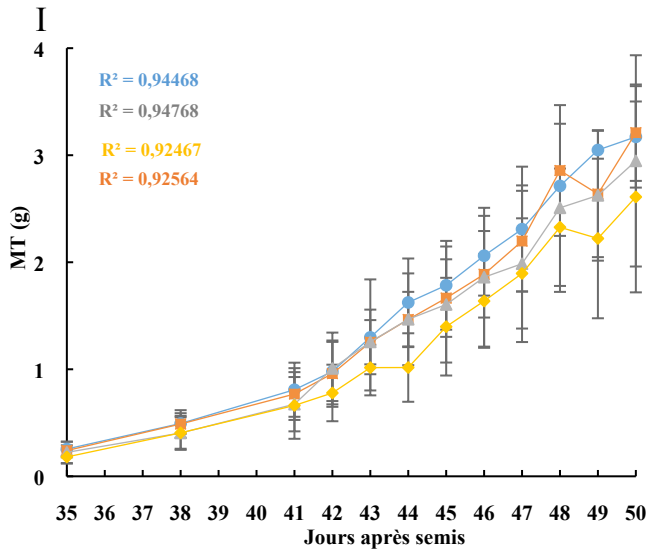
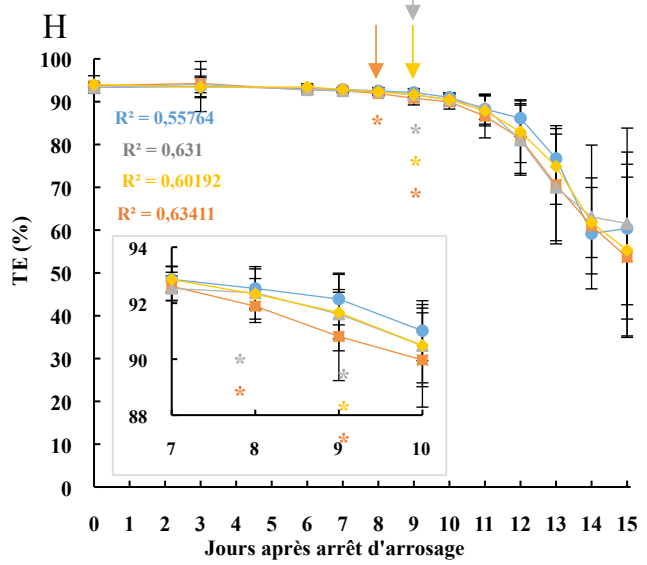
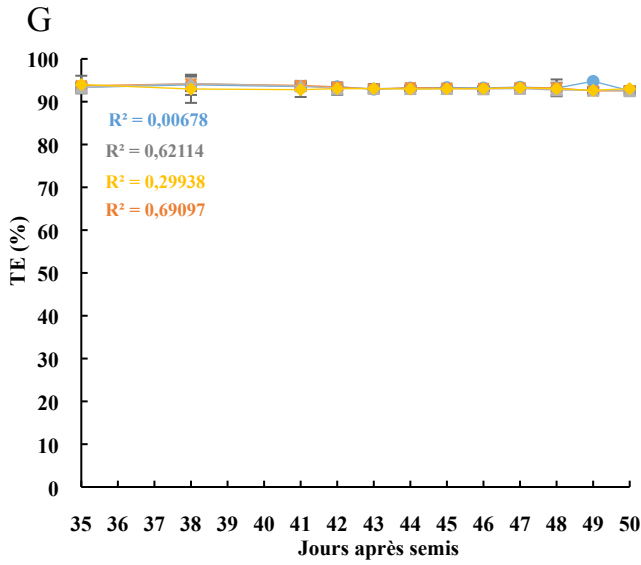
5.3 Comparaison des paramètres physiologiques des 3 mutants *aterd6*-like avec ceux de l'écotype sauvage Col-0 mesurés pour les feuilles en condition normale d'arrosage, de carence en eau et de réhydratation.

Les 3 lignées mutantes ont été cultivées en condition normale d'arrosage et de carence en eau (35 et 50 jours après semis) afin de déterminer d'éventuelles différences de comportement d'un point de vue de la croissance et des paramètres physiologiques étudiées, et de les comparer à la lignée Col-0 cultivée en parallèle pour caractériser et comparer les 3 lignées mutantes à Col-0 en terme de croissance et de paramètre physiologique. Les figures 84, 85 et 86 montrent l'aspect des rosettes des plantes arrosées, non arrosées et réhydratées. Aucune différence phénotypique n'est visible au niveau des rosettes des 3 mutants et de Col-0. En effet, comme observé pour Col-0 (figure 39), les rosettes des 3 mutants *at1g75220* (figure



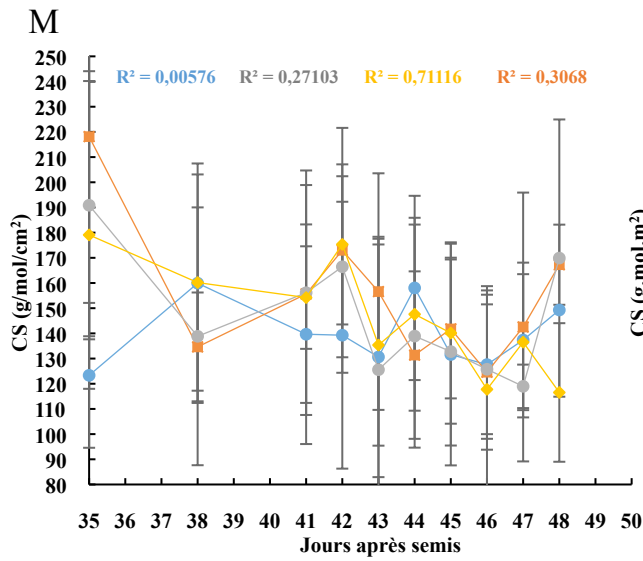
Plantes arrosées

Plantes non arrosées

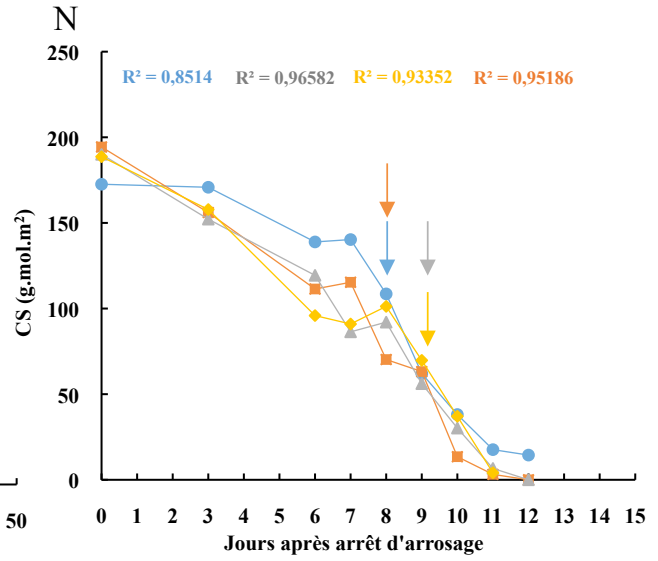


Plantes arrosées

Plantes non arrosées



Plantes arrosées



Plantes non arrosées

Figure 87 : évolution de la surface foliaire projetée (SFp), masse fraîche (MF), masse sèche (MS) et masse turgide (MT), teneur en eau (TE), teneur relative en eau (TRE) et conductance stomatique (CS) chez les plantes arrosées et non arrosées des 4 génotypes comparés (Col-0, *at1g75220*, *at4g04760* et *at1g08920*). Les valeurs représentent la moyenne de 3 répétitions biologiques (\pm écart type). Les astérisques de couleurs différentes représentent les valeurs statistiquement différentes d'un génotype (selon sa couleur), déterminées par des test de Mann Whitney (p .values < 0,5). Les flèches correspondent au début de la chute significative de TE, de TRE et de CS.

84), *at4g04760* (figure 85) et *at1g08920* (figure 86) montrent un arrêt de croissance à partir de J10 chez les plantes non arrosées, un flétrissement à partir de J12 et peuvent être réhydratées par arrosage à J12.

5.3.1 Comparaison de l'évolution de la surface foliaire projetée, de la matière fraîche et de la matière sèche

Pour les plantes arrosées, aucune différence statistique n'est observée entre les 3 mutants *AtERD6-like* et en comparaison avec Col-0 en termes de SFp, de MF et de MS.

La SFp augmente linéairement pour les 4 génotypes avec un R^2 compris entre 0,974 et 0,983 (figure 87 A). La SFp pour Col-0 paraît être plus faible que celle des mutants tout au long de la cinétique. Comme déjà mentionné, en réalité cette différence est due à l'une des répétitions, pour laquelle un retard de croissance pour les plantes Col-0 uniquement a été noté par rapport aux 2 autres cinétiques. Cette constatation est également à prendre en compte pour les points 48 et 49 jours après semis, du fait qu'il n'y ait que 2 répétitions biologiques pour Col-0 pour ces 2 points. La valeur de SFp mesurée pour ceux-ci paraît statistiquement plus faible par rapport à celle des mutants, ce qui est un artefact.

La MF et la MS augmentent linéairement pour les 4 génotypes avec un R^2 compris entre 0,929 et 0,961 pour la MF (figure 87 C) et entre 0,910 et 0,939 (figure 87 E) pour la MS.

Pour les 3 mutants *AtERD6-like*, comme montré précédemment pour Col-0 (figures 40 A, 41 A et 42 A), il existe deux phases de croissance (données non montrées): une phase de 35 à 41 jours après semis et une autre phase de 41 à 50 jours après semis.

Les facteurs d'augmentation de la SFp, de la MF et MS au cours des 15 jours de culture, ainsi que la vitesse d'expansion de la rosette en cm^2/jour (SFp) et en g/jour (MF et MS) ne présentent pas de différences significatives (tableau 18).

Pour les plantes non arrosées, aucune différence statistique n'est observée entre les 3 mutants *AtERD6-like* et en comparaison avec Col-0, en terme de SFp, de MF et MS.

La SFp augmente linéairement de J0 à J10 ($0,951 \leq R^2 \leq 0,983$) puis diminue linéairement de J10 à J15 ($0,917 \leq R^2 \leq 0,990$) (figure 87 B).

La MF augmente linéairement jusqu'à J7 ($0,919 \leq R^2 \leq 0,994$), puis stagne de J7 à J10 et diminue de J10 à J15 ($0,944 \leq R^2 \leq 0,977$) (figure 87 D).

La MS augmente linéairement jusqu'à J12, stagne de J12 à J13 et diminue de J13 à J15 ($0,991 \leq R^2 \leq 0,999$) (figure 87 F). Le mutant *at1g08920*, ne présente pas de diminution linéaire de la MS de J13 à J15 ($R^2 = 0,683$).

Les données en termes de vitesse d'expansion de la surface foliaire (cm^2/jour) et du taux de croissance (g/Jour) ne présentent pas de différences significatives (tableau 18).

L'ensemble de ces résultats montre que les plantes arrosées des 3 génotypes mutants présentent une croissance linéaire des rosettes (SFp, MF et MS) de 35 à 50 jours après semis similaire à celle de Col-0. De plus, en condition de carence en eau, les 4 phases de croissance définies pour Col-0 au cours des 15 jours de cinétique, sont aussi valables pour les 3 mutants *AtERD6-like* (figure 87).

5.3.2 Comparaison de l'évolution de la teneur en eau dans les rosettes

La teneur en eau (TE) dans les rosettes des plantes arrosées est similaire chez les 4 génotypes (figure 87 G) tout au long de la cinétique (mutant *at1g75220* : $93,1 \pm 0,8$ % ; mutant *at4g04760* : $93,1 \pm 1,4$ % ; mutant *at1g08920* : $93,3 \pm 1,0$ % ; Col-0 : $93,3 \pm 1,1$ %). Ainsi, la catégorie de plantes arrosées peut être définie chez les 3 mutants, par une valeur de TE supérieure à 92,2%, comme dans le cas de Col-0. En effet, la part des valeurs de TE inférieures à 92,2% est faible : 10 valeurs sur 180 (5,6%) chez le mutant *at1g75220*, 11 valeurs sur 180 (6,0 %) chez le mutant *at4g04760* et 9 valeurs sur 180 (5%) chez le mutant *at1g08920*.

Chez les plantes non arrosées, le profil d'évolution de la TE dans les rosettes des 4 génotypes au cours des 15 jours de cinétique est similaire (figure 87 H). Cependant, le mutant *at1g08920* a une TE significativement différente de celle de Col-0 à J8, et les 3 mutants ont une TE significativement différente de celle de Col-0 à J9. Or, chez Col-0, c'est entre J8 et J9 que la TE des rosettes des plantes non arrosées devient significativement inférieure à la valeur minimale de référence (92,2%), valeur qui définit la catégorie des plantes arrosées. Des tests de Kruskal-Wallis effectués sur l'ensemble des données, de J0 à J15 pour les 4 génotypes montrent que la TE commence à diminuer significativement à J8 pour le mutant *at1g08920* ($91,9 \pm 0,6\%$) et à J9 pour les mutants *at1g75220* et *at4g04760* ($91,6 \pm 0,9\%$ et $91,7 \pm 1,4\%$) comme pour Col-0 ($92,1 \pm 0,9\%$). Le début de la chute de TE dans les rosettes des plantes non arrosées est indiquée d'une flèche pour chaque génotype dans la figure 87 H. Ces résultats montrent que la diminution de la TE est enclenchée pour les 4 génotypes dès que la

Tableau 18 : comparaison chiffrée de la croissance des plantes arrosées et non arrosées des 4 géotypes d'*Arabidopsis thaliana* étudiés

Paramètre	Traitement		jours	sauvage	mutants		
				Col-0	<i>at1g75220</i>	<i>at4g04760</i>	<i>at1g08290</i>
Surface foliaire projetée	Arrosées	Facteur d'augmentation	39 à 50 j	6,3	5,3	6,3	5,2
		Vitesse d'expansion (cm ² /jour)	après semis	5,0 ± 0,03	5,3 ± 1,3	5,3 ± 1,9	5,3 ± 1,3
	Non arrosées	Facteur d'augmentation	J0 à J10	3,4	2,5	2,4	2,4
		Facteur de réduction	J10 à J15	2,6	3,6	2,6	2
Masse fraîche	Arrosées	Facteur d'augmentation	39 à 50 j	10,4	10,7	13,5	12,3
		Vitesse d'augmentation (g/jour)	après semis	0,20 ± 0,02	0,15 ± 0,02	0,18 ± 0,08	0,23 ± 0,004
	Non arrosées	Facteur d'augmentation	J0 à J7	2,3	3,7	4,8	3,7
		Facteur de réduction	J10 à J15	3,3	3	4,4	3,6
Masse sèche	Arrosées	Facteur d'augmentation	39 à 50 j	13,4	12,9	16	19
		Vitesse d'augmentation (g/jour)	après semis	0,015 ± 0,004	0,013 ± 0,004	0,013 ± 0,006	0,017 ± 0,001
	Non arrosées	Facteur d'augmentation	J0 à J12	6,7	7,2	10,1	8,9
		Facteur de réduction	J13 à J15	1,26	1,4	1,4	1,2
Masse turgide	Arrosées	Facteur d'augmentation	39 à 50 j	12,2	13,4	14,5	13,4
		Vitesse d'augmentation (g/jour)	après semis	0,24 ± 0,03	0,21 ± 0,05	0,20 ± 0,08	0,26 ± 0,01
	Non arrosées	Facteur d'augmentation	J0 à J8	4	4,5	5,9	4,3
		Facteur d'augmentation	J12 à J15	1,4	1,6	1,8	1,6

TE est inférieure à 92,2%. Ceci renforce l'idée que les plantes arrosées pour les 4 génotypes peuvent être caractérisées par une $TE \geq 92,2\%$.

5.3.3 Comparaison de l'évolution de la masse turgide et de la teneur relative en eau

Pour les plantes arrosées, aucune différence statistique n'est observée entre les 3 mutants *AtERD6-like* et en comparaison avec Col-0 en ce qui concerne la MT et la TRE.

La MT augmente linéairement pour les 4 génotypes avec un R^2 compris entre 0,925 et 0,948 (figure 87 I). Les 2 phases de croissance de la MT définies pour Col0 sont aussi visibles pour les 3 mutants : 1 phase de 35 à 41 jours après semis et une autre de 41 à 50 jours après semis.

La TRE est stable pour les 3 mutants *AtERD6-like* et pour Col-0 (figure 87 K) et les valeurs sont proches pour les 4 génotypes. Ainsi la catégorie de plantes arrosées peut être définie chez les 3 mutants, par une TRE dans les rosettes supérieure à 84,5%, comme déterminé pour Col-0. La part des valeurs de TRE inférieures à 84,5% est faible chez les mutants et peut être négligée au vu des fluctuations des valeurs de TRE dans les rosettes des plantes arrosées : 30 valeurs sur 180 (16%) pour chacun des 3 mutants étudiés.

Le facteur d'augmentation de la MT et la vitesse d'augmentation (g/jour) sont résumés dans le tableau 18.

Chez les plantes non arrosées, aucune différence statistique n'est observée entre les 3 mutants *AtERD6-like* et en comparaison avec Col-0.

La MT augmente linéairement jusque J8 ($0,944 \leq R^2 \leq 0,994$), stagne de J8 à J12 et diminue de J12 à J15 (figure 87 J). Toutefois, le coefficient de corrélation est plus élevé pour Col-0 ($R^2 = 0,978$) que pour les 3 mutants ($R^2 = 0,780$ pour *at1g75220* ; 0,887 pour *at4g04760* et 0,805 pour *at1g08920*).

Des tests de Kruskal-Wallis effectués sur l'ensemble des données, de J0 à J15 pour les 4 génotypes montrent que la TRE commence à diminuer significativement à J8 pour les mutants *at1g75220* ($87,3 \pm 2,1 \%$ à $83,8 \pm 4,3 \%$) et *at4g04760* ($86,6 \pm 2,4 \%$ à $83,4 \pm 2,3 \%$) et à J9 pour Col-0 ($84,6 \pm 5,5 \%$ à $84,0 \pm 4,6\%$) et le mutant *at1g08920* ($84,7 \pm 3,1 \%$ à $77,7 \pm 8,1 \%$) (figure 87 L). Le début de la chute de la TRE est indiqué d'une flèche pour chaque génotype. Que ce soit à J8 ou à J9, la diminution de la TRE débute pour les 4 génotypes dès que la TRE est inférieure à 84,5%. Ceci renforce l'observation indiquant que les plantes arrosées des 4 génotypes peuvent être caractérisées par une TRE supérieure à 84,5%.

5.3.4 Comparaison de l'évolution de la conductance stomatique

Pour les plantes arrosées, la CS est stable au cours des 15 jours de cinétique (figure 55), et aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les 3 mutants *AtERD6-like* et en comparaison avec Col-0. Les valeurs de CS mesurées chez les mutants varient, selon les plantes, de 218 ± 79 à 117 ± 28 mmol/m²/s. Ces valeurs sont comprises entre 250 et 80 mmol/m²/s, valeurs qui caractérisent les plantes Col-0 arrosées.

Chez les plantes non arrosées (figure 87 N) :

Pour les mutants *at1g75220* et *at4g04760*, la CS diminue significativement entre J9 et J11 et à J11 les stomates sont majoritairement fermés. A J9, la CS du mutant *at1g75220* est de $56,13 \pm 36,0$ mmol/m²/s et de $69,8 \pm 41,5$ mmol/m²/s pour le mutant *at4g04760*. Or, une valeur de CS inférieure à 80 mmol/m²/s correspond au début de la chute de la CS chez les plantes non arrosées. De plus, à J9 la TE est de $91,6 \pm 0,9$ % et $91,1 \pm 1,3$ %, respectivement pour le mutant *at1g75220* et *at4g04760*, soit des valeurs inférieures à 92,2%. Ainsi pour ces 2 mutants, la CS chute à partir d'une TE inférieure à 92,2% et les stomates sont majoritairement fermés pour une TE est inférieure à 90% ($88,6 \pm 2,7$ % et $87,9 \pm 3,5$ % à J11 respectivement pour le mutant *at1g75220* et *at4g04760*).

Pour le mutant *at1g08920*, la CS diminue à partir de J7 et à J10 les stomates sont majoritairement fermés. La CS est à J8 de $70,2 \pm 24,6$ mmol/m²/s donc inférieure à 80 mmol/m²/s qui marque le début de la diminution de la CS chez les plantes non arrosées. De plus, la TE est à J8 de $91,9 \pm 0,6$ %. La CS diminue donc à partir d'une TE inférieure à 92,2% et les stomates sont majoritairement fermés pour une TE inférieure à 90%.

L'analyse de la CS pour les plantes arrosées et non arrosées des 3 génotypes mutants *AtERD6-like* est similaire à celle qui a été effectuée précédemment sur Col-0 : les rosettes des plantes arrosées ont une valeur de CS supérieure ou égale à 80 mmol/m²/s, la CS des rosettes des plantes non arrosées diminue à partir d'une TE inférieure à 90%. Les stomates sont majoritairement fermés dès que la TE atteint un niveau inférieur à 90%.

L'ensemble de ces analyses montre que les 4 génotypes étudiés : le sauvage Col-0 et les trois mutants *at1g75220* (gène muté *At1g7220*, groupe I), *at4g04760* (gène muté *At4g04760*, groupes IIb2, B6) et *at1g08920* (gène muté *At1g08920*, groupes IIb3, B9), ont une croissance similaire entre 35 et 50 jours après semis. Ainsi, ces trois mutations n'affectent pas la croissance des plantes arrosées. De plus, chez les plantes non arrosées, aucune différence de

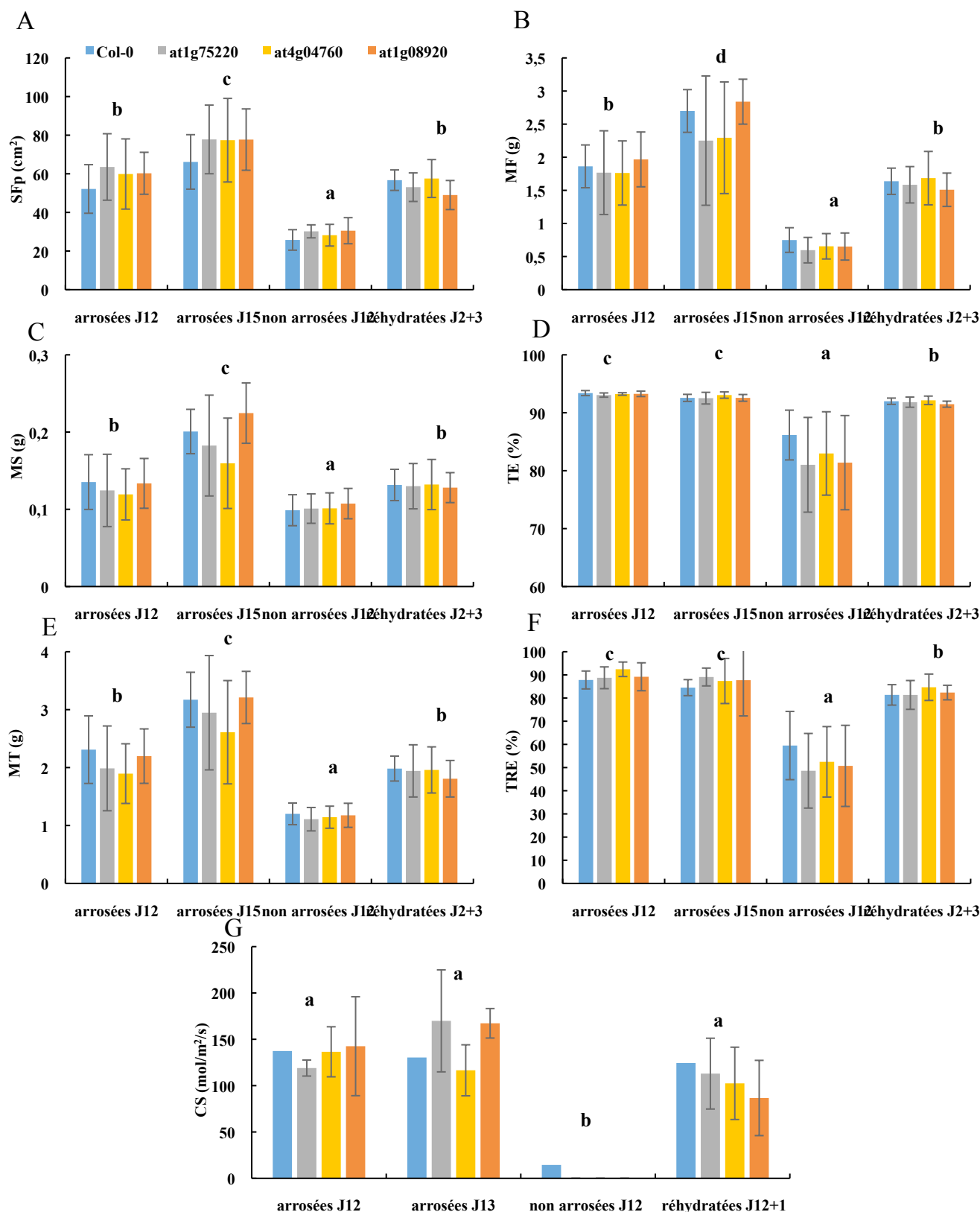


Figure 88 : comparaison de la réponse des 7 paramètres physiologiques mesurés pour les 4 génotypes étudiés à la réhydratation par ré-arrosage. Chaque valeur représente la valeur de la moyenne de 3 répétitions biologiques (\pm écart type). Pour la conductance stomatique (CS) chez Col-0, 2 répétitions biologiques ont été analysées. Pour les plantes non arrosées à J12, il n'y a pas de valeurs de CS pour les mutants car celle-ci n'a pas pu être déterminée (CS nulle). Pour chaque paramètre, des tests de Mann-Whitney ont permis de mettre en évidence des groupes de valeurs statistiquement différentes, représentés par des lettres différentes (p.value < 0,05).

réponse entre les trois mutants *ERD6-like* et le génotype sauvage vis-à-vis des paramètres physiologiques n'a été détectée. Ceci signifie que les 4 phases de réponses des plantes à la carence en eau déterminées chez Col-0 (figure 59) permettent de décrire de la même façon le comportement des mutants face à la carence en eau soit :

- Phase 1 (croissance) la SFP, la MS, la MF et la MT augmentent. Les TE, TRE et CS sont élevées.
- Phase 2 (carence modérée) : la TE, la TRE et la CS commencent à diminuer, alors que la MF et la MT stagnent et que la MS et la SFp augmentent
- Phase 3 (carence sévère) les stomates sont majoritairement fermés, la SFp et la MF diminuent, la MT stagne et la MS augmente.
- Phase 4 : (flétrissement) tous les paramètres analysés cités précédemment diminuent. La MS étant celui qui diminue en dernier lorsque la TE devient inférieure à 76%.

5.4 Effet de la réhydratation sur les paramètres physiologiques mesurés

Les effets d'une réhydratation sur les 7 paramètres physiologiques (SFp, MF, MS, TE, MT, TRE et CS) ont également été comparés pour les 4 lignées. Pour cela, pour chacun des paramètres, la valeur moyenne dans les feuilles des plantes arrosées à J12 et à J15, a été comparée avec la valeur moyenne des plantes non arrosées à J12 et des plantes non arrosées jusqu'à J12 puis réhydratées jusqu'à J15. Seule la mesure de la CS pour les plantes réhydratées a été réalisée le lendemain du ré-arrosage soit à J13.

Après 12 jours d'arrêt d'arrosage, quelle que soit la lignée considérée, les valeurs de tous les paramètres physiologiques mesurés sont significativement beaucoup plus faibles dans les plantes non arrosées que dans les plantes arrosées régulièrement pendant 12 jours (figure 88). Cet écart est encore plus important si l'on compare avec les plantes arrosées à J15 pour les paramètres physiologiques qui augmentent dans la condition arrosée, tels que la SFp, la MF, la MS, et la MT. La réapparition d'une conductance stomatique dans les 4 lignées le lendemain de la réhydratation traduit une réouverture des stomates à un niveau comparable à celui des plantes arrosées ($> 80 \text{ mmol/m}^2/\text{s}$). Les valeurs mesurées pour les six autres paramètres augmentent pour Col-0 et pour les 3 lignées mutantes dans la même proportion. Toutefois, ces valeurs restent inférieures à celles mesurées pour les plantes arrosées à J15 pour les 6 paramètres. A l'inverse, pour la SFp, la MF, la MS et la MT, paramètres fortement liés à la croissance des plantes, les valeurs moyennes mesurées dans les feuilles des plantes

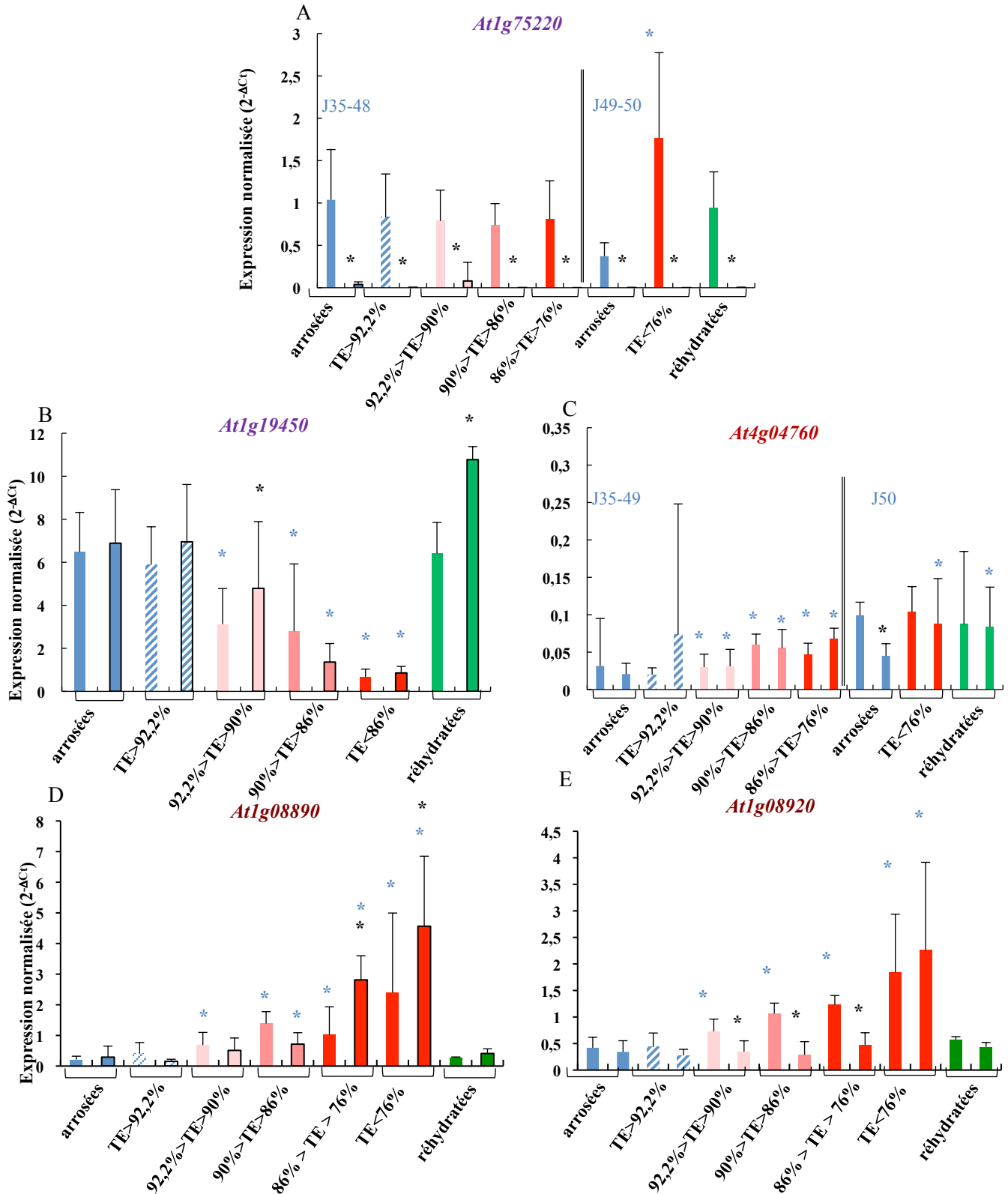
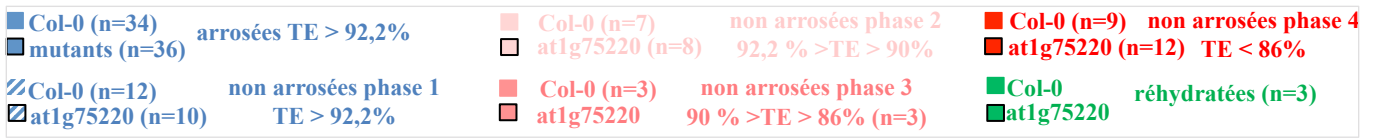


Figure 89 : expression relative de 5 ATERD6-like chez les plantes arrosées, non arrosées et réhydratées de fond génétique mutant *atlg75220*. Les valeurs correspondent aux valeurs moyennes de 3 répétitions biologiques (\pm écart type) d'expression relative normalisée par rapport au gène *AtPP2a*. Les astérisques bleues représentent des valeurs significativement différentes déterminées par un test de Kruskal Wallis suivi du test de comparaisons multiples de Dunn (p .value < 0,05) avec la correction de Bonferroni. Les astérisques noires représentent des valeurs significativement différentes de la valeur mesurée chez Col-0, déterminées par des tests de Mann Whitney (p .value < 0,05).

réhydratées sont semblables à celles des plantes arrosées à J12. Cette observation montre d'une part qu'après 12 jours d'arrêt d'arrosage la croissance des plantes Col-0 et mutantes est arrêtée et d'autre part que la réhydratation des plantes à J12 est possible ; toutefois après 3 jours de réhydratation, les plantes ne rattrapent pas le retard de croissance accumulé par rapport aux plantes, du même âge, arrosées régulièrement. En parallèle, il est important de noter que les valeurs de TE et de TRE déterminées pour les plantes réhydratées restent significativement plus faibles que celles mesurées pour les plantes arrosées à J15 et à J12, ce qui traduit un état hydrique légèrement différent par rapport aux plantes arrosées.

L'ensemble des résultats obtenus (figure 88) n'a pas permis de détecter des différences dans la réponse des 4 lignées à la réhydratation et ceci pour chacun des paramètres testés. Les 4 lignées répondent donc toutes de la même manière à la réhydratation.

5.5 Comparaison de l'expression des gènes *AtERD6-like* dans les feuilles des 3 mutants *aterd6-like* avec celle détectée dans l'écotype sauvage Col-0 en condition de carence en eau et de réhydratation.

Afin d'identifier les *ERD6-like* dont l'expression relative pourrait varier dans les 3 mutants par rapport à Col-0, chez les plantes non arrosées, l'expression relative des 4 *AtERD6-like* induits par la carence en eau (*At1g75220*, *At4g04760*, *At1g08890* et *At1g08920*) a été comparée pour les plantes non arrosées dans chacune des 4 phases déterminées précédemment et pour les plantes réhydratées. De même l'expression des copies dupliquées en tandem a été analysée.

- **Pour le mutant *at1g75220***

Comme attendu, l'expression relative d'*At1g75220* est réduite de façon drastique (98,2% de répression sur la totalité de la cinétique par rapport à Col-0) et aucune variation de l'expression n'est détectable quelle que soit l'état hydrique des plantes (figure 89 A). De ce fait, l'induction d'*At1g75220* détectées dans les feuilles des plantes sauvages non arrosées en fin de phase 4, lorsque la TE est inférieure à 76%, n'est pas détectée dans les plantes mutantes *at1g75220* non arrosées (figure 89 A).

Le niveau d'expression relative du gène *At1g19450* est réprimé chez le mutant KO *at1g75220*, dans les rosettes des plantes non arrosées à partir de la phase 3 (carence sévère). En effet, le niveau d'expression passe de $6,89 \pm 2,49$ dans les feuilles des plantes arrosées à

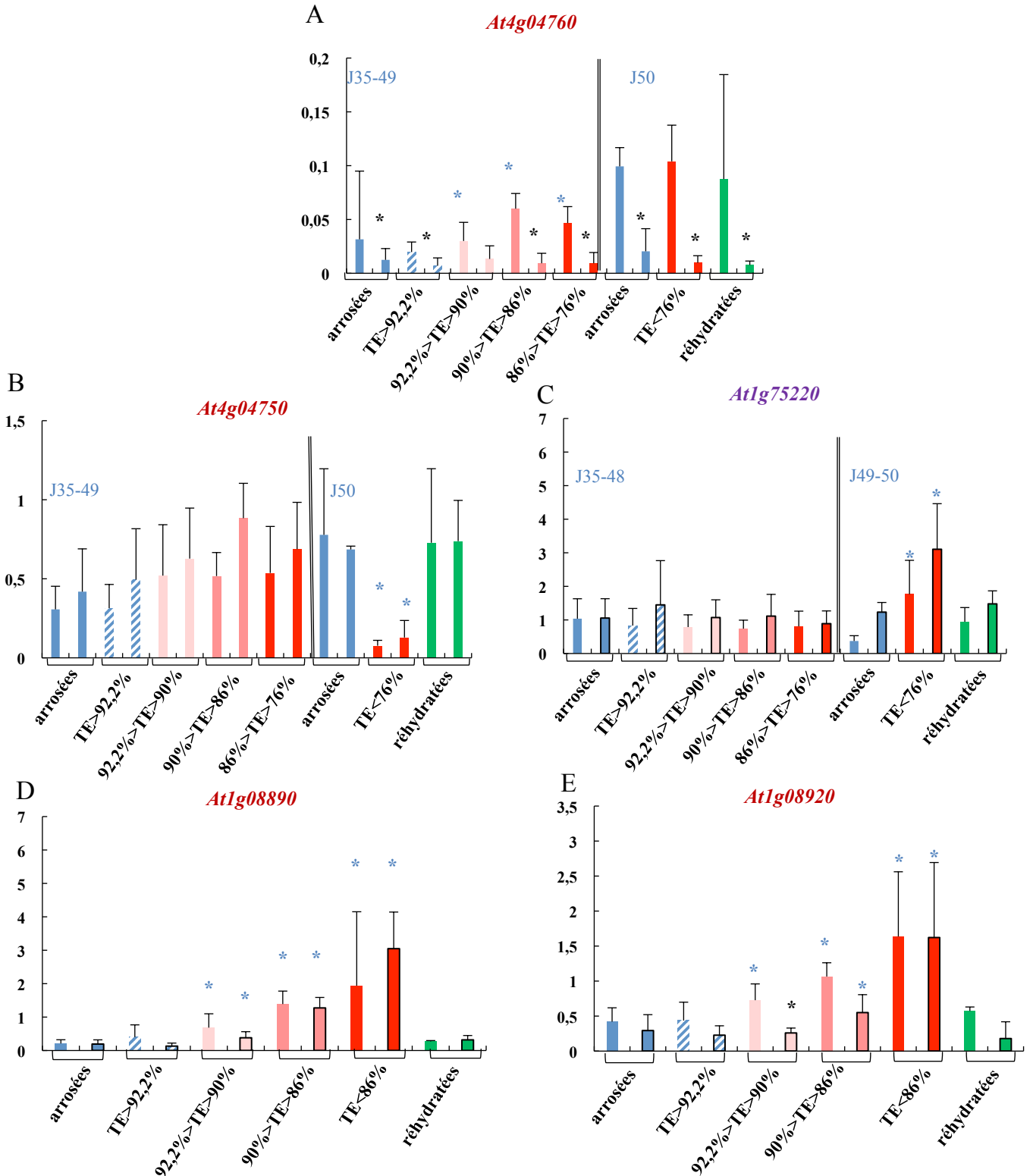
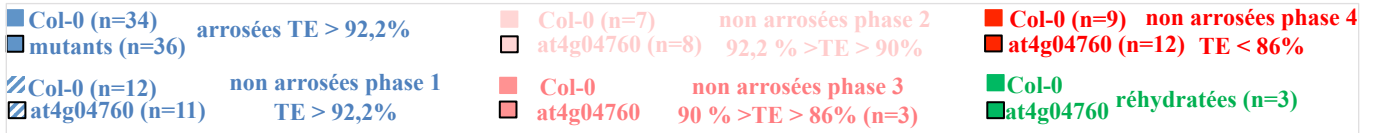


Figure 90 : expression relative de 5 ATERD6-like chez les plantes arrosées, non arrosées et réhydratées de fond génétique mutant *at4g04760*. Les valeurs correspondent à la valeur moyenne de 3 répétitions biologiques (+/- écart type) d'expression relative normalisée par rapport au gène *AtPP2a*. Les astérisques bleues représentent des valeurs significativement différentes de la valeur mesurée sur les plantes arrosées déterminées par un test de Kruskal Wallis suivi du test de comparaisons multiples de Dunn (p.value < 0,05). Les astérisques noires représentent des valeurs significativement différentes de la valeur mesurée chez Col-0, déterminées par un test de Kruskal Wallis suivi du test de comparaisons multiples de Dunn (p.value < 0,05).

1,36 ± 0,86 chez les plantes non arrosées en phase 3, soit une répression de 5 fois. Cette répression perdure en phase 4 (sénescence avancée, niveau d'expression relative de 0,86 ± 0,30, soit 8 fois) Il y aurait donc un retard de la répression du gène *At1g19450* chez le mutant *at1g75220* par rapport à Col-0, pour qui *At1g19450* est réprimé dès la phase 2, chez les plantes non arrosées (carence modérée, figure R 89 B). La réhydratation des plantes à J12 lève la répression d'*At1g19450* induite par la carence en eau pour les deux lignées.

L'induction du gène *At4g04760* par la carence hydrique se produit au même moment et avec la même intensité (valeur de 0,03) que pour la lignée sauvage Col-0. L'induction commence dès la phase 2 (carence modérée en eau) et se prolonge en phases 3 et 4 (figure 89 C). Une augmentation progressive d'un facteur 4 est observée de la phase 2 (carence modérée) à la phase 4 (sénescence avancée).

L'induction du gène *At1g08890* se produit au même moment et avec un niveau semblable à celui observé pour Col-0 (valeurs de 0,68 et 0,51 pour Col-0 et *at1g75220*, respectivement). Elle commence dès la phase 2 (carence modérée en eau) et se prolonge en phases 3 et 4 (figure 89 D). Il est à noter néanmoins que la valeur du niveau d'expression relative du gène *At1g08890* en phase 4 (début et fin de phase 4) chez le mutant *at1g75220* est 2 fois plus importante que la valeur chez Col-0. La réhydratation du mutant permet de revenir à un niveau d'expression similaire à celui des plantes arrosées, comme observé pour Col-0.

L'induction du gène *At1g08920* se produit uniquement en fin de phase 4 (flétrissement avancé, TE < 76%, figure 89 E). En effet, dans cette phase, le niveau d'expression d'*At1g08920* est de 2,26 ± 1,65 chez les plantes non arrosées contre 0,34 ± 0,21 pour les plantes arrosées soit une augmentation de 6,6 fois entre les plantes arrosées et les plantes non arrosées en phase 4. L'induction du gène *At1g08920* est donc retardée chez le mutant *at1g75220* par rapport à Col-0. En effet, chez Col-0 l'induction d'*At1g08920* a lieu dès la phase 2 (carence modérée figures 71 G et 89 E). La mutation du gène *At1g75220* affecte l'induction du gène *At1g08920* dans les feuilles des plantes non arrosées en la retardant de 2 phases par rapport à Col-0.

- **Pour le mutant *at4g04760***

L'expression relative d'*At4g04760* est très faible (réduction du niveau d'expression par rapport à Col0 de 61 % à J0 et de 72,5% sur l'ensemble de la cinétique). De plus, comme attendu, aucune variation de l'expression d'*At4g04760* n'est détectable quel que soit l'état hydrique des plantes (figure 90 A). De ce fait, et contrairement à Col-0 pour qui *At4g04760*

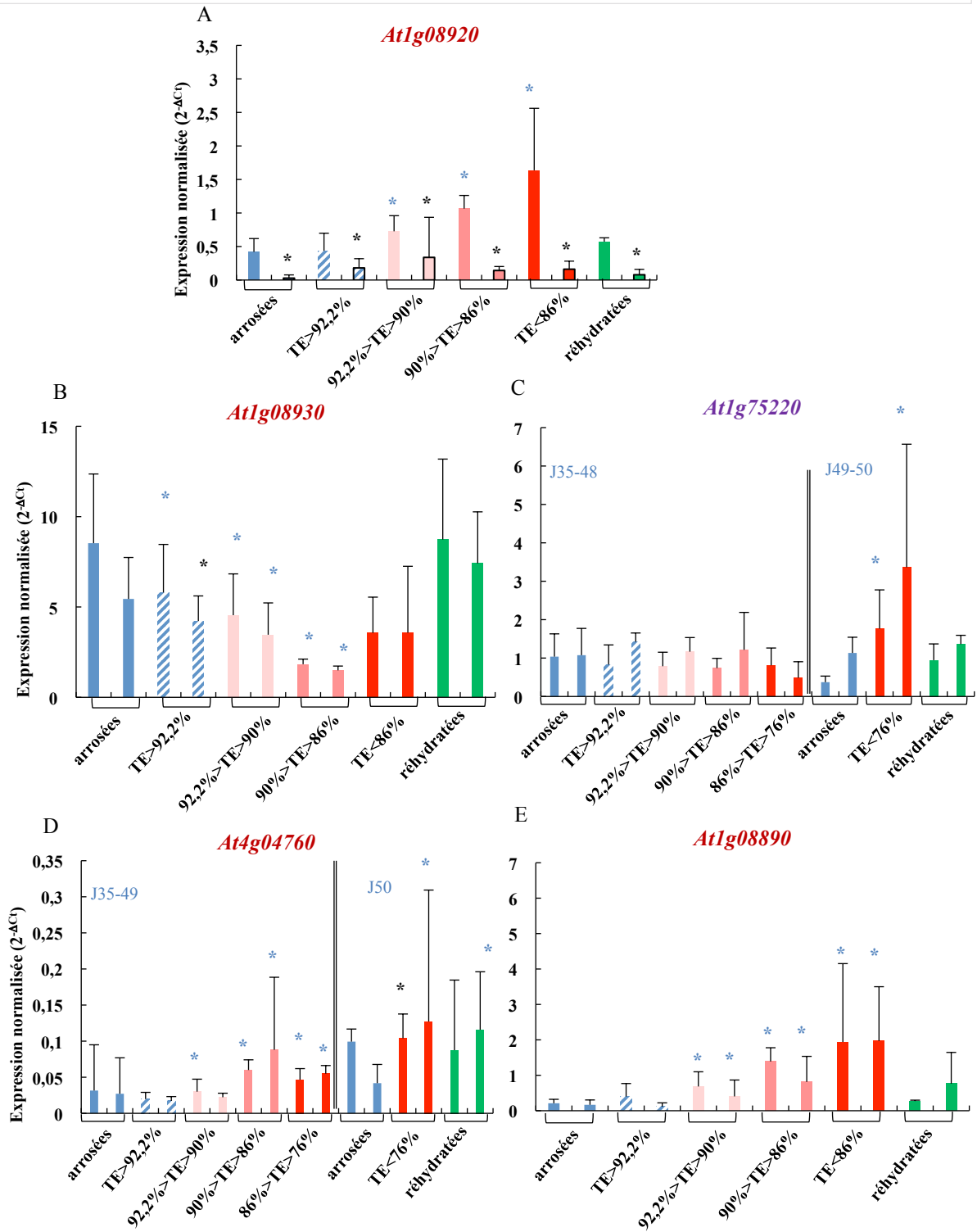
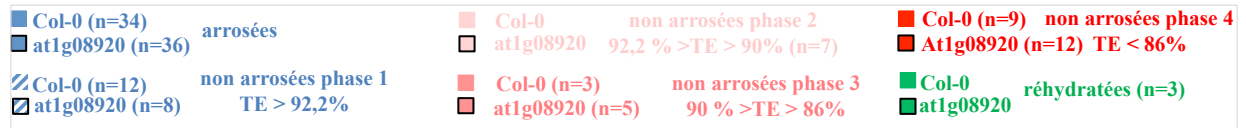


Figure 91 : expression relative de 5 ATERD6-like chez les plantes arrosées, non arrosées et réhydratées de fond génétique mutant *at1g08920*. Les valeurs correspondent aux valeurs moyennes de 3 répétitions biologiques (+/- écart type) d'expression relative normalisée par rapport au gène *AtPP2a*. Les astérisques bleues représentent des valeurs significativement différentes de la valeur mesurée sur les plantes arrosées déterminées par un test de Kruskal Wallis suivi du test de comparaisons multiples de Dunn (p.value < 0,05). Les astérisques noires représentent des valeurs significativement différentes de la valeur mesurée chez Col-0, déterminées par un test de Kruskal Wallis suivi du test de comparaisons multiples de Dunn (* p.value < 0,05).

est induit à partir de la phase 2, il n'y a aucune induction de ce gène dans les feuilles des plantes non arrosées du mutant *at4g04760* (figure 90 A).

L'expression du gène en tandem *At4g04750* (figure 90 B) n'est pas modifiée par rapport à Col-0, la répression du gène *At4g4570* observée en phase 4 est retrouvée avec la même importance dans les feuilles du sauvage Col-0 et du mutant *at4g04760*.

L'induction de l'expression d'*At1g75220* en fin de phase 4 (TE < 76%) est également retrouvée (figure 90 C). Cette induction se produit au même moment et avec une amplitude similaire à celle observée pour Col-0. Par rapport aux plantes arrosées de même âge (J49-J50), le niveau d'expression double ($1,23 \pm 0,29$ chez les plantes arrosées et $2,58 \pm 1,57$ chez les plantes non arrosées) (figure 90 C). La réhydratation du mutant permet de revenir à un niveau d'expression similaire à celui des plantes arrosées, comme observé pour Col-0. L'expression d'*At1g75220* n'est pas modifiée dans le mutant *at4g04760* en condition de carence hydrique.

L'induction du gène *At1g08890* (figure 90 D) est identique à celle observée chez Col-0. Elle commence dès la phase 2 et augmente progressivement jusqu'en phase 4. Les niveaux d'expression mesurés pour le mutant sont équivalents à ceux détectés pour Col-0.

L'induction de l'expression d'*At1g08920* est retardée par rapport à celle détectée pour Col-0. En effet, ce gène est induit à partir de la phase 3 (carence sévère) pour le mutant *at4g04760* alors que l'induction se produit dès la phase 2 pour Col-0 (figure 90 E). Toutefois en phase 4, les niveaux d'expression dans Col-0 et dans le mutant sont identiques (valeurs de 1,64 et 1,62 pour Col-0 et *at1g04760*, respectivement) et correspondent à une induction de 5,6 fois (figure 90 E). La mutation du gène *At4g04760* semble donc affecter légèrement l'induction du gène *At1g08920* dans les feuilles des plantes non arrosées en la retardant d'une phase par rapport à Col-0, mais n'affecte pas le niveau final d'expression en phase 4 (sénescence avancée).

- **Pour le mutant *at1g08920***

Comme attendu, l'expression relative d'*At1g08920* est plus faible dans les feuilles du mutant *at1g08920* que dans les feuilles du sauvage Col-0 (valeur de répression) et l'induction par la carence en eau détectée pour Col-0 dès la phase 2 n'est pas détectée pour le mutant. (figure 91 A).

L'expression du gène en tandem *At1g08930* (figure 91 B) est réprimée 1,6 fois dans le mutant *at1g08920*, dans les rosettes des plantes non arrosées à partir de la phase 2 (carence

Tableau 19 : bilan des effets de la mutation de chacun des 3 *AtERD6-like* mutés (*At1g75220*, *At4g04760* et *At1g08920*) sur la réponse des 4 *AtERD6-like* induits par la carence en eau chez Col-0 et des gènes dupliqués en tandem

En vert les répressions, en rouge les inductions, n.d. : non déterminé, - : pas de différences avec Col-0. les noms des gènes sont écrits de la couleur du groupe phylogéentiques auxquels ils appartiennent : violet = groupe I, vert = groupe IIa, rouge = groupe IIb.

	<i>At1g19450</i>	<i>At1g75220</i>	<i>At4g04750</i>	<i>At4g04760</i>	<i>At1g08890</i>	<i>At1g08920</i>	<i>At1g08930</i>
<i>at1g75220</i>	Retard de répression: phase 2 > phase 3	Répression de 98,2 %	n.d.	-	Induction légère en fin de phase 4 (TE > 76%)	Retard d'induction: phase 2 > phase 4	n.d.
<i>at4g04760</i>	n.d.	-	-	Répression de 72,5 %	-	Retard d'induction: phase 2 > phase 3	n.d.
<i>at1g08920</i>	n.d.	-	n.d.	Retard d'induction : phase 2 > phase 3	-	Répression de 77 %	Retard de répression : phase 1 > phase 2

modérée). Cette répression perdure et s'accroît en phase 3 (répression de 3,1 fois). Toutefois, en phase 4 (sénescence avancée), il n'y a plus de répression du gène *At1g08930* chez le mutant *at1g08920*, ni chez les plantes réhydratées (figure 91 B). Chez Col-0, les mêmes observations peuvent être établies, à l'exception du début de l'induction qui est plus précoce, dès la phase 1 (TE > 92,2% et aucune différence au niveau des mesures physiologiques avec les plantes arrosées). La mutation du gène *At1g08920* entraîne donc un retard de répression du gène *At1g08930* par la carence en eau par rapport à Col-0 (figure 91 B). *At1g08930* pourrait être considéré comme un bon marqueur de la carence en eau très précoce chez Col-0 mais pas chez le mutant KO *at1g08920*.

L'induction de l'expression relative du gène *At1g75220* en fin de phase 4 dans les rosettes des plantes non arrosées ayant une TE inférieure à 76% est parfaitement retrouvée. Par rapport aux plantes arrosées de même âge (J49-J50), le niveau d'expression triple ($1,13 \pm 0,40$ chez les plantes arrosées et $3,36 \pm 3,20$ chez les plantes non arrosées) (figure 91 C). L'induction du gène *At1g75220* se fait au même moment et avec une valeur semblable pour Col-0 et pour le mutant *at1g08920* (figure 91 C).

Une induction de l'expression relative du gène *At4g04760* d'un facteur 3 à partir de la phase 3 (carence sévère) est retrouvée (figure 91 D). Cette induction est conservée en phase 4 et même chez les plantes réhydratées, ce qui pourrait être dû à un niveau d'expression faible pour lequel une petite variation entraînerait une différence présumée significative.

L'induction du gène *At1g08890* est retrouvée dès la phase 2 (figure 91 E) avec des niveaux d'expression relative similaires dans les feuilles du mutant *at1g08920* et de Col-0 à chaque phase de la cinétique de carence en eau.

En conclusion (tableau 19), l'ensemble des données d'expression indique que dans chacune des 3 lignées mutantes, l'expression du gène muté (*At1g75220*, *At4g04769* ou *At1g08920*) est réduite et n'est plus régulée lors d'une carence en eau. De plus, l'expression des autres gènes testés incluant les copies dupliquées en tandem de ces trois gènes, ne semblent pas être fortement modifiée pour compenser totalement la faible expression des gènes cibles. Cependant, des variations du moment d'induction ou de répression des gènes sont mises en évidence. La mutation *at1g75220* retarde la répression d'*At1g19450* de la phase 2 en phase 3 et l'induction de *At1g08920* de la phase 2 en phase 4. La mutation *at4g04760* retarde l'induction d'*At1g08920* de la phase 2 en phase 3. La mutation *at1g08920* retarde la répression d'*At1g08930* de la phase 1 en phase 2 et l'induction de *At4g04760* de la phase 2 en phase 3. L'expression du gène *At1g08890* semble ne pas être affectée dans aucun des 3

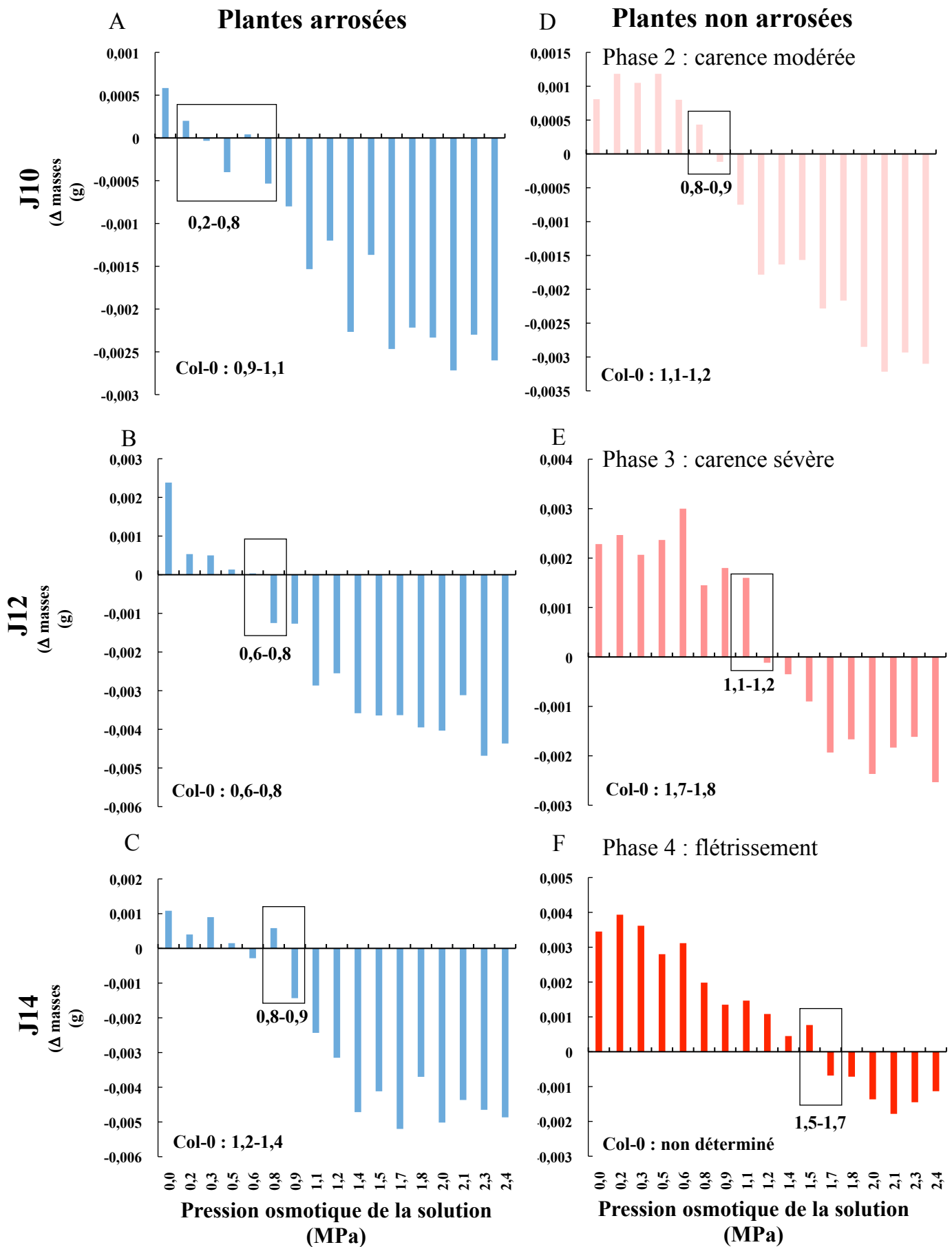


Figure 92 : évolution de la masse fraîche de fragments de feuilles du mutant *at1g75220* d'*Arabidopsis thaliana* après 24 h d'incubation dans des solutions de saccharose de pressions osmotiques croissantes. Les valeurs représentent la moyenne de 2 répétitions biologiques (n = 6 plantes). Un rappel des valeurs pour Col-0 est donné en bas de chaque graphique.

mutants sauf peut-être dans le mutant *at1g75220*, dans lequel le gène *At1g08890* semble être 2 fois plus exprimé dans les rosettes des plantes non arrosées en phase 4 (flétrissement avancée).

5.6 Estimation de la capacité des cellules des feuilles des mutants *aterd6-like* arrosées et non arrosées à répondre à des variations de concentration du milieu extérieur

De la même manière que pour Col-0 (figure 58) l'état physiologique des cellules des feuilles de plantes mutantes a été estimé à J10, J12 et J14 à l'aide d'une gamme de solutions de saccharose de pressions osmotiques différentes (0 à 2,4 MPa).

Pour le mutant *at1g75220*, l'équilibre osmotique des cellules de feuilles des plantes arrosées est atteint entre 0,2 et 0,9 MPa, à J10 et entre 0,5 et 0,9 MPa à J12 et à J14 (figure 92 A, B, C). Ainsi, de façon globale, l'équilibre osmotique entre les cellules et la solution de saccharose, se situe entre 0,2 et 0,9 MPa pour les plantes arrosées de fond génétique mutant *at1g75220*. Pour les plantes non arrosées, à J10 (TE = $90,5 \pm 1,5$ %), l'équilibre osmotique est atteint entre 0,8 et 0,9 MPa (figure 92 D), ce qui est compris dans les valeurs déterminées pour les plantes arrosées. A J12 ($86 > TE > 76\%$), l'équilibre osmotique chez les plantes non arrosées est atteint entre 1,1 et 1,2 MPa (figure 92 E), soit des valeurs supérieures à celles déterminées pour les plantes mutantes arrosées (0,2 - 0,9 MPa) mais aussi inférieures à celles des plantes Col-0 non arrosées (1,79 - 1,8 MPa). A J14 (TE < 76%), l'équilibre osmotique chez les plantes non arrosées est atteint entre 1,5 et 1,7 MPa (figure 92 F), soit des valeurs supérieures à celles déterminées pour les plantes mutantes non arrosées à J12 et arrosées à J14 (1,1 - 1,2 MPa et 0,5 - 0,9 MPa respectivement). Ce résultat diffère de celui observé pour les plantes Col-0 non arrosées à J14 pour lesquelles l'équilibre osmotique n'a pas pu être détecté.

Pour le mutant *at4g04760*, l'équilibre osmotique des cellules de feuilles des plantes arrosées est atteint entre 0,5 et 0,6 MPa à J10, entre 0,8 et 0,9 MPa à J12 et entre 0,3 et 0,5 MPa à J14 (figure 93 A, B, C). L'équilibre osmotique se situe, de façon globale, entre 0,3 et 0,9 MPa pour les plantes arrosées du mutant *at4g04760*. Pour les plantes non arrosées, à J10 (TE = $90,5 \pm 1,3$ %) l'équilibre osmotique est atteint entre 0,8 et 0,9 MPa (figure 93 D), ce qui est équivalent aux valeurs déterminées pour les plantes arrosées. A J12 ($86 \% > TE > 76$ %) l'équilibre osmotique chez les plantes non arrosées est atteint entre 1,1 et 1,2 MPa (figure 93 E), soit des valeurs supérieures à celles déterminées pour les plantes mutantes arrosées à J12 (0,8-0,9) mais inférieures à celles des plantes Col-0 non arrosées (1,7 - 1,8 MPa). A J14

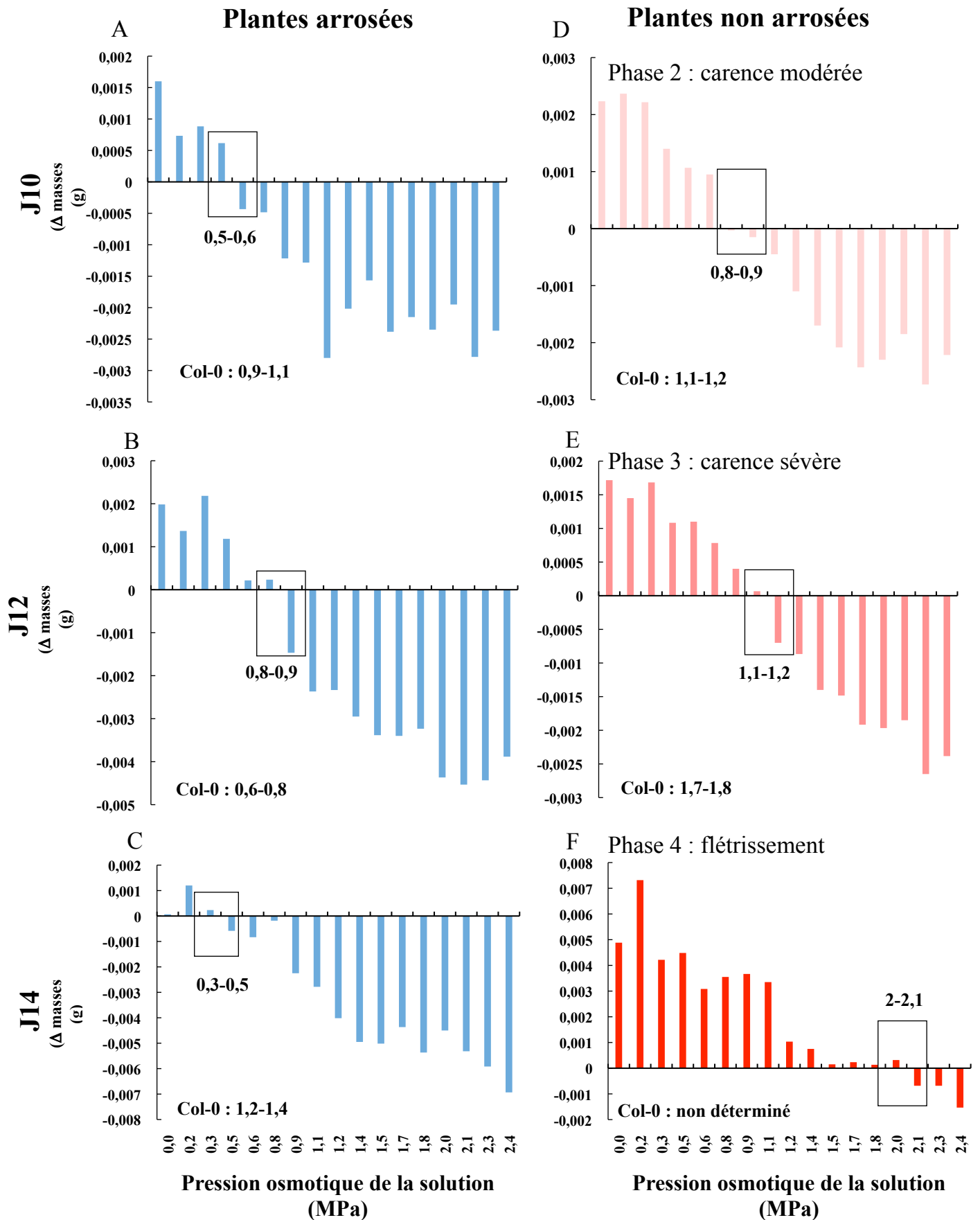


Figure 93 : évolution de la masse fraîche de fragments de feuilles du mutant *at4g04760* d'*Arabidopsis thaliana* après 24 h d'incubation dans des solutions de saccharose de pressions osmotiques croissantes. Les valeurs représentent la moyenne de 2 répétitions biologiques (n = 6 plantes). Les valeurs estimées pour Col-0 sont rappelées en bas de chaque graphique.

(TE < 76%), l'équilibre osmotique chez les plantes non arrosées est atteint entre 2,0 et 2,1 MPa (figure 93 F), soit des valeurs nettement supérieures à celles déterminées pour les plantes mutantes arrosées à J14 et non arrosées à J12. Comme pour le mutant *at1g75220*, ce résultat diffère de celui observé pour les plantes Col-0 non arrosées à J14 pour lesquelles l'équilibre osmotique n'a pas pu être chiffré.

Pour le mutant *at1g08920*, l'équilibre osmotique des cellules de feuilles des plantes arrosées se situe entre 0,5 et 0,9 MPa à J10, entre 0,6 et 0,8 MPa à J12 et entre 0,5 et 0,9 MPa à J14 (figure 94 A, B, C). L'équilibre osmotique entre les cellules et la solution de saccharose, se situe entre 0,5 et 0,9 MPa pour les plantes arrosées du mutant *at1g08920*. Pour les plantes non arrosées, à J10 (TE = 90,0 ± 1,7 %), l'équilibre osmotique est atteint entre 0,6 et 0,82 MPa (figure 94 D) ce qui est équivalent aux valeurs déterminées pour les plantes arrosées. A J12 (86 % > TE > 76 %) l'équilibre osmotique pour les plantes non arrosées est atteint entre 1,4 et 1,5 MPa (figure 94 E), soit des valeurs supérieures à celles déterminées pour les plantes mutantes arrosées à J12 (0,6-0,8 MPa) mais inférieurs à celles des plantes Col-0 non arrosées à J12 (1,7-1,8). A J14 (TE < 76%), comme pour les plantes Col-0, l'équilibre osmotique chez les plantes mutantes *at1g08920* non arrosées n'est jamais atteint (figure 94 F).

En conclusion, pour toutes les plantes arrosées, quelle que soit la lignée mutante, l'équilibre osmotique est situé entre les valeurs de 0,2 à 0,9 MPa. En condition de carence en eau, à J10 (phase 2, 92,2% > TE > 90%) aucune différence significative avec les plantes arrosées n'a pu être clairement observée pour chacune des lignées. L'équilibre osmotique est détecté entre 0,6 et 0,9 MPa. Ceci suggère que l'état physiologique des plantes n'a pas été significativement modifié lors de 10 premiers jours de carence en eau (carence modérée). Pour chacune des 3 lignées mutantes, l'équilibre osmotique est atteint pour des valeurs de plus en plus importantes au fur et à mesure de l'intensification de la carence en eau. Ceci met en évidence que plus la carence en eau est importante, plus les solutés sont concentrés dans les cellules certainement parce que les pertes d'eau sont plus importantes (diminution de la TE qui devient inférieure à 92,2 % mais reste supérieure ou égale à 90%). Toutes ces observations sont comparables à celles faites pour Col-0.

A J12, dans les feuilles des mutants *at1g75220* et *at4g04760*, l'équilibre osmotique est atteint pour une pression osmotique plus faible (entre 1,1 et 1,2 MPa) que pour le mutant *at1g08920* (entre 1,4 et 1,5 MPa) et Col-0 (entre 1,7-1,8 MPa). Ces comparaisons semblent mettre en évidence une différence entre l'état physiologique des mutants *at1g75220* et

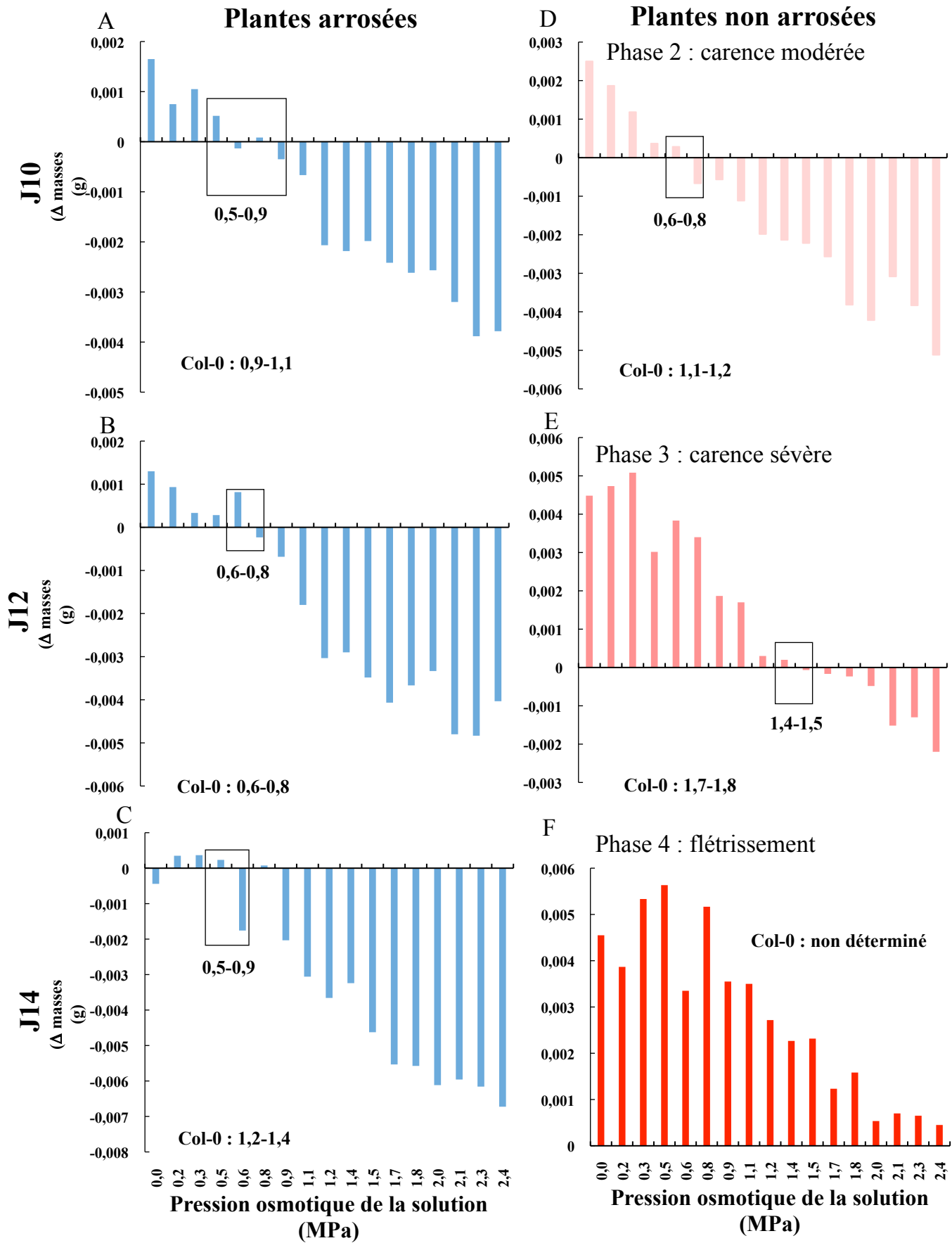


Figure 94 : évolution de la masse fraîche de fragments de feuilles du mutant *at1g08920* d'*Arabidopsis thaliana* après 24 h d'incubation dans des solutions de saccharose de pressions osmotiques croissantes. Les valeurs représentent la moyenne de 2 répétitions biologiques (n=6 plantes). Les valeurs estimées pour Col-0 sont rappelées dans chaque graphique.

at1g04760 et celui du mutant *at1g08920* et de Col-0. Ces deux derniers pourraient concentrer dès J12 plus de solutés dans leurs cellules que les deux autres mutants, du fait d'une perte accrue d'eau par les cellules, conséquence de l'arrêt d'arrosage. Etant donné que les TE à J10, J12 et J14 sont similaires entre les 4 génotypes (figure 87) il est plus probable que les lignées mutante *at1g08920* et sauvage Col-0 soient capables d'accumuler plus d'osmolytes dans leurs cellules que les mutants *at1g75220* et *at4g04760*. Cependant, à J14, l'équilibre osmotique dans les feuilles du mutant *at4g04760* est estimé entre 2,0 et 2,1 MPa. Celui du mutant *at1g75220* est estimé entre 1,5 et 1,7 MPa, des valeurs similaires à celles de Col-0 et du mutant *at1g08920* à J12. A l'inverse, il n'est plus possible de déterminer l'équilibre osmotique pour le mutant *at1g08920* et Col-0. Pour Col-0, ceci peut être attribué, suite à l'observation des cellules en microscopie (figure 57), au fait que la majorité des cellules sont mortes à J14 et nous pouvons imaginer qu'il en est de même pour le mutant *at1g08920*. La différence d'état physiologique peut donc être le simple reflet d'un flétrissement avancé résultant d'une part plus importante de cellules mortes dans les feuilles du mutant *at1g08920* et de Col-0 que dans les deux autres mutants.

5.7 Teneurs en glucose, fructose et saccharose pour les 3 mutants analysés, et comparaison avec les teneurs en sucres mesurées pour Col-0, pour les plantes arrosées, non arrosées et réhydratées

Dans un premier temps, la teneur en sucres solubles a été mesurée par dosage enzymatique dans chacune des 3 lignées mutantes pour déterminer si la suppression d'un des 3 gènes a des conséquences sur la teneur en sucres dans les feuilles entre 35 et 50 jours après semis, pour des plantes cultivées en condition normale d'arrosage.

Pour Col-0, entre 35 et 48 jours après semis, la teneur en glucose dans les feuilles des plantes arrosées est stable (entre 0,21 et 0,48 g/100g de MS). Elle augmente à partir du 49^{ème} jour après semis où elle atteint une valeur maximale de $1,05 \pm 0,29$ g /100 g de MS (figure 60 A).

Pour le mutant *at1g75220* (figure 95 A), de 35 à 47 jours après semis, la teneur en glucose dans les feuilles est significativement plus importante que pour la plante sauvage Col-0. En effet, les valeurs de teneur en glucose pour le mutant sont stables et se situent entre $0,53 \pm 0,13$ et $1,00 \pm 0,50$ g/100g de MS. La teneur en glucose est donc environ deux fois plus élevée que pour Col-0. A 48 jours après semis, bien que cette valeur ne soit pas statistiquement

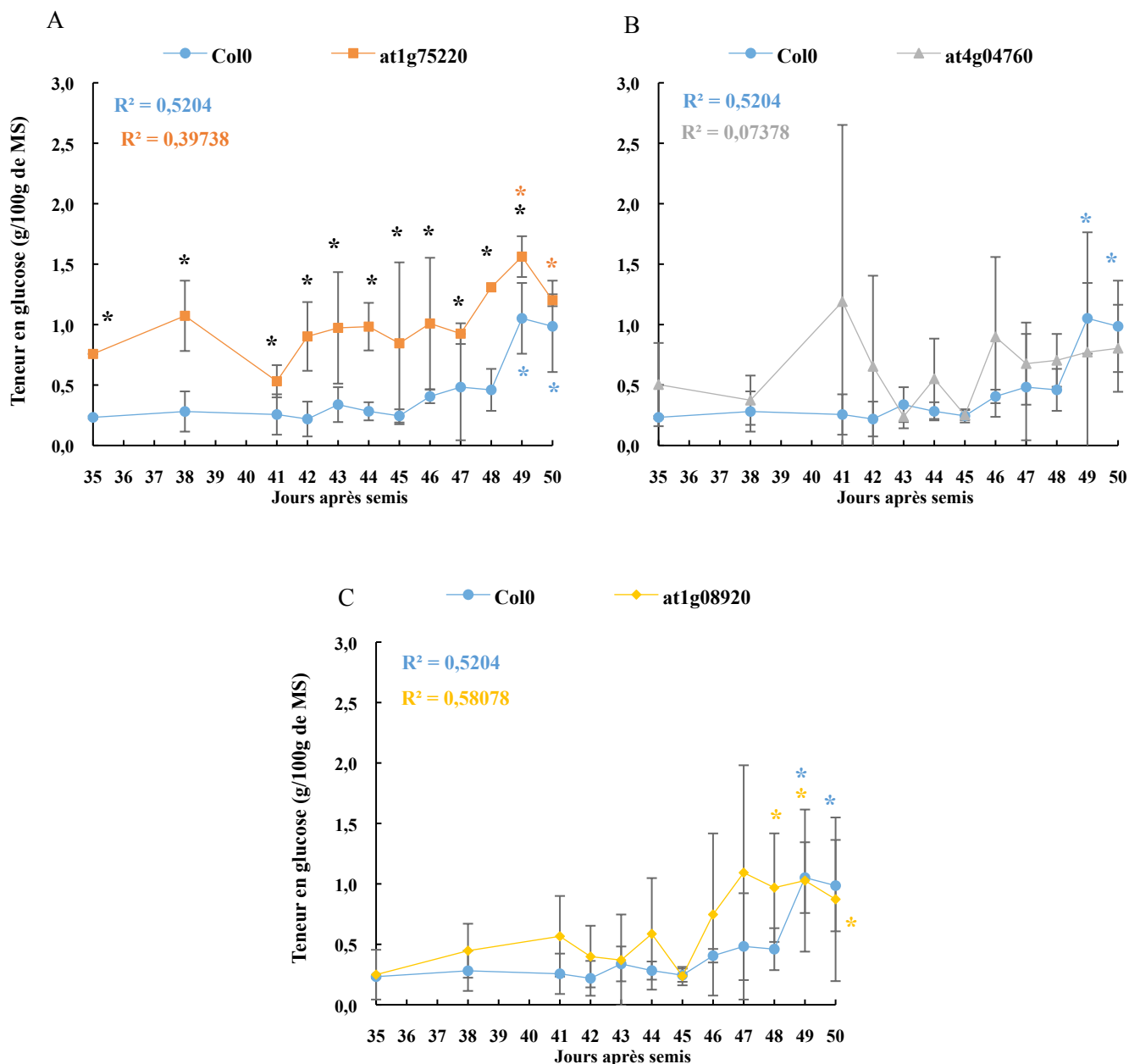


Figure 95 : teneur en glucose dans les rosettes de Col-0 et des mutants d'insertion *at1g75220*, *at4g04760* et *at1g08920*, chez les plantes arrosées. Pour Col0 à 48 et 49 jours après semis, 2 répétitions biologiques ont été effectuées sur à chaque fois un pool de 5 demi-rosettes. Les valeurs représentent donc les moyennes de 2 répétitions biologiques. Pour les autres jours de prélèvement et les 3 mutants d'insertion, 3 répétitions biologiques ont été effectuées sur à chaque fois un pool de 5 demi-rosettes. Les valeurs représentent donc les moyennes de 2 répétitions biologiques. Les astérisques de couleur correspondent à une différence significative dans les feuilles du mutant concerné par rapport aux autres jours, déterminée par le test de Kruskal-Wallis, suivi d'un test de Dunn de comparaisons multiples (p -value $<0,05$). Les astérisques noires correspondent à une différence significative entre la valeur de teneur en glucose dans les feuilles du mutant et celle de Col-0, déterminée par le test de Mann-Whitney (p -value $<0,05$).

différente des autres, un début d'augmentation de la teneur en glucose est constaté avec une valeur de $1,30 \pm 0,31$ g/100 g de MS. A 49 jours après semis, la teneur en glucose dans les feuilles est statistiquement plus importante et correspond à la concentration en glucose la plus forte dans ce mutant avec $1,56 \pm 0,17$ g/100g de MS. Entre 47 et 49 jours après semis, la teneur en glucose dans les feuilles augmente 1,7 fois. Chez Col-0, cette augmentation est de 2,6 fois, ce qui est plus important. De plus, on note que 50 jours après semis, les teneurs en glucose chez Col-0 et le mutant *at1g75220* ne sont pas significativement différentes.

Pour le mutant *at4g04760* (figure 95 B), de 35 à 50 jours après semis, malgré des fluctuations importantes qui conduisent à de grands écarts types, il n'y a pas de différence significative avec la teneur en glucose dans les feuilles de Col-0. La teneur en glucose dans les feuilles du mutant est similaire à celle qui a été mesurée pour le sauvage Col-0. En effet, les valeurs pour le mutant s'échelonnent entre $0,24 \pm 0,10/100$ g de MS et $0,89 \pm 0,66/100$ g de MS. Cinquante jours après semis, la teneur en glucose dans ce mutant atteint une valeur de $0,80 \pm 0,36$ g/100g de MS ce qui est assez similaire à ce qui a été mesuré pour Col-0. A la vue de l'évolution de la teneur en glucose dans les feuilles du mutant *at4g04760* entre 35 et 50 jours après semis, il est difficile de retrouver l'augmentation vers 49 jours après semis. D'ailleurs aucune augmentation n'a été mise en évidence par le biais des tests statistiques (Mann-Whitney et Kruskal-Wallis) effectués.

Pour le mutant *at1g08920* (figure 95 C), de 35 à 47 jours après semis la teneur en glucose est stable et s'échelonne de $0,24 \pm 0,07/100$ g de MS à $1,09 \pm 0,89/100$ g de MS. Les écarts-types étant importants, ces valeurs ne peuvent pas être considérées comme supérieures à celles de Col-0, de plus, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les 2 génotypes. Une augmentation de la teneur en glucose dans les derniers jours de la cinétique (à partir de 46 jours après semis) est observable. Cette augmentation est un peu plus précoce que celle observée pour Col-0 et conduit à une teneur maximale en glucose dans les feuilles des plantes arrosées du mutant *at1g08920* de $1,03 \pm 0,09$ g/100g de MS, 49 jours après semis, ne montrant pas de différence avec la teneur en glucose chez Col-0.

En conclusion, la teneur en glucose dans les feuilles des plantes mutantes arrosées et pour Col-0 est stable jusqu'à 48-49 jours après semis. Pour Col-0, nous avons montré, que la teneur en glucose dans les feuilles augmente significativement à 49 et 50 jours après semis ($1,05$ g $\pm 0,29$ / 100 g de MS 49 j après semis) (figure 60 A, figure 95), augmentation observée également chez les mutants en fin de cinétique sauf pour le mutant *at4g04760*. Pour le mutant *at1g75220*, la teneur en glucose est deux fois plus importante que celle mesurée pour Col-0 et ceci tout au long de la cinétique. Ceci suggère que la répression du gène

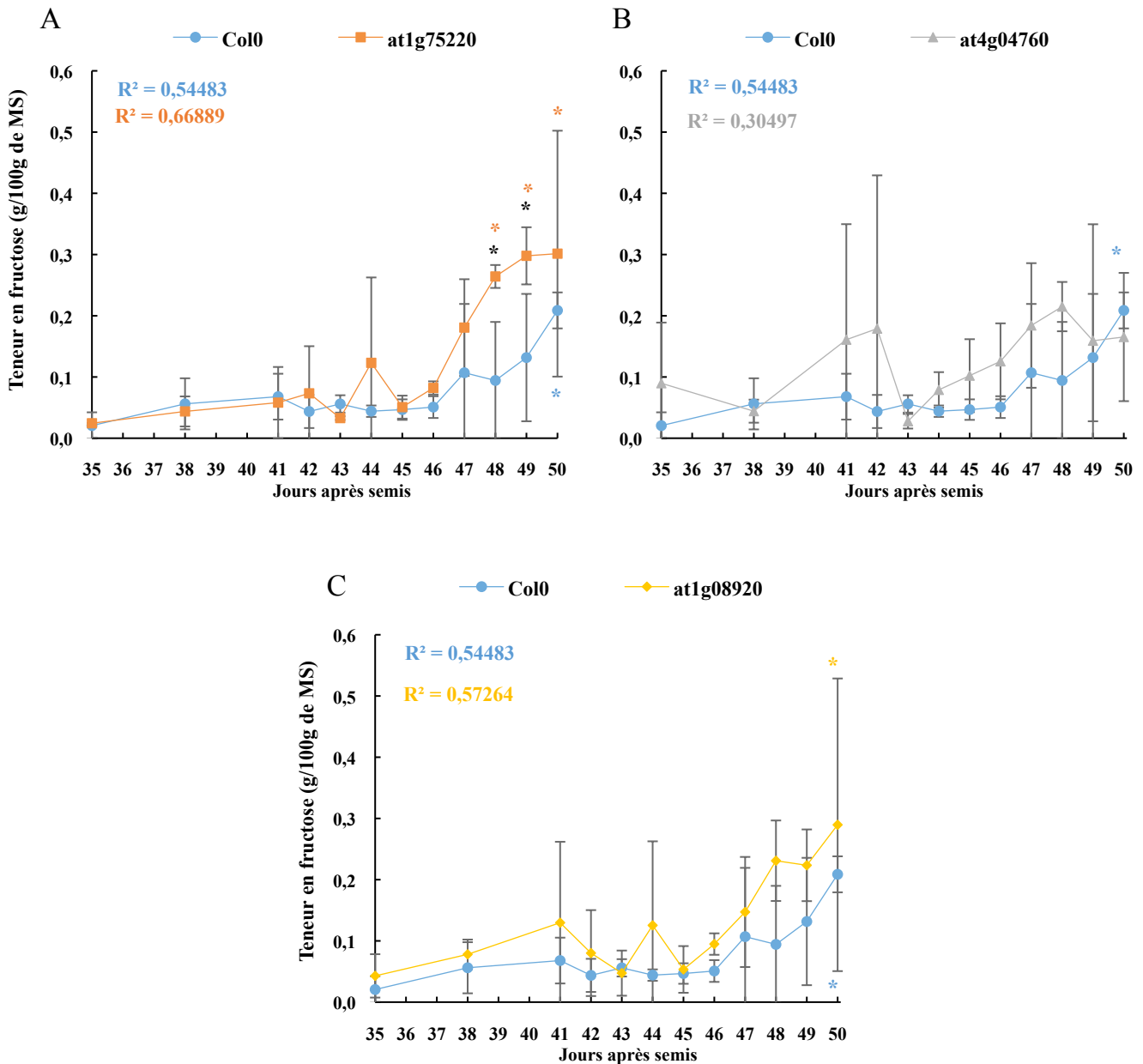


Figure 96 : teneur en fructose dans les rosettes de Col-0 et des mutants d'insertion *at1g75220*, *at4g04760* et *at1g08920*, chez les plantes arrosées. Pour Col-0 à 48 et 49 jours après semis, 2 répétitions biologiques ont été effectuées sur à chaque fois un pool de 5 demi-rosettes. Les valeurs représentent donc les moyennes de 2 répétitions biologiques. Pour les autres jours de prélèvement et les 3 mutants d'insertion, 3 répétitions biologiques ont été effectuées sur à chaque fois un pool de 5 demi-rosettes. Les valeurs représentent donc les moyennes de 2 répétitions biologiques. Les astérisques de couleur correspondent à une différence significative dans les feuilles du mutant concerné par rapport aux autres jours, déterminée par le test de Kruskal-Wallis, suivi d'un test de Dunn de comparaisons multiples (p -value $<0,05$). Les astérisques noires correspondent à une différence significative entre la valeur de teneur en fructose dans les feuilles du mutant et celle de Col-0, déterminée par le test de Mann-Whitney (p -value $<0,05$).

At1g75220 conduit à une augmentation de la teneur en glucose libre dans les feuilles en condition normale d'arrosage.

Pour le mutant *at1g75220* (figure 96 A), de 35 à 47 jours après semis, la teneur en fructose dans les feuilles est stable et similaire à la teneur en fructose mesurée pour Col-0. Les valeurs s'échelonnent de $0,02 \pm 0,04$ à $0,18 \pm 0,08$ g/100 g de MS pour *at1g75220*. Quarante-huit jours après semis, la teneur en fructose augmente dans les feuilles du mutant *at1g75220* et atteint une valeur maximale de $0,30 \pm 0,20$ g/100 g de MS, 50 jours après semis. La teneur en fructose dans les feuilles du mutant *at1g75220* est significativement plus élevée que pour Col-0, 48 et 49 jours après semis (2,8 et 2,2 fois, respectivement). Cinquante jours après semis, la teneur en fructose dans les feuilles de Col-0 et du mutant *at1g75220* est similaire.

Pour le mutant *at4g04760* (figure 96 B), de 35 à 50 jours après semis, la teneur en fructose dans les feuilles est similaire à celle qui a été mesurée pour le sauvage Col-0. En effet, les valeurs pour le mutant sont stables et s'échelonnent de $0,03 \pm 0,01$ à $0,22 \pm 0,04$ g/100g de MS. Cinquante jours après semis, la teneur en fructose chez ce mutant atteint une valeur de $0,17 \pm 0,10$ g/100g de MS ce qui est similaire à ce qui a été mesuré chez Col-0.

Pour le mutant *at1g08920* (figure 96 C), de 35 à 47 jours après semis, la teneur en fructose est stable et s'échelonne de $0,04 \pm 0,07$ à $0,23 \pm 0,06$ g/100 g de MS. Les écarts types étant importants, ces valeurs ne peuvent pas être considérées comme supérieures à celles de Col-0. Une augmentation de la teneur en fructose, est observée comme pour Col-0 et la teneur maximale en fructose dans les feuilles des plantes arrosées du mutant *at1g08920* est de $0,28 \pm 0,24$ g/100 g de MS, 50 jours après semis.

En conclusion, la teneur en fructose dans les feuilles des plantes arrosées est stable jusqu'à 46 jours après semis chez les mutants, comme chez Col-0, puis elle augmente légèrement et devienne statistiquement plus importante à partir de 48 jours après semis pour le mutant *at1g75220*, valeurs significativement plus importante que pour Col-0 à 48 et 49 jours après semis. L'augmentation de la teneur en fructose vers la fin de la cinétique dans les feuilles des plantes arrosées est donc plus précoce et plus rapide chez le mutant *at1g75220* que chez le sauvage Col-0. Pour le mutant *at1g08920*, l'augmentation de la teneur en fructose dans les feuilles des plantes arrosées a lieu, comme pour Col-0, 50 j après semis. Pour le mutant *at4g04760*, cette augmentation n'a pas été supportée statistiquement.

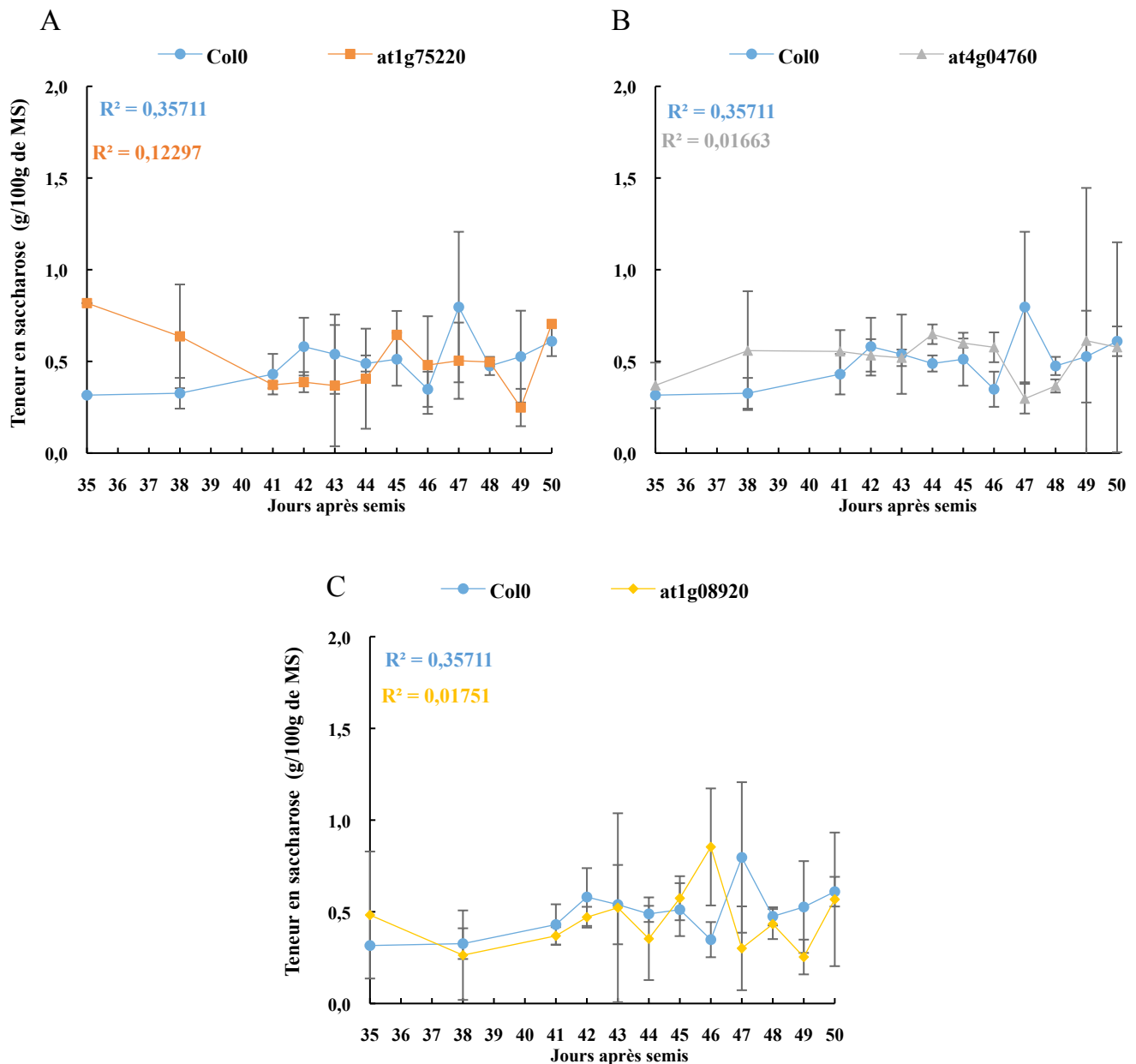


Figure 97: teneur en saccharose dans les rosettes de Col-0 et des mutants d'insertion *at1g75220*, *at4g04760* et *at1g08920*, chez les plantes arrosées. Pour Col-0 à 48 et 49 jours après semis, 2 répétitions biologiques ont été effectuées sur à chaque fois un pool de 5 demi-rosettes. Les valeurs représentent donc les moyennes de 2 répétitions biologiques. Pour les autres jours de prélèvement et les 3 mutants d'insertion, 3 répétitions biologiques ont été effectuées sur à chaque fois un pool de 5 demi-rosettes. Les valeurs représentent donc les moyennes de 2 répétitions biologiques. Les astérisques de couleur correspondent à une différence significative dans les feuilles du mutant concerné par rapport aux autres jours, déterminée par le test de Kruskal-Wallis, suivi d'un test de Dunn de comparaisons multiples (p -value $<0,05$). Les astérisques noirs correspondent à une différence significative entre la valeur de teneur en glucose dans les feuilles du mutant et celle de Col-0, déterminée par le test de Mann-Whitney (p -value $<0,05$).

Pour Col-0, nous avons montré que la teneur en saccharose dans les feuilles des plantes arrosées est stable (de 0,32 à 0,79 g/ 100 g de MS) entre 35 et 50 jours après semis (figure 60 C, figure 97).

Pour le mutant *at1g75220* (figure 97 A), de 35 à 50 jours après semis, la teneur en saccharose dans les feuilles est stable et similaire à celle mesurée chez Col-0. Les valeurs s'échelonnent de $0,25 \pm 0,10$ à $0,65 \pm 0,13$ g/100 g de MS pour *at1g75220*.

Pour le mutant *at4g04760* (figure 97 B), de 35 à 50 jours après semis, la teneur en saccharose dans les feuilles est équivalente à celle mesurée dans Col-0. Les valeurs pour le mutant sont stables et s'échelonnent de $0,30 \pm 0,08$ à $0,65 \pm 0,05$ g/100g de MS.

Pour les mutant *at1g08920* (figure 97 C), de 35 à 50 jours après semis la teneur en saccharose est stable et s'échelonne de $0,25 \pm 0,09$ à $0,85 \pm 0,32$ g/100 g de MS.

En conclusion, les teneurs en saccharose dans les feuilles des plantes arrosées sont stables entre 35 et 50 jours après semis chez les mutants, tout comme ce qui avait été constaté chez Col-0. Il n'y a pas de différence d'accumulation du saccharose dans les feuilles des plantes arrosées, quel que soit le génotype étudié.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié les possibles conséquences de la suppression d'un des 3 gènes *AtERD6-like* sur la teneur en sucres dans les feuilles de plantes non arrosées pendant 15 jours. Les teneurs en sucres ont été mesurées entre 35 et 50 jours après semis, c'est-à-dire lors des 15 jours de carence hydrique (de J0 à J15) et après réhydratation. Les résultats ont été exprimés, dans les figures suivantes, en fonction des 4 phases de réponse des plantes non arrosées, déterminées précédemment.

Pour le mutant *at1g75220*, le même modèle d'accumulation du glucose dans les feuilles est observé (figure 98 A), à savoir une augmentation débutant en phase 2 (passage de $0,99 \pm 0,41$ g/100 g de MS en phase 1 à $1,67 \pm 0,88$ g/100g de MS en phase 2), une accumulation maximale de glucose en phase 3 ($2,96 \pm 0,38$ g/100g de MS) stagnant en début de phase 4 ($2,81 \pm 1,15$ g/100g de MS) et diminuant légèrement en fin de phase 4 ($1,31 \pm 0,39$). Les plantes réhydratées ont une teneur en glucose semblable aux plantes non arrosées

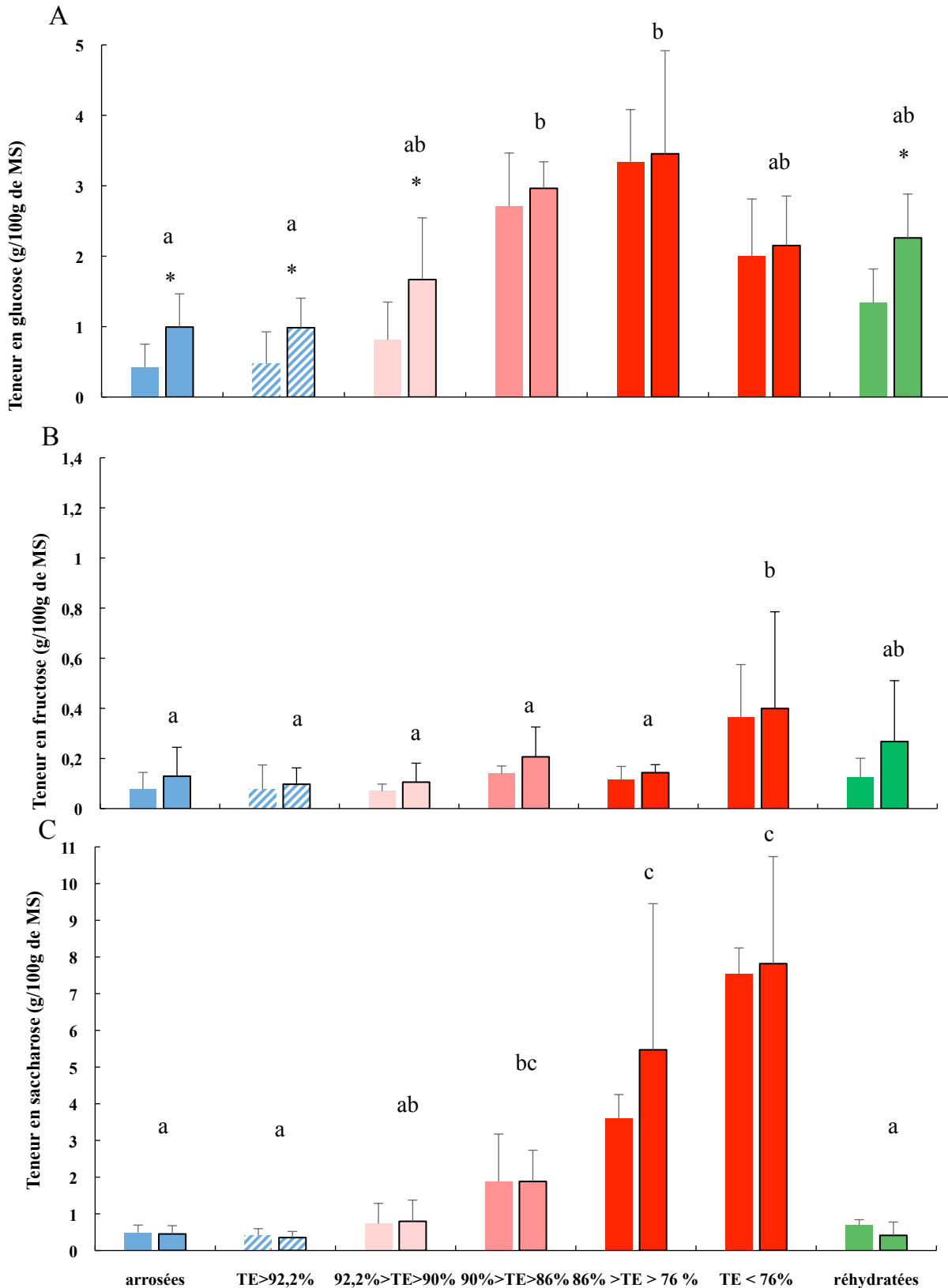
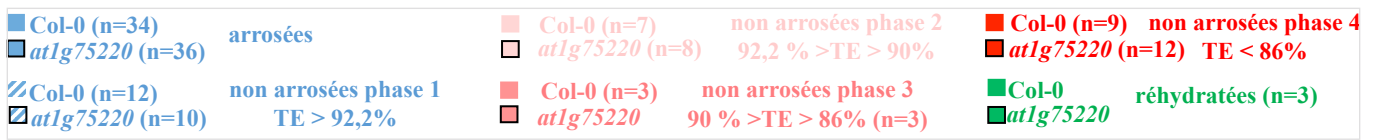


Figure 98: comparaison de la teneur en glucose, en fructose et en saccharose dans les feuilles du sauvage Col-0 et du mutant *at1g75220* d'*Arabidopsis thaliana*, chez les plantes arrosées, non arrosées et réhydratées. Les valeurs représentent la moyenne de 3 répétitions biologiques (\pm écart type). Des lettres différentes représentent des groupes de valeurs statistiquement différentes déterminées par un test de Kruskal-Wallis (p .value < 0,05) pour le mutant *at1g75220*. Les astérisques représentent des valeurs différentes entre le sauvage Col-0 et le mutant, déterminées par des test de comparaisons deux à deux de Mann-Whitney (p .value < 0,05).

en phase 2 ($2,26 \pm 0,62$ g/100g de MS). La teneur en glucose évolue donc de la même manière que pour Col-0, cependant, elle est significativement plus importante dans les rosettes des plantes arrosées du mutant *at1g75220* que de Col-0 ($0,99 \pm 0,47$ g/100g de MS contre $0,43 \pm 0,33$ g/100 g de MS soit 2,3 fois plus), ainsi que dans les rosettes des plantes non arrosées en phase 1 ($0,99 \pm 0,42$ g/100g de MS contre $0,47 \pm 0,45$ g/100g de MS soit 2,1 fois plus) et des plantes non arrosées en phase 2 ($1,67 \pm 0,88$ g/100 g de MS contre $0,81 \pm 0,54$ g/100g de MS soit 2,1 fois plus). A partir de la phase 3, lors de la carence sévère en eau, la teneur en glucose dans les feuilles des plantes non arrosées est identique entre le mutant *at1g75220* et Col-0. Il en est de même pour les plantes réhydratées (figure 98 A). La mutation du gène *At1g75220* conduit donc à une augmentation de la teneur en glucose dans les feuilles des plantes arrosées et non arrosées en carence modérée ($92,2\% < TE < 90\%$), au moins jusqu'à 12 jours de carence. Cette différence de teneur en glucose n'est plus observable lorsque la plante subit une carence en eau plus sévère.

La teneur en fructose (figure 98 B) dans les feuilles augmente de façon significative en fin de phase 4 : $0,14 \pm 0,03$ g de fructose / 100 g de MS en début de phase 4 et $0,40 \pm 0,39$ g de fructose / 100g de MS en fin de phase 4, soit une augmentation de 2,9 fois. De plus, il n'y a pas de différence significative entre les valeurs des teneurs en fructose dans les feuilles des plantes arrosées, non arrosées et réhydratées du mutant *at1g75220* du mutant *at1g75220* avec celles (figure 98 B). Les plantes réhydratées du mutant *at1g75220* ont une teneur en fructose ($0,28 \pm 0,24$ g/100g de MS) semblable à celle des plantes mutantes non arrosées en phase 3 et des plantes Col-0 réhydratées (figure 98 B). La teneur en fructose évolue donc de la même manière que chez Col-0. La mutation du gène *At1g75220* n'affecte donc pas la teneur en fructose dans les feuilles.

Le même modèle d'accumulation du saccharose dans les feuilles du mutant *at1g75220* et est observé par rapport à Col-0, à savoir une augmentation progressive débutant en phase 2 et maximale en phase 4 lorsque les plantes ont une teneur en eau inférieure à 76% ($0,35 \pm 0,17$ g/100 g de MS en phase 1 et $7,81 \pm 2,92$ g/100g de MS en fin de phase 4). Les plantes réhydratées ont une teneur en saccharose ne pouvant être différenciée de celle des rosettes des plantes arrosées et non arrosées en phases 1 et 2 ($0,41 \pm 0,36$ g/100g de MS) (figure 98 C). La teneur en saccharose évolue donc de la même manière que chez Col-0 et les valeurs obtenues ne sont pas différentes. La mutation du gène *At1g75220* n'affecte donc pas la teneur en saccharose dans les feuilles.

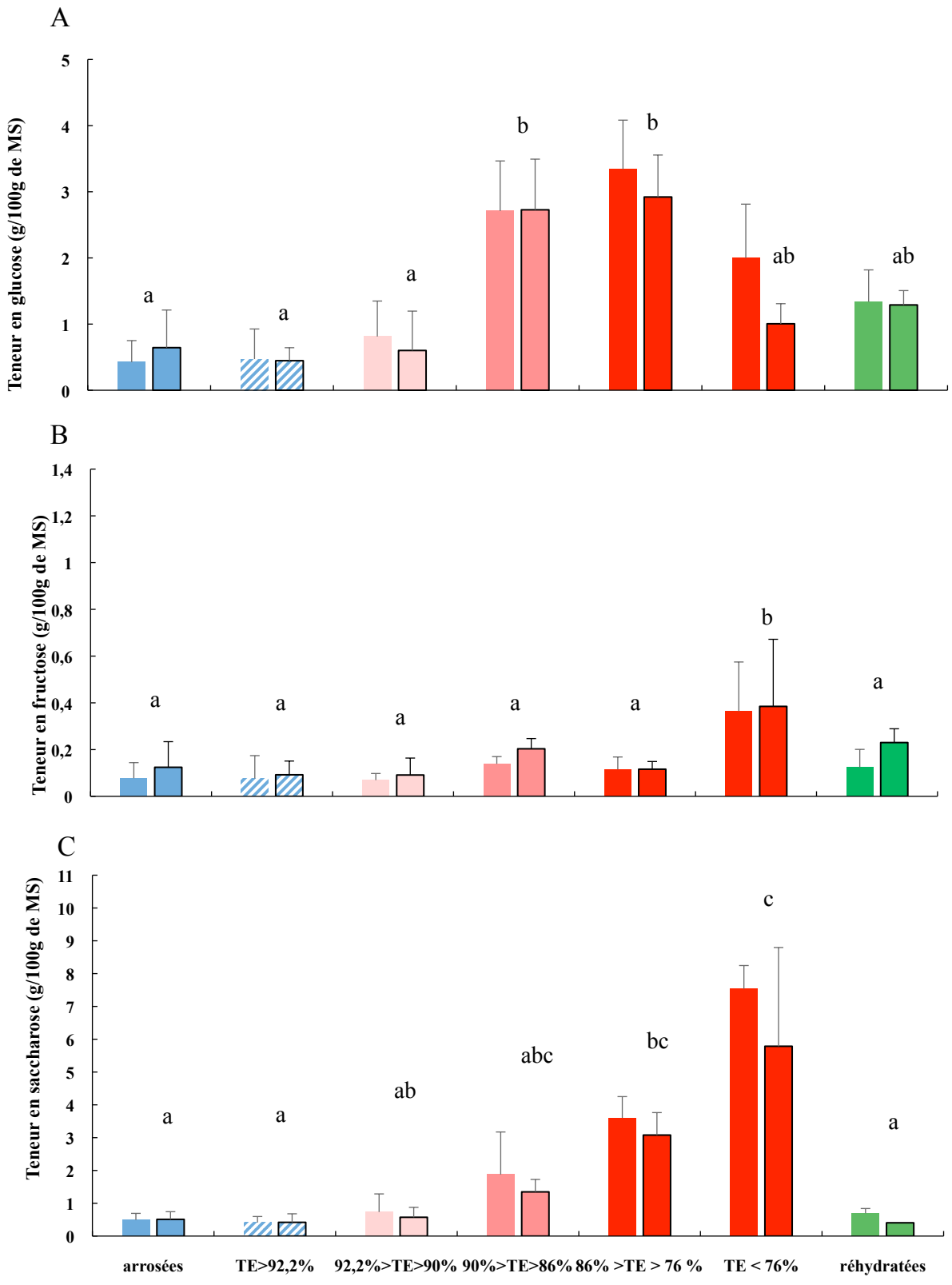
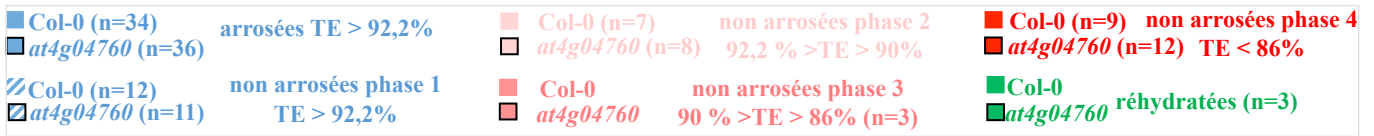


Figure 99 : comparaison de la teneur en glucose, en fructose et en saccharose dans les feuilles du sauvage Col-0 et du mutant at4g04760 d'Arabidopsis thaliana, chez les plantes arrosées, non arrosées et réhydratées. Les valeurs représentent la moyenne de 3 répétitions biologiques (± écart type). Des lettres différentes représentent des groupes de valeurs statistiquement différentes déterminées par un test de Kruskal-Wallis (p.value < 0,05) pour le mutant at4g04760. Des tests de Mann-Whitney de comparaisons de valeurs deux à deux n'ont pas permis de déterminer de différence statistique entre les valeurs pour Col-0 et le mutant at4g04760.

Pour le mutant *at4g04760* (figure 99 A), la teneur en glucose dans les feuilles n'augmente significativement qu'à partir de la phase 3 ($2,731 \pm 0,77$ g/100g de MS) et elle semble se maintenir à un niveau similaire en début de phase 4 ($2,92 \pm 0,63$ g/100g de MS) et diminuer de plus de la moitié en fin de phase 4 ($1,00 \pm 0,30$ g/100 g de MS). Pour les plantes réhydratées, la teneur en glucose n'est pas significativement différente de celles mesurées pour les phases 2, 3 et 4 même si une diminution semble présente par rapport à la phase 3 de la carence ($1,29 \pm 0,22$ g/100g de MS) (figure 99 A). La teneur en glucose évolue donc sensiblement de la même manière que pour Col-0 et les valeurs sur chacune des phases, chez les plantes arrosées, non arrosées et réhydratées sont similaires pour Col-0 et *at4g04760* (figure 99 A). Nous pouvons donc considérer que la mutation du gène *At4g04760* n'affecte donc pas la teneur en glucose dans les feuilles.

Le même modèle d'accumulation du fructose dans les feuilles est observé par rapport à Col-0 (figure 99 B), à savoir une augmentation de la teneur en fructose dans les feuilles en fin de phase 4 : $0,12 \pm 0,03$ g de fructose / 100 g de MS en début de phase 4 et $0,38 \pm 0,29$ g de fructose / 100g de MS en fin de phase 4, soit une augmentation de 3,2 fois. Les plantes réhydratées ont une teneur en fructose semblable à la teneur en fructose des feuilles des plantes arrosées en phase 3 ($0,23 \pm 0,05$ g/100g de MS) (figure 99 B). La teneur en fructose évolue donc de la même manière que chez Col-0 et les valeurs sur chacune des phases, chez les plantes arrosées, non arrosées et réhydratées sont similaires pour Col-0 et *at4g04760* (figure 99 B). La mutation du gène *At4g04760* n'affecte donc pas la teneur en fructose dans les feuilles.

L'accumulation du saccharose dans les feuilles du mutant (figure 99 C) est progressive, elle débute en phase 2, et est maximale en fin de phase 4 ($0,42 \pm 0,26$ g/100 g de MS en phase 1 et $5,79 \pm 3,01$ g/100g de MS en fin de phase 4). Les plantes réhydratées ont une teneur en saccharose ne pouvant être différenciée de celle des rosettes des plantes arrosées et non arrosées en phases 1 et 2 ($0,41$ g/100g de MS) (figure 99 C). La teneur en saccharose évolue donc de la même manière que dans les rosettes des plantes Col-0 et les valeurs obtenues ne sont pas différentes. La mutation du gène *At4g04760* n'affecte donc pas la teneur en saccharose dans les feuilles.

Pour le mutant *at1g08920* (figure 100 A), l'accumulation du glucose dans les feuilles est observée en phase 2 ($1,32 \pm 0,84$ g/100g de MS), en phase 3 ($1,91 \pm 1,08$ g/100g de MS) et en début de phase 4, phase pour laquelle la concentration est la plus élevée ($2,91 \pm 1,15$ g/100g de MS). Le teneur en glucose chute en fin de phase 4 ($1,30 \pm 0,39$. g/100g de MS).

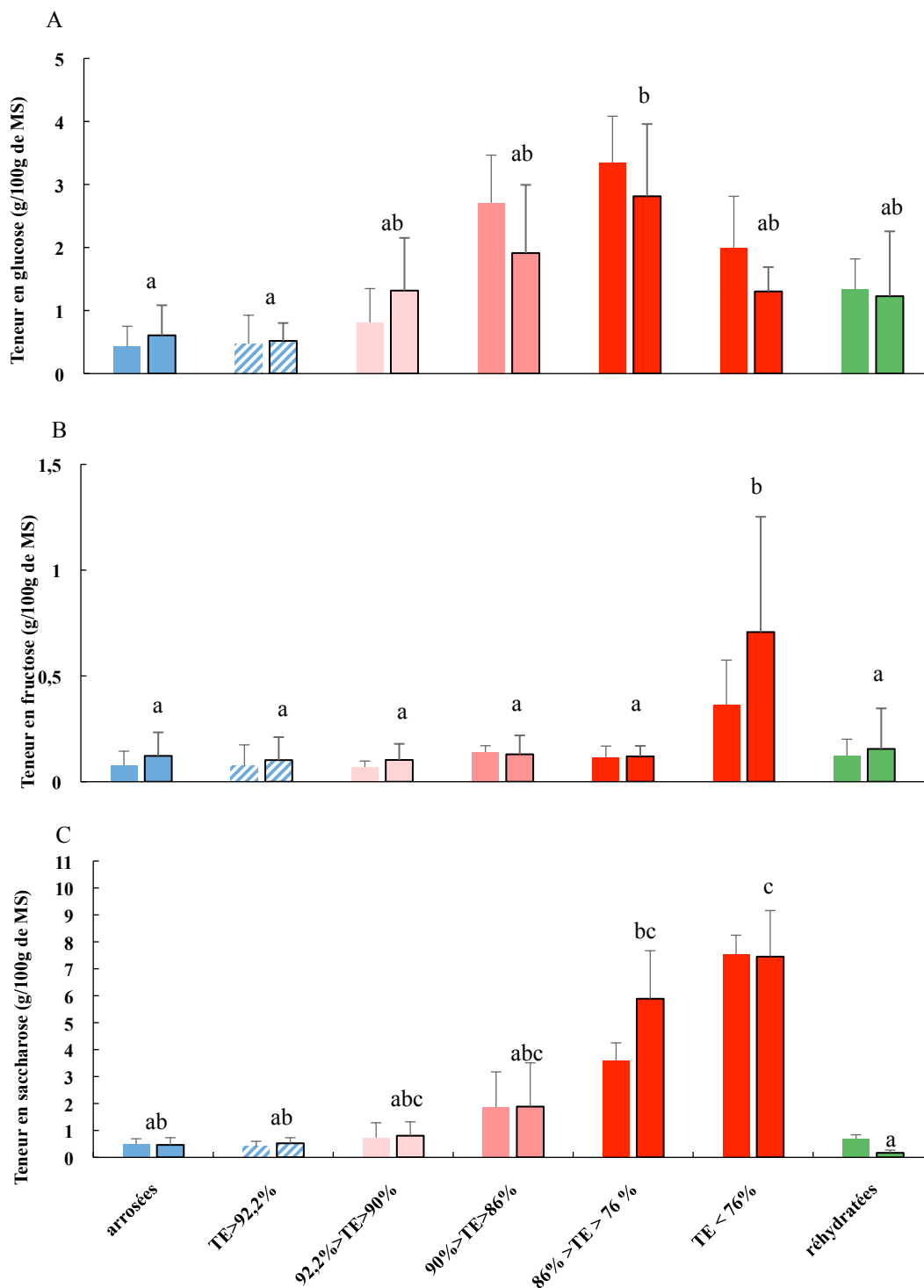
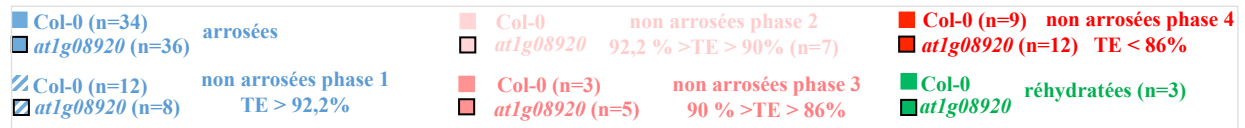


Figure 100 : comparaison de la teneur en glucose, en fructose et en saccharose dans les feuilles du sauvage Col-0 et du mutant *at1g08920* d'*Arabidopsis thaliana*, chez les plantes arrosées, non arrosées et réhydratées. Les valeurs représentent la moyenne de 3 répétitions biologiques (\pm écart type). Des lettres différentes représentent des groupes de valeurs statistiquement différentes déterminées par un test de Kruskal-Wallis (p .value < 0,05) pour le mutant *at1g08920*. Des tests de Mann-Whitney de comparaisons de valeurs deux à deux n'ont pas permis de déterminer de différence statistique entre les valeurs pour Col-0 et le mutant *at1g08920*.

Les plantes réhydratées ont une teneur en glucose semblable aux plantes non arrosées en phase 2 ($1,23 \pm 1,02$ g/100g de MS) (figure 100 A). La teneur en glucose évolue donc de la même manière que pour Col-0 et les valeurs à chacune des phases, chez les plantes arrosées, non arrosées et réhydratées sont similaires pour Col-0 et *at1g08920* (figure 100 A). La mutation du gène *At1g08920* n'affecte donc pas la teneur en glucose dans les feuilles.

L'accumulation du fructose dans les feuilles est observée (figure 100 B) en fin de phase 4 : $0,12 \pm 0,05$ g de fructose / 100 g de MS en début de phase 4 et $0,71 \pm 0,54$ g de fructose / 100g de MS en fin de phase 4, soit une augmentation de 5,9 fois. Les plantes réhydratées ont une teneur en fructose semblable aux plantes arrosées et non arrosées en phase jusqu'en phase 3 ($0,16 \pm 0,20$ g/100g de MS) (figure 100 B). La teneur en fructose évolue donc de la même manière que pour Col-0 et les valeurs sur chacune des phases, chez les plantes arrosées, non arrosées et réhydratées sont similaires pour Col-0 et *at1g08920* (figure 100 B). La mutation du gène *At1g08920* n'affecte donc pas la teneur en fructose dans les feuilles.

L'accumulation progressive du saccharose dans les feuilles est observé (figure 100 C) dès la phase 2 et elle devient maximale en fin de phase 4 ($0,53 \pm 0,21$ g/100 g de MS en phase 1 et $7,45 \pm 1,71$ g/100g de MS en fin de phase 4). Les plantes réhydratées ont une teneur en saccharose ne pouvant être différenciée de celle des rosettes des plantes arrosées et non arrosées en phases 1 et 2 ($0,17 \pm 0,10$ g/100g de MS) (figure 100 C). La teneur en saccharose évolue donc de la même manière que pour Col-0 et les valeurs obtenues ne sont pas différentes (figure 100 C). La mutation du gène *At1g08920* n'affecte donc pas la teneur en saccharose dans les feuilles.

En conclusion, la comparaison de l'évolution de l'accumulation de fructose et de saccharose dans les rosettes des plantes arrosées et non arrosées des 3 mutants et de Col-0 pour ne met en évidence aucune différence lors de chacune des 4 phases de la carence en eau ainsi que lors de la réhydratation (figures 98 B, 99 B et 100 B ; figures R mutants 98 C, 99 C et 100 C). Il semble donc qu'aucun des 3 gènes étudiés ne soit impliqués dans l'augmentation de la teneur en fructose en fin de phase 4, ni dans l'augmentation progressive de la teneur en saccharose en cours de carence hydrique. A l'inverse, la comparaison de l'évolution de l'accumulation de glucose dans les rosettes des plantes arrosées, non arrosées à chacune des 4 phases de la carence en eau et lors de la réhydratation pour les 3 mutants montre que le mutant *at1g75220* se comporte différemment (figures 98 A, 99 A et 100 A) de Col-0. En effet, la teneur en glucose dans les rosettes des plantes arrosées et non arrosées en phase 1 et

en phase 2 est plus importante pour *at1g75220* que pour les 3 autres lignées. Ces observations montrent que la mutation du gène *At1g75220* conduit à une augmentation de la teneur en glucose dans les feuilles jusqu'en phase 2 du déficit hydrique (carence modérée en eau : $92,2\% < TE < 90\%$) mais qu'il ne semble pas être impliqué dans l'augmentation de la teneur en glucose dans les feuilles en phase 3 et 4 (carence sévère : $90\% < TE < 86\%$).

5.8 Discussion

Afin d'essayer de déterminer le rôle de 3 gènes induits lors de la carence en eau, nous avons identifié et caractérisé 3 mutants d'insertion. Dans le mutant *at1g75220*, une diminution de l'expression du gène *At1g75220* de 98 % est détectée dans les rosettes en condition normale d'arrosage et celle-ci est de 99% en condition de déficit hydrique. Nous pouvons donc considérer ce mutant comme un mutant *knock-out*. A l'inverse, la réduction du niveau d'expression des gènes *At4g04760* et *At1g08920* dans les deux autres mutants correspondant n'est pas totale et une expression résiduelle est encore détectable en RT-qPCR. Cependant cela n'implique pas forcément que des protéines soient traduites et fonctionnelles. Pour les 3 mutants étudiés, même si la répression de l'expression dans les feuilles des plantes arrosées n'est pas toujours complète, l'induction de ces gènes observée pour Col-0 n'est plus observable dans les feuilles des plantes non arrosées.

Les trois mutants étudiés présentent globalement le même comportement physiologique que l'écotype sauvage Col-0 dans des conditions normales d'arrosage, de carence en eau et de réhydratation. Dans les conditions de déficit hydrique, les quatre phases de réponse à la carence en eau déterminées pour Col-0 ont donc pu être définies de la même façon pour les trois mutants. Ainsi, aucun de ces mutants ne présentent de réponse particulière vis-à-vis de la carence en eau, ils ne présentent aucune sensibilité ou résistance accrues vis-à-vis du déficit hydrique. L'absence de phénotype particulier pour les 3 mutants suggère que les 3 gènes étudiés, bien qu'ils soient induits lors du déficit hydrique, ne jouent pas vraisemblablement de rôle capital dans la réponse au déficit hydrique. Compte-tenu que ces 3 gènes appartiennent à une famille multigénique, nous pouvons toutefois supposer que d'autres gènes *ERD6-like* compensent leur délétion. Dans les 3 lignées mutantes, des modifications de l'expression des autres *ERD6-like* testés ont été observées, en conditions de carence en eau. L'induction du gène *At1g08920* en phase 2 (carence en eau modérée) est retardée dans le mutant *at4g04760* en phase 3 (carence en eau sévère) et dans le mutant *at1g075220* en phase

4 (phase de flétrissement). A l'inverse l'induction tardive en phase 4 d'*At1g75220* n'est pas modifiée dans les mutants *at4g04760* et *at1g08920*. Dans le mutant *at1g75220*, la répression du gène en tandem *At1g19450* en phase 2 est retardée en phase 3 et l'induction du gène *At1g08890* semble être légèrement supérieure en phase 4. Dans le mutant *at1g08920* la répression du gène en tandem *At1g08930* en phase 1 est retardée en phase 2. Ces observations peuvent suggérer d'éventuels processus de co-régulation des gènes *ERD6-like* lors de la carence hydrique, mais ne permettent pas de définir que l'expression d'un gène *ERD6-like* pourrait être modifiée de façon à compenser l'absence des gènes mutés dans les différents mutants étudiés.

Le principal résultat obtenu par l'étude des simples mutants *aterd6-like* concerne le mutant *at1g75220*. Pour ce mutant, une accumulation de glucose dans les feuilles de rosette des plantes arrosées et non arrosées en phase 1 et en phase 2 (carence modérée en eau) est observée. La teneur en glucose est deux fois plus importante que pour les 3 autres lignées (figures 98 A, 99 A et 100 A). Toutefois, l'augmentation de la teneur en glucose en phases 3 et 4 n'est pas affectée dans ce mutant. Ces observations montrent que le gène *At1g75220* (*AtERDL6*) ne semble pas être impliqué dans l'augmentation de la teneur en glucose en phase 3 et 4 (carence sévère et flétrissement) mais qu'à l'inverse, il doit permettre de réguler à la baisse la teneur en glucose, dans les cellules des plantes arrosées et des plantes en carence en eau modérée, jusqu'à la fermeture des stomates. L'augmentation de la teneur en glucose dans le mutant *at1g75220* corrobore des données de la littérature (Poschet et al. 2011) qui décrivent que dans le même mutant nommé *aterdl6*, l'augmentation de la teneur en glucose observée est surtout liée à l'augmentation du glucose dans la vacuole. De plus, il a été montré que dans des conditions qui nécessitent une rapide utilisation de l'énergie stockée (export des sucres de la vacuole) telles que le passage de la lumière à l'obscurité, l'augmentation de la température de 23°C à 37°C ainsi que des blessures, augmentent l'expression du gène *AtERDL6*. A l'inverse, les processus qui conduisent à l'accumulation des sucres dans les vacuoles, tels qu'une baisse des températures ou des concentrations extérieures en glucose et en saccharose élevées, induisent une répression d'*AtERDL6*. Ces observations associées à la caractérisation de *AtERDL6* comme un symporteur H⁺/glucose (Klemens et al. 2013) a donc démontré que la régulation de l'expression d'*AtERDL6* est en corrélation avec l'état glucidique des cellules qui requiert l'accès au pool des sucres vacuolaires (Poschet et al. 2011) et que le transporteur *AtERDL6* était responsable de l'export du glucose de la vacuole vers le cytosol, dans ces conditions. Sur la base de ces données de la littérature et considérant que dans Col-0, d'une part *At1g75220* est induit en fin de phase 4 (TE < 76 % : flétrissement,

voire sénescence) et d'autre part que dans cette phase la teneur en glucose diminue, nous pouvons, suggérer que *AtERDL6* pourrait jouer un rôle dans l'export du glucose de la vacuole, permettant la remobilisation de cet hexose en réponse à un déficit hydrique très sévère ayant entraîné le flétrissement de la rosette. Toutefois, dans le mutant *at1g75220*, le glucose s'accumule de la même manière que pour Col-0, et pourtant l'activité du gène *AtERDL6* est amoindrie par la mutation de ce gène. D'autres transporteurs localisés au niveau du tonoplaste pourraient donc également remplir ce rôle d'export du glucose de la vacuole au stade de flétrissement. Parmi les gènes *AtERD6-like* testés, seul *At1g08890* semble être légèrement induit dans le mutant *at1g75220* en fin de phase 4, ce qui pourrait suggérer son implication. De plus, il est intéressant de noter que le gène *At1g08920* qui est induit dans Col-0 dès la phase 2, n'est induit dans le mutant *at1g75220* qu'en fin de phase 4 (phase de flétrissement avancé, TE < 76 %). Ceci suggère que dans le mutant *at1g75220*, l'induction en début de carence hydrique de *At1g08920* pourrait être inhibée par la forte teneur en glucose du mutant et qu'en phase 4, le gène *At1g08920* pourrait peut-être compléter la perte d'expression d'*At1g75220*. Cette hypothèse est soutenue par le fait que *At1g08920* (*AtESLI*) a été caractérisé comme un facilitateur à faible affinité capable de transporter des hexoses (glucose, fructose, galactose, mannose, xylose) par diffusion facilitée (Yamada et al. 2010). Des gènes d'autres familles de transporteurs de monosaccharides pourraient remplir le rôle d'export de glucose de la vacuole à la place d'*AtERDL6*. *AtSWEET 16* et *AtSWEET 17* pourraient par exemple assurer l'export de glucose de la vacuole en phase 4 de carence en eau (flétrissement) lorsqu'*AtERDL6* est muté. Les mutants *atsweet 16* montrent une accumulation de glucose dans les feuilles lors d'un stress froid (Klemens et al., 2013) ce qui montre qu'en effet, *AtSWEET16* pourrait répondre à certains stress abiotiques, en permettant l'export de glucose de la vacuole.

Conclusion & Perspectives

Un des défis sociétaux actuels concerne l'augmentation de la productivité des plantes d'intérêt agronomique face aux changements climatiques. De manière remarquable, les pertes de rendement dues aux stress abiotiques, à l'exemple de la carence en eau, s'échelonnent de 50% à plus de 80% et dépassent les pertes liées aux stress biotiques. En termes de recherche fondamentale, les réponses à la sécheresse des plantes modèles ou agronomiques, ont longtemps été étudiées *via* l'évaluation de la tolérance par leur survie à un stress hydrique sévère. Cependant cette tolérance/survie n'entraîne ni une meilleure croissance, ni le maintien ou le gain de rendement. Depuis le début de la décennie, la vision des chercheurs a changé et les gènes permettant l'augmentation du rendement (biomasse et graines) en conditions de stress hydrique modéré sont devenus des cibles tangibles de ce défi (Skirycz et al. 2011). Bien que plus de mille gènes soient connus pour être impliqués dans la réponse à la sécheresse, très peu sont caractérisés pour induire la tolérance au stress hydrique, tout en augmentant le rendement des plantes modèles ou d'intérêt agronomique.

Dans ce contexte, mes travaux de thèse ont été dédiés à l'étude des transporteurs de monosaccharides ERD6-like (Early Response to Dehydration 6 - like) dont les premiers représentants ont été décrits comme étant régulés en réponse à la déshydratation et d'autres contraintes abiotiques. Forts de la mise en évidence par l'équipe SEVE des multiples copies en tandem de gènes *ERD6-like* sur le chromosome 14 de la vigne et des compétences avérées en génomique évolutive de l'équipe EES, le premier objectif a porté sur l'histoire évolutive de ces transporteurs. L'étude de l'évolution des ERD6-like réalisée durant ma thèse est la première analyse phylogénétique aussi complète de cette famille de transporteurs de monosaccharides, ayant l'atout d'être représentative du Règne Végétal, des algues jusqu'aux Angiospermes. Pour la première fois une approche de génomique évolutive a été introduite dans l'équipe SEVE, afin de faire le lien entre l'évolution d'une famille de gènes de transporteurs de sucres et leurs fonctions physiologiques.

Le premier résultat marquant issu de nos travaux réside dans le fait qu'à présent, nous sommes en mesure d'émettre l'hypothèse de l'émergence des ERD6-like chez les plantes terrestres. Cette hypothèse s'assoit d'une part sur nos résultats montrant qu'aucun ERD6-like n'a été identifié dans les génomes des 11 algues étudiées (figure 18). D'autre part, elle est confortée par la présence indéniable d'ERD6-like dans chacune des 47 Embryophytes analysées, avec pour un nombre total de 519 séquences, au minimum 2 copies par espèce (tableau 7). Eu égard de l'ampleur de l'étude, force est de reconnaître que le niveau élevé de la stringence imposée lors de l'identification des ERD6-like aurait pu empêcher

l'identification, chez les algues, de transporteurs de monosaccharides ayant une faible homologie avec les ERD6-like des Embryophytes. Toutefois, la véracité de notre hypothèse est renforcée par le fait que des transporteurs proches des transporteurs de monosaccharides (Sauer and Tanner, 1989 ; Caspari et al., 1994 ; Johnson et al., 2006) et de saccharose (Reinders et al., 2012, Peng et al., 2014) ont été identifiés chez les algues, mais que dans tous les cas, leurs séquences protéiques présentant une faible homologie avec celles des transporteurs d'Embryophytes restent toujours à la base des groupes monophylétiques, sans s'intégrer dans aucune des familles ou sous-familles de transporteurs de sucres des plantes terrestres. Ceci suggère qu'il existe bel et bien un système permettant le transport d'hexoses et de saccharose chez les algues mais qu'il est différent de celui des Embryophytes et conforte l'idée de l'émergence des transporteurs ERD6-like chez les Embryophytes, tout comme celle des membres des autres sous-familles des transporteurs de monosaccharides.

Un deuxième apport de notre travail concerne la démonstration que les transporteurs de monosaccharides ERD6-like sont devenus une large famille chez les Angiospermes et en particulier chez les Eudicotylédones, grâce à de multiples événements de duplications (Johnson et al., 2006). Nos résultats appuyés sur les données de la littérature arguent en faveur du fait que les *ERD6-like* auraient subi deux événements majeurs de duplication de génomes entiers, le premier chez l'ancêtre commun des Gymnospermes et des Angiospermes (Jiao et al., 2011 ; Jiao et al., 2012, Van de Peer et al., 2011, Van de Peer et al., 2017) et le second, chez l'ancêtre commun de Angiospermes. De plus, chez certaines Eudicotylédones (Vitales, Eurosidiées, Solanales), la famille des transporteurs ERD6-like a connu une expansion remarquable, certainement par des phénomènes de duplication variés. L'élaboration de l'arbre phylogénétique des 519 ERD6-like identifiés dans les protéomes des 47 Embryophytes a clairement mis en évidence l'existence de trois groupes monophylétiques (figure 19). Le groupe 1 contient des séquences de chacune des Embryophytes étudiées et de ce fait, les copies ERD6-like dérivées des plus anciennes copies, présentes dans le génome de *P. patens* (Bryophyte), de *S. moellendorffii* (Lycophyte) et de *P. taeda* (Gymnosperme). Le groupe IIa correspondrait au 1^e événement de duplication identifié chez l'ancêtre des plantes à graines ou Spermatophytes. Le groupe IIb qui, ne comprend uniquement que des séquences de Mésangiospermes, correspondrait au 2^e événement de duplication chez l'ancêtre des Mésangiospermes. Ce groupe IIb peut être découpé en 3 sous-groupes dont l'un (IIb3) est spécifique des Vitales, Solanales et certains ordres d'Eurosidiées présentant de nombreuses duplications en tandem (figure 22). Ces copies pourraient avoir une origine plus récente et

pourraient être apparues chez l'ancêtre commun des Vitales et des Eurosidées, à l'exemple de l'événement d'hexaploïdisation ayant eu lieu chez l'ancêtre de la vigne et laissant des traces dans la majorité des génomes d'Eudicotylédones (Jaillon et al., 2007 ; Tang et al., 2008 ; Jiao et al., 2012). Toutefois, des duplications segmentales peuvent aussi expliquer cette diversification comme par exemple pour le lin et l'eucalyptus (Wang et al., 2012, Myburg et al., 2014). Enfin, des duplications monogéniques pourraient aussi avoir eu lieu chez les Eurosidées de ce groupe, comme dans le cas des Brassicales). L'analyse des mutations synonymes et non synonymes, par le biais du rapport dN/dS moyen des copies *ERD6-like* du genre *Arabidopsis* (*A. halleri*, *A. lyrata*, *A. thaliana*) en utilisant *C. rubella* comme « out-group » montre que tous les ERD6-like de ces quatre espèces, ayant divergé récemment, sont soumis à une sélection de type purifiante, en faveur de la conservation des protéines et donc de la conservation de la fonction de ces transporteurs. Cependant, il est à noter que la valeur dN/dS des séquences des ERD6-like augmente entre le groupe I (dN/dS = 0,081), le groupe IIa (dN/dS = 0,172) et le groupe IIb (dN/dS = 0,233), suggérant une lente diminution de la pression de sélection, mais sans être encore positive (figure 32). Ce relâchement progressif de la pression de sélection devrait favoriser les phénomènes de sous-fonctionnalisation et d'acquisition de nouvelles fonctions pour les ERD6-like, afin qu'ils puissent assurer des rôles biologiques différentiels.

L'analyse détaillée des 19 ERD6-like de l'espèce modèle *A. thaliana* conforte les hypothèses précédemment citées. Les 19 séquences protéiques se répartissent de façon non équivalente dans les trois groupes phylogénétiques (figure 27). Seulement 2 AtERD6-like sont présents dans le groupe I, il s'agit de At1g19450 et de At1g75220 (AtERDL6). Le niveau d'expression de ces 2 gènes est élevé et constant dans les 5 organes testés (feuilles, racines, boutons floraux, fleurs et siliques) (figure 36) ce qui suggère, que ces transporteurs sont fonctionnels dans chacun des organes testés. Ces résultats sont confortés par les données d'expression, pour d'autres organes, collectées dans la base de données Genevestigator (tableau 15). Ces 2 gènes semblent donc être très conservés, et leur niveau d'expression élevé ainsi que l'absence de spécificité d'expression suggèrent qu'ils sont vraisemblablement essentiels pour les différents organes de la plante. Dans le groupe IIa, les 3 AtERD6-like d'*A. thaliana* (*At3g05150*, *At2g48020*, *At5g18840*) sont faiblement exprimés dans les 5 organes testés (figure 36). Dans nos conditions, seul *At5g18840* montre une expression préférentielle dans les racines. Les données d'expression de Genevestigator indiquent non seulement que l'expression de *At3g05150* est la plus élevée dans les grains de pollen par rapport aux autres

organes mais aussi que c'est le gène *ERD6-like* le plus fortement exprimé dans les grains de pollen (tableau 15). Considérant que les copies du groupe IIa ne sont pas directement dérivées des copies les plus anciennes mais proviennent d'un premier événement de duplication, nous pouvons imaginer que leur faible niveau d'expression pourrait refléter un processus de pseudogénéisation. Les expressions différentielles d'*At3g05150* et d'*At5g18840* dans les grains de pollen et les racines, respectivement, reflètent des fonctions acquises durant la phase de détermination de ces copies (sous-fonctionnalisation éventuelle) conférant certainement des avantages évolutifs à la plante. Les 14 autres *AtERD6-like* sont positionnés dans le groupe IIb dont 1 seul dans le groupe IIb1 (*At1g54730*), 3 dans le groupe IIb2 (*At4g04750*, *At4g04760* et *At3g20460*) et les 10 autres dans le groupe IIb3. Les *AtERD6-like* du groupe IIb montrent des patrons d'expression très divers dans les différents organes d'*A. thaliana* testés (figure 36) ; cette grande variabilité d'expression suggère une acquisition de fonctions nouvelles ou des processus de sous-fonctionnalisation menant vers la diversification des fonctions physiologiques de ces transporteurs de monosaccharides. A l'inverse, l'absence d'expression détectable pour *At3g05155* et *At3g05165*, indique plutôt un processus de pseudogénéisation pour ces deux gènes. De manière générale, l'expression des gènes de transporteurs *ERD6-like*, en conditions normales de culture, montre peu de spécificité d'organe, malgré les différences notables dans leurs niveaux d'expression, ce qui pourrait laisser entrevoir une certaine redondance fonctionnelle. Toutefois, une analyse plus précise de la localisation tissulaire de l'expression de ces gènes pourrait certainement mettre en évidence des différences fines d'expression, à l'image de la localisation des deux gènes dupliqués en tandem *At1g08930* (*AtERD6*) et *At1g08920* (*AtESL1*), tous les deux exprimés dans les organes aériens et dans les racines mais le premier dans le cortex racinaire et le second dans le péricycle et les cellules du parenchyme xylémien (Yamada et al., 2010). La diversification fonctionnelle des transporteurs *ERD6-like* est également parfaitement mise en évidence par la comparaison des niveaux d'expression des gènes *ERD6-like* dupliqués en tandem en conditions de contraintes abiotiques. En effet, l'analyse des données de Genevestigator (annexe 2) a révélé que 9 gènes appartenant aux 3 groupes de l'arbre phylogénétique manifestent une expression différentielle lors du processus de germination *in vitro*, que le froid et le glucose affectent de manière significative les deux gènes du groupe I, que les gènes *At1g08920* et *At1g08930* répondent différemment à l'hypoxie, l'obscurité et le stress salin et que l'ABA et les brassinostéroïdes induisent l'expression des gènes *At1g8920* et *At1g27350* mais ne régulent pas celles de leurs copies en tandem. Enfin, notre étude a mis en évidence que parmi les 12 *AtERD6-like* qui répondent au déficit hydrique, 8 sont réprimés et 4 sont

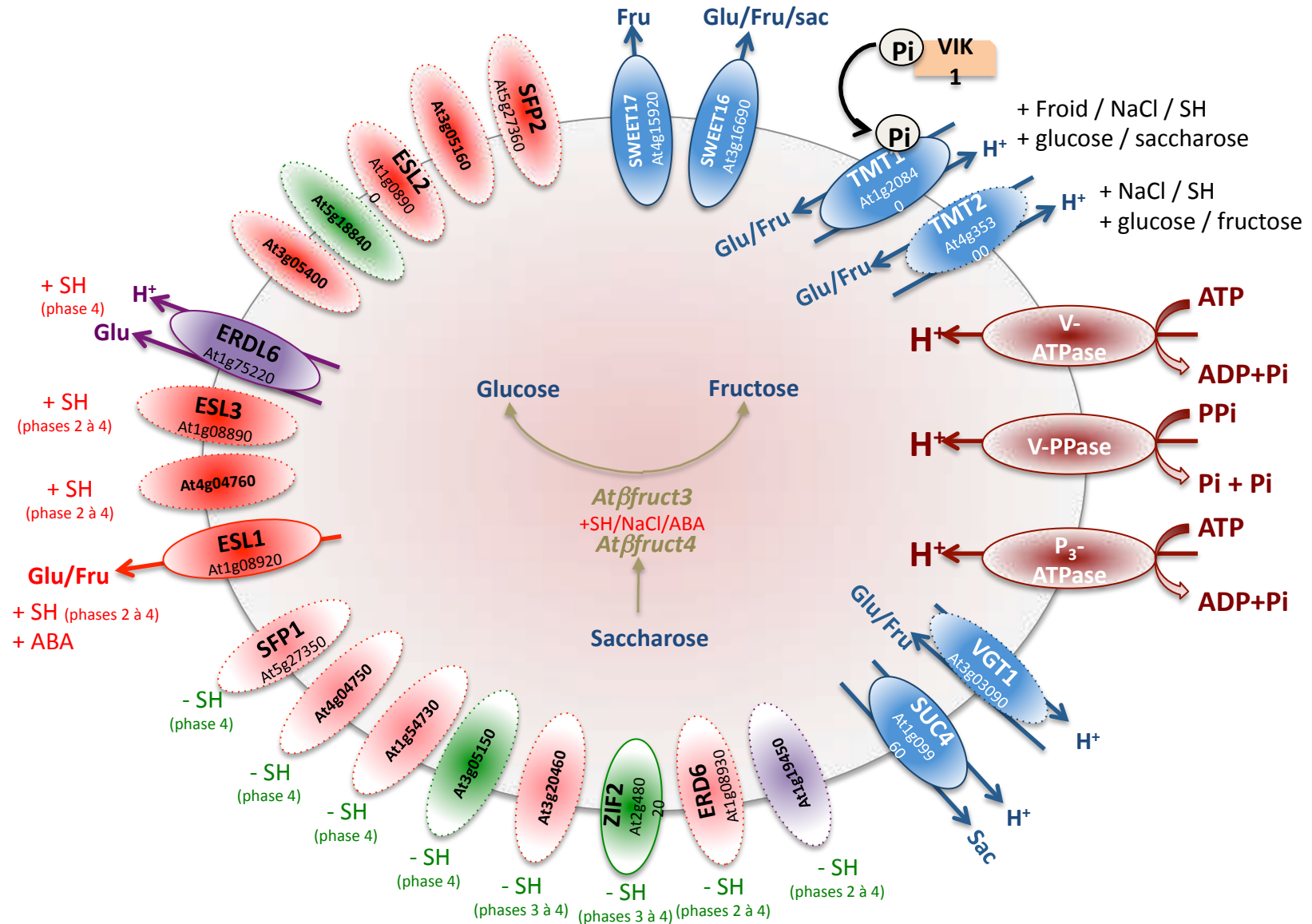


Figure 101 : bilan du transport de sucres de part et d'autre du tonoplast. Fru = fructose, Glu = glucose, Sac = saccharose, Sh = stress hydrique, NaCl = stress salin, ABA = acide abscissique. *AtTMT3*, *AtVGT2* et *AtVGT3* sont non caractérisés mais sont a priori localisés au niveau du tonoplast. De même, les treize autres *AtERD6*-like sont potentiellement localisés au niveau du tonoplast mais non encore caractérisés. D'après Hedrich *et al.* 2015, Guo *et al.* 20174, Klemens *et al.* 2013, Schulz *et al.* 2011, Yamada *et al.* 2010, Kiyosue *et al.*, 1998, Quirino *et al.* 2001, Remy *et al.* 2014, Poschet *et al.* 2011, Wingenter *et al.* 2011, Wormit *et al.* 2006 et Aluri and Büttner, 2016. Cercles en traits pleins = transporteur localisé sur le tonoplast, cercles en traits pointillés = transporteurs putativement localisé sur le tonoplast.

induits (figures 79 et 80). Ainsi, la cartographie d'expression des *ERD6-like* chez *A. thaliana* renforce les résultats de l'analyse phylogénétique et de l'analyse dN/dS et conforte les hypothèses émises concernant les étapes de leur évolution ainsi que la diversification des fonctions physiologiques de ces transporteurs de monosaccharides.

Notre étude contribue également à la compréhension du transport des sucres à travers le tonoplaste notamment dans les feuilles d'*Arabidopsis thaliana* en condition de déficit hydrique. Bien que nous n'ayons ni démontré l'activité de transport des transporteurs ERD6-like étudiés, ni leur localisation tonoplastique, en confrontant nos résultats aux données de la littérature et en précisant le rôle de certains ERD6-like lors du déficit hydrique, nous pouvons proposer un bilan des transporteurs de sucres potentiellement impliqués au niveau de la vacuole (figure 101, d'après Hedrich et al. 2015). Il est actuellement établi que l'accumulation du glucose et du fructose dans la vacuole se réalise principalement par AtTMT1 et AtTMT2 deux transporteurs responsables d'un antiport H⁺/hexoses (Wormit et al. 2013) et par AtVGT1, un transporteur exprimé dans les parties aériennes, responsable d'un antiport H⁺/hexoses et fortement impliqué dans la floraison et la germination des graines (Alluri and Büttner 2007). En parallèle des systèmes d'antiports, deux protéines sont décrites comme des symporteurs responsables de l'export des sucres de la vacuole. Il s'agit d'AtSUC4, un symport H⁺/saccharose, responsable de l'export du saccharose (Schulz et al., 2011) et d'AtERDL6 (At1g75220) un symport H⁺/glucose, responsable de l'export du glucose (Klemens et al., 2014). Enfin, 3 facilitateurs sont également caractérisés : AtSWEET17 qui facilite le transport bidirectionnel du fructose (Chardon et al., 2013 ; Guo et al ; 2014), AtSWEET16 qui permet les réajustements osmotiques en tant que facilitateur transportant le glucose et le fructose selon leur gradient de concentration (Chen et al., 2010 ; Chardon et al., 2013) et AtESL1 (At1g08920) qui facilite le transport de plusieurs hexoses tels que le glucose, le fructose, le mannose et le galactose (Poschet et al., 2011). Il est de plus démontré que *AtTMT1*, *AtTMT2*, *AtSWEET16*, *AtERDL6* et *AtESL1* sont finement régulés par des contraintes abiotiques telles que le froid, le stress salin ou le stress hydrique. Nos résultats non seulement confirment l'induction de *AtERDL6* et *AtESL1* par le déficit hydrique mais démontrent que deux autres gènes (*At1g08890* et *At4g04760*) sont également induits. A l'inverse, 8 gènes, dont au moins un représentant de chacun des 3 groupes de l'arbre phylogénétique, sont réprimés par le déficit hydrique et 5 gènes ne présentent pas de réponse à la carence hydrique. Ainsi seulement 4 *AtERD6-like* (soit 21% des *ERD6-like*) sont induits lors d'une carence en eau, du moins dans les conditions de notre étude. L'analyse détaillée de

Ecotype Col-0

Mutant at1g75220

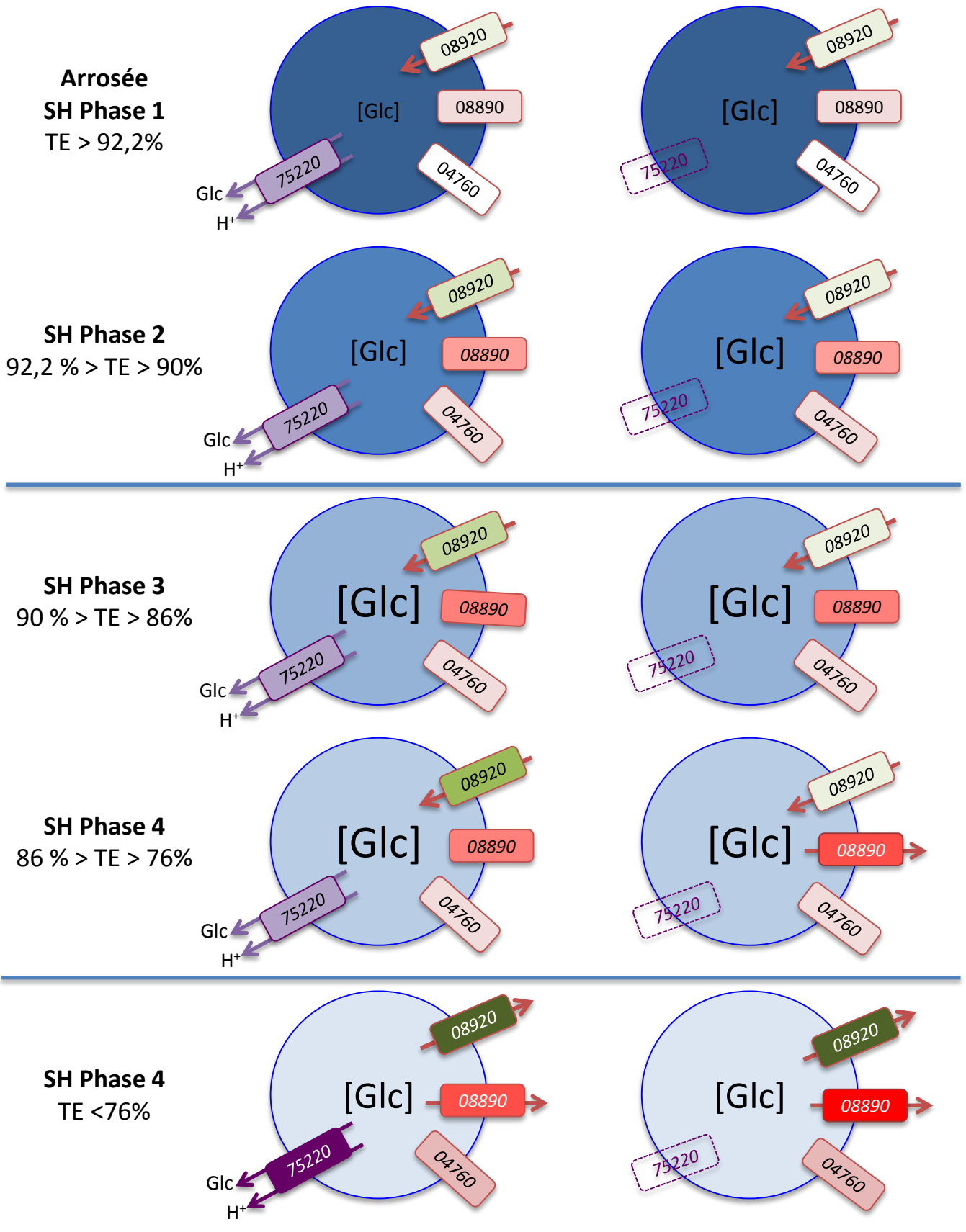


Figure 102: Comparaison de l'évolution de la teneur en glucose et de l'expression des 4 gènes induits lors du déficit hydrique dans l'écotype d'*A. thaliana* Col-0 et le mutant *at1g75220*. La diminution de la TE est représentée par l'intensité de la couleur bleu. L'évolution de la concentration en glucose dans la vacuole est représentée par la taille des lettres [Glc]. L'intensité de l'expression des gènes est représentée par l'intensité des couleurs correspondant à chaque gène.

l'expression de ces 4 gènes dans 3 lignées mutantes a permis de proposer des rôles physiologiques pour ces gènes au cours de la cinétique de déficit hydrique (figure 102).

Lors d'un stress sévère (phase 3) et lors du flétrissement (début de la phase 4, teneur en eau comprise entre 86% et 76%) l'accumulation du glucose augmente de façon importante, dans l'écotype Col-0 (figure 61 A). L'analyse de l'expression des gènes *AtERD6-like* au cours du déficit hydrique a clairement montré que *At1g08920* et *At1g08890* sont progressivement induits lors de ces 2 phases ainsi que *At4g04760* mais dans une moindre mesure. Ces données suggèrent que *At1g08920*, *At1g08890* et *At4g04760* pourraient participer à l'accumulation du glucose dans la vacuole au cours de ces deux phases. A l'inverse *At1g75220* n'est pas induit (figure 69 B), il ne participerait donc pas à cette accumulation. Dans le mutant *at1g75220*, au cours de la phase 3 et au début de la phase 4, l'accumulation du glucose dans la vacuole est parfaitement identique à celle de Col-0 alors que dans les phases 1 et 2, la teneur en glucose est plus importante dans le mutant (figure 98 A). D'une part, cette observation confirme que *at1g75220* est responsable de l'efflux du glucose de la vacuole et, d'autre part, conforte l'hypothèse qu'il n'est pas responsable de l'accumulation du glucose dans les phases de stress sévère et de flétrissement. Ceci est en accord avec les données de la littérature qui indiquent que une répression de l'expression de ce gène dans les conditions pour lesquelles l'accumulation des sucres dans la vacuole est nécessaire (Poschet et al., 2011). De plus, dans le mutant *at1g75220*, l'induction de *At1g8920* est clairement abolie dans la phase 3 et en début de phase 4 (figure 89 E). Ce résultat indique que ce gène semble être réprimé par la forte teneur en glucose de la vacuole, liée à l'inhibition de l'export de glucose par la mutation du gène *At1g75220*. Ce qui pourrait indiquer qu'*At1g08920* soit en partie responsable de l'accumulation du glucose car dans le mutant *at1g75220*, celle-ci se produit de façon identique à Col-0 pendant la phase 3 et le début de la phase 4 (figure 98 A). De plus, la teneur en glucose dans le mutant *at1g08920*, même si elle semble légèrement plus faible en phase 3 et en phase 4 par rapport à Col-0, n'est pas significativement différente de celle mesurée dans l'écotype sauvage (figure 100 A). Bien que l'induction du gène *At4g04760* n'est pas modifiée dans le mutant *at1g75220*, une conclusion similaire peut être faite pour *At4g04760* puisque dans le mutant *at4g04760* la teneur en glucose n'est pas significativement modifiée, quoique légèrement plus faible lors de la phase 4 (figure 99 A). Enfin, l'induction du gène *At1g08890* n'est pas modifiée pendant la phase 3 mais est clairement induite dans le mutant *at1g75220* en début de phase 4 (figure 89 D). Cette observation suggère un éventuel rôle de *At1g08890* dans l'accumulation du glucose en phase 3 et en début de phase 4. La caractérisation d'un mutant *at1g8890* semble donc indispensable pour définir de façon plus précise le rôle de ce

transporteur. Ainsi, nos analyses n'ont pas permis d'identifier de façon précise, parmi les 4 transporteurs induits lors du déficit hydrique, un transporteur ERD6-like responsable de l'influx du glucose dans la vacuole lors des phases 3 et 4. Il est donc possible que d'autres transporteurs soient responsables de cet influx, tels que des TMT qui sont décrits pour être aussi induits par le déficit hydrique (Wormit et al., 2006) ou d'autres transporteurs de sucres vacuolaires.

Dans la phase de flétrissement avancé ou de sénescence (fin de phase 4, teneur en eau inférieure à 76%), la teneur en glucose diminue dans l'écotype Col-0 (figure 61 A). Au cours de cette phase, l'expression de *At1g75220* est spécifiquement induite et celle de *At1g08920* et *At1g08890* sont maximales (figure 69 B et figure 71 E et G). A l'inverse, celle de *At4g04760* semble être plus liée au développement de la plante plutôt qu'au déficit hydrique, puisque l'expression de ce gène dans les plantes non arrosées est similaire à celle des plantes arrosées de même âge (figure 71 C). Il apparaît clairement que *At1g75220* est responsable de l'export du glucose de la vacuole lors d'une remobilisation des ressources carbonées potentiellement vers d'autres organes. Ceci est à nouveau en parfait accord, avec la fonction qui lui est attribuée dans la littérature à savoir l'export du glucose de la vacuole lorsque les conditions de culture imposent un accès au pool de sucres vacuolaires (Poschet et al., 2011). De plus, nos résultats montrent que dans le mutant *at1g75220*, en fin de phase 4, la teneur en glucose est identique à celle de Col-0 (figure 98) et que l'expression du gène *At1g08890* est clairement induite par rapport à Col-0 alors que celle de *At1g08920* n'est pas modifiée (figures 89 D et E). L'ensemble de ces observations suggère que le gène *At1g08890* pourrait pallier l'inactivation fonctionnelle de *At1g75220* et contribuerait aussi fortement à l'export du glucose. Ainsi les trois gènes *At1g75220*, *At1g08920* et *At1g08890* participeraient ensemble à la remobilisation des ressources carbonées en phase de sénescence. L'activité d'efflux est spécifique pour *At1g75220* qui est responsable d'un symport H^+ /glucose (Klemens et al., 2014). A l'inverse, nous pouvons proposer que l'activité des transporteurs *At1g08920* et *At1g08890* puisse changer au cours du déficit hydrique en participant d'une part à l'accumulation du glucose dans la vacuole lors des phases sévères du déficit hydrique sévère (phase 3 et début de phase 4) et à l'inverse à l'export du glucose de la vacuole lors des phases de flétrissement et de sénescence (fin de phase 4). Cette hypothèse est compatible avec le fait que *At1g08920* est un facilitateur, pour lequel le sens du transport peut être modulé en fonction du gradient de glucose (Yamada et al. 2010) mais reste à démontrer pour *At1g08890*.

Pour compléter notre étude, il semble donc important d'identifier un mutant homozygote *at1g08890* et d'étudier son comportement en condition de déficit hydrique. L'analyse de l'expression des 4 gènes *AtERD6-like* induits par le déficit hydrique dans ce mutant s'avère nécessaire pour compléter l'étude de leur expression tout au long de la cinétique de déficit hydrique et d'identifier les compensations et donc les redondances fonctionnelles éventuelles qui existent entre ces 4 gènes.

Afin d'avoir une vision globale de la régulation du transport des sucres au niveau du tonoplaste en conditions de déficit hydrique, il paraît nécessaire d'établir le profil d'expression des autres transporteurs de sucres en condition normale et dans chacune des phases du déficit hydrique. L'expression des gènes *AtTMT*, *AtVGT*, *AtSUC4*, *AtSWEET16* et *AtSWEET17* pourraient apporter des informations utiles pour mieux appréhender la complexité de ce processus. L'expression et l'activité des deux invertases vacuolaires pourraient également apporter des éléments de compréhension sur le transport et le métabolisme du saccharose ainsi que sur l'activité de transporteurs responsables de l'export des sucres à l'image de *AtESLI* qui semble agir de concert avec ces deux invertases (Yamada et al., 2010). L'étude de l'activité du transporteur *At1g08890* s'impose afin de déterminer la nature de son fonctionnement (symport, antiport ou facilitateur) et de préciser son rôle physiologique. Il sera nécessaire de démontrer également sa localisation tonoplastique par fusion avec la GFP.

Etant donné que les simples mutants étudiés jusqu'à présent n'ont pas montré de différences phénotypiques importantes lors de la carence hydrique (ce qui peut être expliqué par des redondances fonctionnelles des ERD6-like et/ou par l'implication d'autres transporteurs de monosaccharides), il serait intéressant de construire un triple mutant *at1g08890/at1g075220/at1g08920* pour étudier l'effet combiné de la répression de ces 3 gènes. Si toutefois, des transporteurs des autres sous-familles sont également impliqués d'autres mutants multiples pourront être envisagés comme des mutants *aterd6-like/attmt* ou *aterd6-like/atsweet16*. Pour cela, la méthode CRISPR-Cas9, qui a été mise en pratique 2 fois au laboratoire, pourrait être envisagée.

Chez *Arabidopsis thaliana*, les 3 gènes principaux positivement régulés par le déficit hydrique appartiennent au groupe I (*At1g75220*) et au groupe IIb3 (*At1g08920* et *At1g08890*) et ont tous les trois au moins une copie dupliquée en tandem qui réagit différemment au déficit hydrique soit en étant réprimée (*At1g19450* et *At1g08930*) soit en n'étant pas régulée (*At1g08900*). De plus parmi ces 3 gènes, 2 sont des copies récentes apparues certainement

suite à des événements de duplications qui ont concerné les Eudicotylédones. Pour étudier le rôle des copies ERD6-like les plus anciennes, il serait intéressant de créer des simples, doubles ou triple mutants chez la Bryophyte *P. patens* et d'étudier leur comportement en condition de déficit hydrique pour identifier le rôle de chacun des 3 gènes ancestraux de cette espèce et de les comparer à ceux des 3 gènes plus récents d'*A. thaliana*. Cette comparaison pourrait apporter des éléments dans la compréhension du rôle des transporteurs de sucres dans la tolérance à la sécheresse pour des plantes reviviscentes ainsi que dans la sensibilité pour des plantes non reviviscentes.

Nous avons également mis en évidence pour les ERD6-like une structure à 18 exons (structure 1) majoritaire et 10 types de structures à 17 et 16 exons, surtout identifiés chez les Brassicacées et les Monocotylédones (figure 26). Il serait alors intéressant d'étudier finement les jonctions introns/exons, afin de déterminer les mécanismes impliqués dans la diversification des types de structures des ERD6-like chez les Brassicacées. De plus, comme nous avons montré que depuis leur émergence chez les Embryophytes, les ERD6-like ont évolué vers des patrons d'expression de plus en plus variés la recherche d'éléments-cis de régulation dans les séquences des introns qui différencient les structures identifiées pourrait être un outil pertinent à la compréhension de la variabilité d'expression des gènes *ERD6-like*.

Pour conclure, l'étude de la diversification fonctionnelle des ERD6-like semble être importante pour mieux comprendre leur implication dans la réponse de la plante à un large spectre de contraintes environnementales. Leur fonction dans l'import et l'export du glucose vacuolaire pourrait s'avérer déterminante pour l'accumulation des réserves dans les graines, comme démontré par l'augmentation du rendement des graines d'*A. thaliana* dans des mutants *at1g75220 (aterdl6)*, déficient dans l'export du glucose et dans des plantes sur-exprimant *AtTMT1*, pour lesquelles l'accumulation du glucose dans la vacuole est augmentée. Notre étude ouvre ainsi de larges perspectives allant de l'exploration de la diversité fonctionnelle des ERD6-like à la régulation fine de l'expression, aussi bien dans les phases du développement, qu'en réponse aux contraintes de l'environnement.

Références Bibliographiques

- Adams KL, Wendel JF (2005) Polyploidy and genome evolution in plants. *Current opinion in plant biology* 8 (2):135-141
- Afoufa-Bastien D, Medici A, Jeuffre J, Coutos-Thévenot P, Lemoine R, Atanassova R, Laloi M (2010) The *Vitis vinifera* sugar transporter gene family: phylogenetic overview and macroarray expression profiling. *BMC plant biology* 10 (1):245
- Ahn S, Tanksley S (1993) Comparative linkage maps of the rice and maize genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90 (17):7980-7984
- Ainsworth EA, Bush DR (2011) Carbohydrate export from the leaf: a highly regulated process and target to enhance photosynthesis and productivity. *Plant physiology* 155 (1):64-69
- Al-Dous EK, George B, Al-Mahmoud ME, Al-Jaber MY, Wang H, Salameh YM, Al-Azwani EK, Chaluvadi S, Pontaroli AC, DeBarry J (2011) De novo genome sequencing and comparative genomics of date palm (*Phoenix dactylifera*). *Nature biotechnology* 29 (6):521-527
- Albert VA, Barbazuk WB, Der JP, Leebens-Mack J, Ma H, Palmer JD, Rounsley S, Sankoff D, Schuster SC, Soltis DE (2013) The *Amborella* genome and the evolution of flowering plants. *Science* 342 (6165):1241089
- Allendorf FW, Utter FM, May BP (1975) Gene duplication within the family Salmonidae: II. Detection and determination of the genetic control of duplicate loci through inheritance studies and the examination of populations. *Isozymes* 4:415-432
- Aluri S, Büttner M (2007) Identification and functional expression of the *Arabidopsis thaliana* vacuolar glucose transporter 1 and its role in seed germination and flowering. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (7):2537-2542
- Améglio T, Archer P, Cohen M, Valancogne C, Daudet F-a, Dayau S, Cruiziat P (1999) Significance and limits in the use of predawn leaf water potential for tree irrigation. *Plant and Soil* 207 (2):155-167
- Argout X, Salse J, Aury J-M, Guiltinan MJ, Droc G, Gouzy J, Allegre M, Chaparro C, Legavre T, Maximova SN (2011) The genome of *Theobroma cacao*. *Nature genetics* 43 (2):101-108
- Arnold MI, Davidson EH (1997) The hardwiring of development: organization and function of genomic regulatory systems. *Development* 124 (10):1851-1864
- Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT (2000) Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nature genetics* 25 (1):25
- Bailey JA, Gu Z, Clark RA, Reinert K, Samonte RV, Schwartz S, Adams MD, Myers EW, Li PW, Eichler EE (2002) Recent segmental duplications in the human genome. *Science* 297 (5583):1003-1007
- Banks JA, Nishiyama T, Hasebe M, Bowman JL, Gribskov M, Albert VA, Aono N, Aoyama T, Ambrose BA, Ashton NW (2011) The *Selaginella* genome identifies genetic changes associated with the evolution of vascular plants. *science* 332 (6032):960-963
- Barbier G, Oesterhelt C, Larson MD, Halgren RG, Wilkerson C, Garavito RM, Benning C, Weber APM (2005) Comparative genomics of two closely related unicellular thermoacidophilic red algae, *Galdieria sulphuraria* and *Cyanidioschyzon merolae*, reveals the molecular basis of the metabolic flexibility of *Galdieria sulphuraria* and significant differences in carbohydrate metabolism of both algae. *Plant physiology* 137 (2):460-474
- Barker MS, Arrigo N, Baniaga AE, Li Z, Levin DA (2016) On the relative abundance of autopolyploids and allopolyploids. *New Phytologist* 210 (2):391-398

- Baum G, Long JC, Jenkins GI, Trewavas AJ (1999) Stimulation of the blue light phototropic receptor NPH1 causes a transient increase in cytosolic Ca²⁺. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96 (23):13554-13559
- Birchler JA, Bhadra U, Bhadra MP, Auger DL (2001) Dosage-dependent gene regulation in multicellular eukaryotes: implications for dosage compensation, aneuploid syndromes, and quantitative traits. *Developmental biology* 234 (2):275-288
- Birchler JA, Riddle NC, Auger DL, Veitia RA (2005) Dosage balance in gene regulation: biological implications. *Trends in Genetics* 21 (4):219-226
- Blaine Marchant D, Soltis DE, Soltis PS (2016) Patterns of abiotic niche shifts in allopolyploids relative to their progenitors. *New Phytologist* 212 (3):708-718
- Blanc G, Hokamp K, Wolfe KH (2003) A recent polyploidy superimposed on older large-scale duplications in the Arabidopsis genome. *Genome research* 13 (2):137-144
- Blanc G, Wolfe KH (2004) Widespread paleopolyploidy in model plant species inferred from age distributions of duplicate genes. *The Plant Cell* 16 (7):1667-1678
- Blatt MR (2000) Cellular signaling and volume control in stomatal movements in plants. *Annual review of cell and developmental biology* 16 (1):221-241
- Blouin M, Lavelle P, Laffray D (2007) Drought stress in rice (*Oryza sativa* L.) is enhanced in the presence of the compacting earthworm *Millsonia anomala*. *Environmental and experimental botany* 60 (3):352-359
- Blum A (2011) Plant water relations, plant stress and plant production. In: *Plant breeding for water-limited environments*. Springer, pp 11-52
- Bomblies K, Madlung A (2014) Polyploidy in the Arabidopsis genus. *Chromosome research* 22 (2):117-134
- Boneh U, Biton I, Schwartz A, Ben-Ari G (2012) Characterization of the ABA signal transduction pathway in *Vitis vinifera*. *Plant science* 187:89-96
- Bowers JE, Chapman BA, Rong J, Paterson AH (2003) Unravelling angiosperm genome evolution by phylogenetic analysis of chromosomal duplication events. *Nature* 422 (6930):433-438
- Brandt B, Brodsky DE, Xue S, Negi J, Iba K, Kangasjärvi J, Ghassemian M, Stephan AB, Hu H, Schroeder JI (2012) Reconstitution of abscisic acid activation of SLAC1 anion channel by CPK6 and OST1 kinases and branched ABI1 PP2C phosphatase action. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (26):10593-10598
- Braun DM, Slewinski TL (2009) Genetic control of carbon partitioning in grasses: roles of sucrose transporters and tie-dyed loci in phloem loading. *Plant Physiology* 149 (1):71-81
- Bray EA (1997) Plant responses to water deficit. *Trends in plant science* 2 (2):48-54
- Brodersen CR, McElrone AJ (2013) Maintenance of xylem network transport capacity: a review of embolism repair in vascular plants. *Frontiers in plant science* 4
- Brodribb TJ, Cochard H (2009) Hydraulic failure defines the recovery and point of death in water-stressed conifers. *Plant physiology* 149 (1):575-584
- Büttner M (2007) The monosaccharide transporter (-like) gene family in Arabidopsis. *FEBS letters* 581 (12):2318-2324
- Büttner M, Sauer N (2000) Monosaccharide transporters in plants: structure, function and physiology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1465 (1):263-274
- Büttner M, Truernit E, Baier K, Scholz - Starke J, Sontheim M, Lauterbach C, Huss V, Sauer N (2000) AtSTP3, a green leaf - specific, low affinity monosaccharide - H⁺ symporter of Arabidopsis thaliana. *Plant, Cell & Environment* 23 (2):175-184
- Cannon SB, Crow JA, Heuer ML, Wang X, Cannon EK, Dwan C, Lamblin A-F, Vasdewani J, Mudge J, Cook A (2005) Databases and information integration for the *Medicago truncatula* genome and transcriptome. *Plant Physiology* 138 (1):38-46

- Cannon SB, Sterck L, Rombauts S, Sato S, Cheung F, Gouzy J, Wang X, Mudge J, Vasdewani J, Schiex T (2006) Legume genome evolution viewed through the *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus* genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (40):14959-14964
- Carroll SB (2005) Evolution at two levels: on genes and form. *PLoS biology* 3 (7):e245
- Caspari T, Stadler R, Sauer N, Tanner W (1994) Structure/function relationship of the *Chlorella* glucose/H⁺ symporter. *Journal of Biological Chemistry*, 269(5), 3498-3502
- Chan AP, Crabtree J, Zhao Q, Lorenzi H, Orvis J, Puiu D, Melake-Berhan A, Jones KM, Redman J, Chen G (2010) Draft genome sequence of the oilseed species *Ricinus communis*. *Nature biotechnology* 28 (9):951-956
- Chao D-Y, Dilkes B, Luo H, Douglas A, Yakubova E, Lahner B, Salt DE (2013) Polyploids exhibit higher potassium uptake and salinity tolerance in *Arabidopsis*. *Science* 341 (6146):658-659
- Chapman BA, Bowers JE, Feltus FA, Paterson AH (2006) Buffering of crucial functions by paleologous duplicated genes may contribute cyclicity to angiosperm genome duplication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (8):2730-2735
- Chardon F, Bedu M, Calenge F, Klemens PAW, Spinner L, Clement G, Chietera G, Lérans S, Ferrand M, Lacombe B (2013) Leaf fructose content is controlled by the vacuolar transporter SWEET17 in *Arabidopsis*. *Current Biology* 23 (8):697-702
- Chaves MM (1991) Effects of water deficits on carbon assimilation. *Journal of experimental Botany* 42 (1):1-16
- Chaves MM, Pereira JS, Maroco J, Rodrigues ML, Ricardo CPP, Osório ML, Carvalho I, Faria T, Pinheiro C (2002) How plants cope with water stress in the field? Photosynthesis and growth. *Annals of botany* 89 (7):907-916
- Chen L-Q, Hou B-H, Lalonde S, Takanaga H, Hartung ML, Qu X-Q, Guo W-J, Kim J-G, Underwood W, Chaudhuri B (2010) Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature* 468 (7323):527-532
- Chen L-Q, Lin IW, Qu X-Q, Sosso D, McFarlane HE, Londoño A, Samuels AL, Frommer WB (2015) A cascade of sequentially expressed sucrose transporters in the seed coat and endosperm provides nutrition for the *Arabidopsis* embryo. *The Plant Cell* 27 (3):607-619
- Chen L-Q, Qu X-Q, Hou B-H, Sosso D, Osorio S, Fernie AR, Frommer WB (2012) Sucrose efflux mediated by SWEET proteins as a key step for phloem transport. *Science* 335 (6065):207-211
- Cheng F, Mandáková T, Wu J, Xie Q, Lysak MA, Wang X (2013) Deciphering the diploid ancestral genome of the mesohexaploid *Brassica rapa*. *The Plant Cell* 25 (5):1541-1554
- Cho D, Shin D, Jeon BW, Kwak JM (2009) ROS-mediated ABA signaling. *Journal of Plant Biology* 52 (2):102-113
- Christmann A, Hoffmann T, Teplova I, Grill E, Müller A (2005) Generation of active pools of abscisic acid revealed by in vivo imaging of water-stressed *Arabidopsis*. *Plant physiology* 137 (1):209-219
- Christmann A, Weiler EW, Steudle E, Grill E (2007) A hydraulic signal in root - to - shoot signalling of water shortage. *The Plant Journal* 52 (1):167-174
- Cock JM, Coelho SM, Brownlee C, Taylor AR (2010) The *Ectocarpus* genome sequence: insights into brown algal biology and the evolutionary diversity of the eukaryotes. *New Phytologist* 188 (1):1-4
- Collén J, Porcel B, Carré W, Ball SG, Chaparro C, Tonon T, Barbeyron T, Michel G, Noel B, Valentin K (2013) Genome structure and metabolic features in the red seaweed

- Chondrus crispus* shed light on evolution of the Archaeplastida. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (13):5247-5252
- Comai L (2005) The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nature reviews genetics* 6 (11):836-846
- Crepet WL, Niklas KJ (2009) Darwin's second "abominable mystery": Why are there so many angiosperm species? *American Journal of Botany* 96 (1):366-381
- Cusack BP, Wolfe KH (2007) Not born equal: increased rate asymmetry in relocated and retrotransposed rodent gene duplicates. *Molecular biology and evolution* 24 (3):679-686
- Czechowski T, Stitt M, Altmann T, Udvardi MK, Scheible W-R (2005) Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*. *Plant physiology* 139 (1):5-17
- D'Hont A, Denoeud F, Aury J-M, Baurens F-C, Carreel F, Garsmeur O, Noel B, Bocs S, Droc G, Rouard M (2012) The banana (*Musa acuminata*) genome and the evolution of monocotyledonous plants. *Nature* 488 (7410):213-217
- Damour G, Simonneau T, Cochard H, Urban L (2010) An overview of models of stomatal conductance at the leaf level. *Plant, Cell & Environment* 33 (9):1419-1438
- Davies WJ, Zhang J (1991) Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. *Annual review of plant biology* 42 (1):55-76
- De Bodt S, Maere S, Van de Peer Y (2005) Genome duplication and the origin of angiosperms. *Trends in Ecology & Evolution* 20 (11):591-597
- De Smet R, Van de Peer Y (2012) Redundancy and rewiring of genetic networks following genome-wide duplication events. *Current opinion in plant biology* 15 (2):168-176
- Delpont W, Poon AFY, Frost SDW, Kosakovsky Pond SL (2010) Datamonkey 2010: a suite of phylogenetic analysis tools for evolutionary biology. *Bioinformatics* 26 (19):2455-2457
- Dinant S, Lemoine R (2010) The phloem pathway: new issues and old debates. *Comptes rendus biologies* 333 (4):307-319
- Doidy J, Grace E, Kühn C, Simon-Plas F, Casieri L, Wipf D (2012) Sugar transporters in plants and in their interactions with fungi. *Trends in plant science* 17 (7):413-422
- Doyle JJ, Flagel LE, Paterson AH, Rapp RA, Soltis DE, Soltis PS, Wendel JF (2008) Evolutionary genetics of genome merger and doubling in plants. *Annual review of genetics* 42:443-461
- Durand M, Porcheron B, Hennion N, Maurousset L, Lemoine R, Pourtau N (2016) Water deficit enhances C export to the roots in *Arabidopsis thaliana* plants with contribution of sucrose transporters in both shoot and roots. *Plant physiology* 170 (3):1460-1479
- Edger PP, Heidel-Fischer HM, Bekaert M, Rota J, Glöckner G, Platts AE, Heckel DG, Der JP, Wafula EK, Tang M (2015) The butterfly plant arms-race escalated by gene and genome duplications. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112 (27):8362-8366
- Endo A, Sawada Y, Takahashi H, Okamoto M, Ikegami K, Koiwai H, Seo M, Toyomasu T, Mitsunashi W, Shinozaki K (2008) Drought induction of *Arabidopsis* 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase occurs in vascular parenchyma cells. *Plant Physiology* 147 (4):1984-1993
- Eom J-S, Chen L-Q, Sosso D, Julius BT, Lin I, Qu X-Q, Braun DM, Frommer WB (2015) SWEETs, transporters for intracellular and intercellular sugar translocation. *Current opinion in plant biology* 25:53-62
- Fambrini M, Vernieri P, Toncelli ML, Rossi VD, Pugliesi C (1995) Characterization of a wilted sunflower (*Helianthus annuus* L.) mutant: III. Phenotypic interaction in

- reciprocal grafts from wilty mutant and wild-type plants. *Journal of Experimental Botany* 46 (5):525-530
- Fang Y, Xiong L (2015) General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants. *Cellular and molecular life sciences* 72 (4):673-689
- Farrant JM, Moore JP (2011) Programming desiccation-tolerance: from plants to seeds to resurrection plants. *Current opinion in plant biology* 14 (3):340-345
- Fawcett JA, Maere S, Van de Peer Y (2009) Plants with double genomes might have had a better chance to survive the Cretaceous–Tertiary extinction event. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (14):5737-5742
- Ferris SD, Whitt GS (1977) Loss of duplicate gene expression after polyploidisation. *Nature* 265 (5591):258-260
- Ferris SD, Whitt GS (1979) Evolution of the differential regulation of duplicate genes after polyploidization. *Journal of Molecular Evolution* 12 (4):267-317
- Fischer RA, Hsiao TC (1968) Stomatal opening in isolated epidermal strips of *Vicia faba*. II. Responses to KCl concentration and the role of potassium absorption. *Plant Physiology* 43 (12):1953-1958
- Flexas J, Bota J, Cifre J, Mariano Escalona J, Galmés J, Gulías J, LEFI EK, FLORINDA MARTÍNEZ - CAÑELLAS S, TERESA MORENO M, RIBAS - CARBÓ M (2004) Understanding down - regulation of photosynthesis under water stress: future prospects and searching for physiological tools for irrigation management. *Annals of applied Biology* 144 (3):273-283
- Force A, Lynch M, Pickett FB, Amores A, Yan Y-l, Postlethwait J (1999) Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations. *Genetics* 151 (4):1531-1545
- Foster CB, Afonin SA (2005) Abnormal pollen grains: an outcome of deteriorating atmospheric conditions around the Permian–Triassic boundary. *Journal of the Geological Society* 162 (4):653-659
- Fowler NL, Levin DA (2016) Critical factors in the establishment of allopolyploids. *American journal of botany* 103 (7):1236-1251
- França MGC, Thi ATP, Pimentel C, Rossiello ROP, Zuily-Fodil Y, Laffray D (2000) Differences in growth and water relations among *Phaseolus vulgaris* cultivars in response to induced drought stress. *Environmental and Experimental Botany* 43 (3):227-237
- Francino MP (2005) An adaptive radiation model for the origin of new gene functions. *Nature genetics* 37 (6):573
- Freeling M (2009) Bias in plant gene content following different sorts of duplication: tandem, whole-genome, segmental, or by transposition. *Annual review of plant biology* 60:433-453
- Friis EM, Pedersen KR, Crane PR (2006) Cretaceous angiosperm flowers: innovation and evolution in plant reproduction. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 232 (2):251-293
- Frommer WB, Sonnewald U (1995) Molecular analysis of carbon partitioning in solanaceous species. *Journal of Experimental Botany* 46 (6):587-607
- Fujino M (1967) Role of adenosinetriphosphate and adenosinetriphosphatase in stomatal movement. *長崎大学教育学部自然科学研究報告* 18:1-47
- Fukao T, Xiong L (2013) Genetic mechanisms conferring adaptation to submergence and drought in rice: simple or complex? *Current Opinion in Plant Biology* 16 (2):196-204
- Furlong RF, Holland PWH (2002) Were vertebrates octoploid? *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 357 (1420):531-544

- Galmes J, Ochogavía J, Gago J, RoldÁN EJ, Cifre J, Conesa MÀ (2013) Leaf responses to drought stress in Mediterranean accessions of *Solanum lycopersicum*: anatomical adaptations in relation to gas exchange parameters. *Plant, cell & environment* 36 (5):920-935
- Garcia-Mas J, Benjak A, Sanseverino W, Bourgeois M, Mir G, González VM, Hénaff E, Câmara F, Cozzuto L, Lowy E (2012) The genome of melon (*Cucumis melo* L.). *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (29):11872-11877
- Gibson TJ, Spring J (1998) Genetic redundancy in vertebrates: polyploidy and persistence of genes encoding multidomain proteins. *Trends in genetics* 14 (2):46-49
- Glennon KL, Ritchie ME, Segraves KA (2014) Evidence for shared broad - scale climatic niches of diploid and polyploid plants. *Ecology Letters* 17 (5):574-582
- Goodstein DM, Shu S, Howson R, Neupane R, Hayes RD, Fazo J, Mitros T, Dirks W, Hellsten U, Putnam N (2011) Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic acids research* 40 (D1):D1178-D1186
- Gottwald JR, Krysan PJ, Young JC, Evert RF, Sussman MR (2000) Genetic evidence for the in planta role of phloem-specific plasma membrane sucrose transporters. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (25):13979-13984
- Gross K, Schiestl FP (2015) Are tetraploids more successful? Floral signals, reproductive success and floral isolation in mixed-ploidy populations of a terrestrial orchid. *Annals of botany* 115 (2):263-273
- Guan Y-F, Huang X-Y, Zhu J, Gao J-F, Zhang H-X, Yang Z-N (2008) RUPTURED POLLEN GRAIN1, a member of the MtN3/saliva gene family, is crucial for exine pattern formation and cell integrity of microspores in *Arabidopsis*. *Plant physiology* 147 (2):852-863
- Guo W-J, Nagy R, Chen H-Y, Pfrunder S, Yu Y-C, Santelia D, Frommer WB, Martinoia E (2014) SWEET17, a facilitative transporter, mediates fructose transport across the tonoplast of *Arabidopsis* roots and leaves. *Plant physiology* 164 (2):777-789
- Guo YL (2013) Gene family evolution in green plants with emphasis on the origination and evolution of *Arabidopsis thaliana* genes. *The Plant Journal* 73 (6):941-951
- Haas BJ, Delcher AL, Mount SM, Wortman JR, Smith Jr RK, Hannick LI, Maiti R, Ronning CM, Rusch DB, Town CD (2003) Improving the *Arabidopsis* genome annotation using maximal transcript alignment assemblies. *Nucleic acids research* 31 (19):5654-5666
- Harada A, Shimazaki Ki (2007) Phototropins and blue light - dependent calcium signaling in higher plants. *Photochemistry and Photobiology* 83 (1):102-111
- Harb A, Krishnan A, Ambavaram MM, Pereira A (2010) Molecular and physiological analysis of drought stress in *Arabidopsis* reveals early responses leading to acclimation in plant growth. *Plant Physiology* 154 (3):1254-1271
- Hare P, Cress W, Van Staden J (1998) Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant, cell & environment* 21 (6):535-553
- Haritatos E, Medville R, Turgeon R (2000) Minor vein structure and sugar transport in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 211 (1):105-111
- Hedges SB, Dudley J, Kumar S (2006) TimeTree: a public knowledge-base of divergence times among organisms. *Bioinformatics* 22 (23):2971-2972
- Hedges SB, Marin J, Suleski M, Paymer M, Kumar S (2015) Tree of life reveals clock-like speciation and diversification. *Molecular biology and evolution* 32 (4):835-845
- Hedrich R, Sauer N, Neuhaus HE (2015) Sugar transport across the plant vacuolar membrane: nature and regulation of carrier proteins. *Current opinion in plant biology* 25:63-70
- Hendrickson H, Slechta ES, Berghthorsson U, Andersson DI, Roth JR (2002) Amplification–mutagenesis: evidence that “directed” adaptive mutation and general hypermutability

- result from growth with a selected gene amplification. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (4):2164-2169
- Hittinger CT, Carroll SB (2007) Gene duplication and the adaptive evolution of a classic genetic switch. *Nature* 449 (7163):677
- Holbrook NM, Shashidhar VR, James RA, Munns R (2002) Stomatal control in tomato with ABA - deficient roots: response of grafted plants to soil drying. *Journal of Experimental Botany* 53 (373):1503-1514
- Hruz T, Laule O, Szabo G, Wessendorp F, Bleuler S, Oertle L, Widmayer P, Gruissem W, Zimmermann P (2008) Genevestigator v3: a reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes. *Advances in bioinformatics* 2008
- Hsiao TC (1973) Plant responses to water stress. *Annual review of plant physiology* 24 (1):519-570
- Hsiao TC, Acevedo E (1974) Plant responses to water deficits, water-use efficiency, and drought resistance. *Agricultural meteorology* 14 (1-2):59-84
- Hu B, Jin J, Guo A-Y, Zhang H, Luo J, Gao G (2014) GSDS 2.0: an upgraded gene feature visualization server. *Bioinformatics*:btu817
- Hu TT, Pattyn P, Bakker EG, Cao J, Cheng J-F, Clark RM, Fahlgren N, Fawcett JA, Grimwood J, Gundlach H (2011) The *Arabidopsis lyrata* genome sequence and the basis of rapid genome size change. *Nature genetics* 43 (5):476-481
- Huang C-H, Zhang C, Liu M, Hu Y, Gao T, Qi J, Ma H (2016) Multiple polyploidization events across Asteraceae with two nested events in the early history revealed by nuclear phylogenomics. *Molecular biology and evolution* 33 (11):2820-2835
- Huang S, Li R, Zhang Z, Li L, Gu X, Fan W, Lucas WJ, Wang X, Xie B, Ni P (2009) The genome of the cucumber, *Cucumis sativus* L. *Nature genetics* 41 (12):1275-1281
- Hummel I, Pantin F, Sulpice R, Piques M, Rolland G, Dauzat M, Christophe A, Pervent M, Bouteillé M, Stitt M (2010) *Arabidopsis* plants acclimate to water deficit at low cost through changes of carbon usage: an integrated perspective using growth, metabolite, enzyme, and gene expression analysis. *Plant Physiology* 154 (1):357-372
- Husband BC, Baldwin SJ, Sabara HA (2016) Direct vs. indirect effects of whole-genome duplication on prezygotic isolation in *Chamerion angustifolium*: Implications for rapid speciation. *American journal of botany* 103 (7):1259-1271
- Ilic K, SanMiguel PJ, Bennetzen JL (2003) A complex history of rearrangement in an orthologous region of the maize, sorghum, and rice genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (21):12265-12270
- Imlau A, Truernit E, Sauer N (1999) Cell-to-cell and long-distance trafficking of the green fluorescent protein in the phloem and symplastic unloading of the protein into sink tissues. *The Plant Cell* 11 (3):309-322
- Innan H, Kondrashov F (2010) The evolution of gene duplications: classifying and distinguishing between models. *Nature Reviews Genetics* 11 (2):97-108
- Ishimaru K, Hirose T, Aoki N, Takahashi S, Ono K, Yamamoto S, Wu J, Saji S, Baba T, Ugaki M (2001) Antisense expression of a rice sucrose transporter OsSUT1 in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant and cell physiology* 42 (10):1181-1185
- Jaillon O, Aury J-M, Noel B, Policriti A, Clepet C, Casagrande A, Choisne N, Aubourg S, Vitulo N, Jubin C (2007) The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature* 449 (7161):463-467
- Jiang K, Sorefan K, Deeks MJ, Bevan MW, Hussey PJ, Hetherington AM (2012) The ARP2/3 complex mediates guard cell actin reorganization and stomatal movement in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 24 (5):2031-2040
- Jiang N, Bao Z, Zhang X, Eddy SR, Wessler SR (2004) Pack-MULE transposable elements mediate gene evolution in plants. *Nature* 431 (7008):569-573

- Jiang Y, Wu K, Lin F, Qu Y, Liu X, Zhang Q (2014) Phosphatidic acid integrates calcium signaling and microtubule dynamics into regulating ABA-induced stomatal closure in *Arabidopsis*. *Planta* 239 (3):565-575
- Jiao Y, Leebens-Mack J, Ayyampalayam S, Bowers JE, McKain MR, McNeal J, Rolf M, Ruzicka DR, Wafula E, Wickett NJ (2012) A genome triplication associated with early diversification of the core eudicots. *Genome biology* 13 (1):R3
- Jiao Y, Wickett NJ, Ayyampalayam S, Chanderbali AS, Landherr L, Ralph PE, Tomsho LP, Hu Y, Liang H, Soltis PS (2011) Ancestral polyploidy in seed plants and angiosperms. *Nature* 473 (7345):97-100
- Jiménez-Delgado S, Pascual-Anaya J, Garcia-Fernández J (2009) Implications of duplicated cis-regulatory elements in the evolution of metazoans: the DDI model or how simplicity begets novelty. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics* 8 (4):266-275
- Johnson DA, Hill JP, Thomas MA (2006) The monosaccharide transporter gene family in land plants is ancient and shows differential subfamily expression and expansion across lineages. *BMC Evolutionary Biology* 6 (1):1
- Johnson DA, Thomas MA (2007) The monosaccharide transporter gene family in *Arabidopsis* and rice: a history of duplications, adaptive evolution, and functional divergence. *Molecular biology and evolution* 24 (11):2412-2423
- Joshi-Saha A, Valon C, Leung J (2011) A brand new START: abscisic acid perception and transduction in the guard cell. *Sci Signal*:2002164
- Kaessmann H, Vinckenbosch N, Long M (2009) RNA-based gene duplication: mechanistic and evolutionary insights. *Nature Reviews Genetics* 10 (1):19-31
- Kalt-Torres W, Kerr PS, Usuda H, Huber SC (1987) Diurnal changes in maize leaf photosynthesis I. Carbon exchange rate, assimilate export rate, and enzyme activities. *Plant Physiology* 83 (2):283-288
- Katju V, Lynch M (2003) The structure and early evolution of recently arisen gene duplicates in the *Caenorhabditis elegans* genome. *Genetics* 165 (4):1793-1803
- Kaul S, Koo HL, Jenkins J, Rizzo M, Rooney T, Tallon LJ, Feldblyum T, Nierman W, Benito MI, Lin X (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *nature* 408 (6814):796-815
- Kawahara Y, de la Bastide M, Hamilton JP, Kanamori H, McCombie WR, Ouyang S, Schwartz DC, Tanaka T, Wu J, Zhou S (2013) Improvement of the *Oryza sativa* Nipponbare reference genome using next generation sequence and optical map data. *Rice* 6 (1):4
- Kay R, Chan AMY, Daly M, McPherson J (1987) Duplication of CaMV 35S promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes. *Science* 236 (4806):1299-1302
- Kinoshita T, Doi M, Suetsugu N, Kagawa T, Wada M, Shimazaki K-i (2001) Phot1 and phot2 mediate blue light regulation of stomatal opening. *Nature* 414 (6864):656-660
- Kinoshita T, Shimazaki Ki (1999) Blue light activates the plasma membrane H⁺ - ATPase by phosphorylation of the C - terminus in stomatal guard cells. *The EMBO Journal* 18 (20):5548-5558
- Kiyosue T, Abe H, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1998) ERD6, a cDNA clone for an early dehydration-induced gene of *Arabidopsis*, encodes a putative sugar transporter. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1370 (2):187-191
- Klemens PA, Patzke K, Trentmann O, Poschet G, Büttner M, Schulz A, Marten I, Hedrich R, Neuhaus HE (2013) Overexpression of a proton - coupled vacuolar glucose exporter impairs freezing tolerance and seed germination. *New Phytologist*
- Klepek Y-S, Geiger D, Klebl F, Lemoine R, Hedrich R, Sauer N, an der Arbeit EB (2004) Kapitel VII: The new *Arabidopsis* transporter AtPLT5 mediates H-symport of

- numerous substrates including myo-inositol, glycerol and ribose. *Biophysikalische Untersuchung von Phloem-lokalisierten Carriern und Kaliumkanälen und deren Interaktion im Modellsystem der Xenopus Oozyte*:108
- Klepek Y-S, Volke M, Konrad KR, Wippel K, Hoth S, Hedrich R, Sauer N (2009) *Arabidopsis thaliana* POLYOL/MONOSACCHARIDE TRANSPORTERS 1 and 2: fructose and xylitol/H⁺ symporters in pollen and young xylem cells. *Journal of experimental botany* 61 (2):537-550
- Klingler JP, Batelli G, Zhu J-K (2010) ABA receptors: the START of a new paradigm in phytohormone signalling. *Journal of experimental botany* 61 (12):3199-3210
- Kondrashov FA, Koonin EV (2004) A common framework for understanding the origin of genetic dominance and evolutionary fates of gene duplications. *Trends in Genetics* 20 (7):287-290
- Kondrashov FA, Rogozin IB, Wolf YI, Koonin EV (2002) Selection in the evolution of gene duplications. *Genome biology* 3 (2):research0008. 0001
- Kosakovsky P, Frost SDW (2005) Not so different after all: a comparison of methods for detecting amino acid sites under selection. *Molecular biology and evolution* 22 (5):1208-1222
- Kozul R, Fischer G (2009) A prominent role for segmental duplications in modeling eukaryotic genomes. *Comptes rendus biologies* 332 (2):254-266
- Kreiner JM, Kron P, Husband BC (2017) Frequency and maintenance of unreduced gametes in natural plant populations: associations with reproductive mode, life history and genome size. *New Phytologist* 214 (2):879-889
- Kühn C, Grof CP (2010) Sucrose transporters of higher plants. *Current Opinion in Plant Biology* 13 (3):287-297
- Kumar S, Hedges SB (2011) TimeTree2: species divergence times on the iPhone. *Bioinformatics* 27 (14):2023-2024
- Labandeira CC, Sepkoski JJ (1993) Insect diversity in the fossil record. *Science(Washington)* 261 (5119):310-315
- Lalonde S, Tegeder M, Throne - Holst M, Frommer W, Patrick J (2003) Phloem loading and unloading of sugars and amino acids. *Plant, Cell & Environment* 26 (1):37-56
- Lalonde S, Wipf D, Frommer WB (2004) Transport mechanisms for organic forms of carbon and nitrogen between source and sink. *Annu Rev Plant Biol* 55:341-372
- Langham RJ, Walsh J, Dunn M, Ko C, Goff SA, Freeling M (2004) Genomic duplication, fractionation and the origin of regulatory novelty. *Genetics* 166 (2):935-945
- Lavania UC, Srivastava S, Lavania S, Basu S, Misra NK, Mukai Y (2012) Autopolyploidy differentially influences body size in plants, but facilitates enhanced accumulation of secondary metabolites, causing increased cytosine methylation. *The Plant Journal* 71 (4):539-549
- Lawlor D, Cornic G (2002) Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant, Cell & Environment* 25 (2):275-294
- Lawlor DW (2012) Genetic engineering to improve plant performance under drought: physiological evaluation of achievements, limitations, and possibilities. *Journal of experimental botany* 64 (1):83-108
- Lebaudy A, Vavasseur A, Hosy E, Dreyer I, Leonhardt N, Thibaud J-B, Véry A-A, Simonneau T, Sentenac H (2008) Plant adaptation to fluctuating environment and biomass production are strongly dependent on guard cell potassium channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (13):5271-5276
- Lecourieux F, Kappel C, Lecourieux D, Serrano A, Torres E, Arce-Johnson P, Delrot S (2013) An update on sugar transport and signalling in grapevine. *Journal of experimental botany* 65 (3):821-832

- Leitch AR, Leitch IJ (2008) Genomic plasticity and the diversity of polyploid plants. *Science* 320 (5875):481-483
- Lemoine R (2000) Sucrose transporters in plants: update on function and structure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1465 (1):246-262
- Lemoine R, La Camera S, Atanassova R, Dédaldéchamp F, Allario T, Pourtau N, Bonnemain J-L, Laloi M, Coutos-Thévenot P, Maurousset L (2013) Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors. *Frontiers in Plant Science* 4
- Leushkin EV, Sutormin RA, Nabieva ER, Penin AA, Kondrashov AS, Logacheva MD (2013) The miniature genome of a carnivorous plant *Genlisea aurea* contains a low number of genes and short non-coding sequences. *BMC genomics* 14 (1):476
- Li Y, Xiao J, Wu J, Duan J, Liu Y, Ye X, Zhang X, Guo X, Gu Y, Zhang L (2012) A tandem segmental duplication (TSD) in green revolution gene *Rht - D1b* region underlies plant height variation. *New phytologist* 196 (1):282-291
- Li Z, Baniaga AE, Sessa EB, Scascitelli M, Graham SW, Rieseberg LH, Barker MS (2015) Early genome duplications in conifers and other seed plants. *Science Advances* 1 (10):e1501084
- Lin IW, Sosso D, Chen L-Q, Gase K, Kim S-G, Kessler D, Klinkenberg PM, Gorder MK, Hou B-H, Qu X-Q (2014) Nectar secretion requires sucrose phosphate synthases and the sugar transporter *SWEET9*. *Nature* 508 (7497):546
- Liu F, Andersen MN, Jacobsen S-E, Jensen CR (2005) Stomatal control and water use efficiency of soybean (*Glycine max* L. Merr.) during progressive soil drying. *Environmental and Experimental Botany* 54 (1):33-40
- Liu F, Shahnazari A, Andersen MN, Jacobsen S-E, Jensen CR (2006) Physiological responses of potato (*Solanum tuberosum* L.) to partial root-zone drying: ABA signalling, leaf gas exchange, and water use efficiency. *Journal of Experimental Botany* 57 (14):3727-3735
- Liu R, Wang Y, Qin G, Tian S (2016) iTRAQ-based quantitative proteomic analysis reveals the role of the tonoplast in fruit senescence. *Journal of Proteomics* 146:80-89
- Lohman K.N, Gan S, John M.C., Amasino R.M (1994) Molecular analysis of natural leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologica Plantarum*, 92(2), 322-328
- Ludlow MM, Sommer KJ, Flower DJ, Ferraris R, So HB Influence of root signals resulting from soil dehydration and high soil strength on the growth of crop plants. In: *Current topics in plant biochemistry and physiology: Proceedings of the... Plant Biochemistry and Physiology Symposium held at the University of Missouri, Columbia (USA), 1989.*
- Lynch M, Conery JS (2000) The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. *Science* 290 (5494):1151-1155
- Lynch M, Katju V (2004) The altered evolutionary trajectories of gene duplicates. *TRENDS in Genetics* 20 (11):544-549
- Ma Y, Szostkiewicz I, Korte A, Moes D, Yang Y, Christmann A, Grill E (2009) Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. *Science* 324 (5930):1064-1068
- Mable B, Alexandrou M, Taylor M (2011) Genome duplication in amphibians and fish: an extended synthesis. *Journal of Zoology* 284 (3):151-182
- Madlung A (2013) Polyploidy and its effect on evolutionary success: old questions revisited with new tools. *Heredity* 110 (2):99-104
- Martínez J-P, Silva H, Ledent J-F, Pinto M (2007) Effect of drought stress on the osmotic adjustment, cell wall elasticity and cell volume of six cultivars of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *European Journal of Agronomy* 26 (1):30-38

- Mason AS, Nelson MN, Yan G, Cowling WA (2011) Production of viable male unreduced gametes in Brassica interspecific hybrids is genotype specific and stimulated by cold temperatures. *BMC plant biology* 11 (1):103
- Masterson J (1994) Stomatal size in fossil plants: evidence for polyploidy in majority of angiosperms. *Science-AAAS-Weekly Paper Edition-including Guide to Scientific Information* 264 (5157):421-423
- Matsuzaki M, Misumi O, Shin-i T, Maruyama S, Takahara M, Miyagishima S-y, Mori T, Nishida K, Yagisawa F, Nishida K (2004) Genome sequence of the ultrasmall unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae* 10D. *Nature* 428 (6983):653-657
- Maurel C, Boursiac Y, Luu D-T, Santoni V, Shahzad Z, Verdoucq L (2015) Aquaporins in plants. *Physiological reviews* 95 (4):1321-1358
- Maurel C, Verdoucq L, Luu D-T, Santoni V (2008) Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions. *Annu Rev Plant Biol* 59:595-624
- Mayrose I, Zhan SH, Rothfels CJ, Arrigo N, Barker MS, Rieseberg LH, Otto SP (2015) Methods for studying polyploid diversification and the dead end hypothesis: a reply to Soltis et al.(2014). *New Phytologist* 206 (1):27-35
- McAinsh MR, Brownlee C, Hetherington AM (1997) Calcium ions as second messengers in guard cell signal transduction. *Physiologia Plantarum* 100 (1):16-29
- McCarthy EW, Chase MW, Knapp S, Litt A, Leitch AR, Le Comber SC (2016) Transgressive phenotypes and generalist pollination in the floral evolution of *Nicotiana* polyploids. *Nature plants*
- McDowell N, Pockman WT, Allen CD, Breshears DD, Cobb N, Kolb T, Plaut J, Sperry J, West A, Williams DG (2008) Mechanisms of plant survival and mortality during drought: why do some plants survive while others succumb to drought? *New phytologist* 178 (4):719-739
- Mewes H-W, Frishman D, Güldener U, Mannhaupt G, Mayer K, Mokrejs M, Morgenstern B, Münsterkötter M, Rudd S, Weil B (2002) MIPS: a database for genomes and protein sequences. *Nucleic acids research* 30 (1):31-34
- Mewis I, Khan MA, Glawischnig E, Schreiner M, Ulrichs C (2012) Water stress and aphid feeding differentially influence metabolite composition in *Arabidopsis thaliana* (L.). *PLoS One* 7 (11):e48661
- Meyer S, Lauterbach C, Niedermeier M, Barth I, Sjolund RD, Sauer N (2004) Wounding enhances expression of AtSUC3, a sucrose transporter from *Arabidopsis* sieve elements and sink tissues. *Plant Physiology* 134 (2):684-693
- Michelmore RW, Meyers BC (1998) Clusters of resistance genes in plants evolve by divergent selection and a birth-and-death process. *Genome research* 8 (11):1113-1130
- Ming R, Hou S, Feng Y, Yu Q, Dionne-Laporte A, Saw JH, Senin P, Wang W, Ly BV, Lewis KL (2008) The draft genome of the transgenic tropical fruit tree papaya (*Carica papaya* Linnaeus). *Nature* 452 (7190):991-996
- Ming R, VanBuren R, Liu Y, Yang M, Han Y, Li L-T, Zhang Q, Kim M-J, Schatz MC, Campbell M (2013) Genome of the long-living sacred lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.). *Genome Biology* 14 (5):R41
- Ming R, VanBuren R, Wai CM, Tang H, Schatz MC, Bowers JE, Lyons E, Wang M-L, Chen J, Biggers E (2015) The pineapple genome and the evolution of CAM photosynthesis. *Nature genetics* 47 (12):1435-1442
- Moore JP, Vitré - Gibouin M, Farrant JM, Driouich A (2008) Adaptations of higher plant cell walls to water loss: drought vs desiccation. *Physiologia Plantarum* 134 (2):237-245
- Morgan JM (1984) Osmoregulation and water stress in higher plants. *Annual review of plant physiology* 35 (1):299-319

- Muller B, Pantin F, Génard M, Turc O, Freixes S, Piques M, Gibon Y (2011) Water deficits uncouple growth from photosynthesis, increase C content, and modify the relationships between C and growth in sink organs. *Journal of Experimental Botany* 62 (6):1715-1729
- Munns R (2002) Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, cell & environment* 25 (2):239-250
- Myburg AA, Grattapaglia D, Tuskan GA, Hellsten U, Hayes RD, Grimwood J, Jenkins J, Lindquist E, Tice H, Bauer D (2014) The genome of *Eucalyptus grandis*. *Nature* 510 (7505):356-362
- Nakamura Y, Sasaki N, Kobayashi M, Ojima N, Yasuike M, Shigenobu Y, Satomi M, Fukuma Y, Shiwaku K, Tsujimoto A (2013) The first symbiont-free genome sequence of marine red alga, *Susabi-nori* (*Pyropia yezoensis*). *PloS one* 8 (3):e57122
- Neale DB, Wegrzyn JL, Stevens KA, Zimin AV, Puiu D, Crepeau MW, Cardeno C, Koriabine M, Holtz-Morris AE, Liechty JD (2014) Decoding the massive genome of loblolly pine using haploid DNA and novel assembly strategies. *Genome biology* 15 (3):R59
- Nei M, Gu X, Sitnikova T (1997) Evolution by the birth-and-death process in multigene families of the vertebrate immune system. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94 (15):7799-7806
- Nei M, Rooney AP (2005) Concerted and birth-and-death evolution of multigene families. *Annu Rev Genet* 39:121-152
- Noiraud N, Delrot S, Lemoine R (2000) The sucrose transporter of celery. Identification and expression during salt stress. *Plant Physiology* 122 (4):1447-1456
- Oberlander KC, Dreyer LL, Goldblatt P, Suda J, Linder HP (2016) Species-rich and polyploid-poor: Insights into the evolutionary role of whole-genome duplication from the Cape flora biodiversity hotspot. *American journal of botany* 103 (7):1336-1347
- Ohno S (1970) The enormous diversity in genome sizes of fish as a reflection of nature's extensive experiments with gene duplication. *Transactions of the American Fisheries Society* 99 (1):120-130
- Ohta T (1988) Time for acquiring a new gene by duplication. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85 (10):3509-3512
- Osborn TC, Pires JC, Birchler JA, Auger DL, Chen ZJ, Lee H-S, Comai L, Madlung A, Doerge R, Colot V (2003) Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids. *Trends in genetics* 19 (3):141-147
- Oswald BP, Nuismer SL (2007) Neopolyploidy and pathogen resistance. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 274 (1624):2393-2397
- Otto SP, Whitton J (2000) Polyploid incidence and evolution. *Annual review of genetics* 34 (1):401-437
- Pandey R, Chacko PM, Choudhary M, Prasad K, Pal M (2007) Higher than optimum temperature under CO₂ enrichment influences stomata anatomical characters in rose (*Rosa hybrida*). *Scientia Horticulturae* 113 (1):74-81
- Pandit MK, Pocock MJO, Kunin WE (2011) Ploidy influences rarity and invasiveness in plants. *Journal of Ecology* 99 (5):1108-1115
- Park S-Y, Fung P, Nishimura N, Jensen DR, Fujii H, Zhao Y, Lumba S, Santiago J, Rodrigues A, Tsz-fung FC (2009) Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *science* 324 (5930):1068-1071
- Paterson A, Bowers J, Chapman B (2004) Ancient polyploidization predating divergence of the cereals, and its consequences for comparative genomics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (26):9903-9908

- Paterson AH, Bowers JE, Bruggmann R, Dubchak I, Grimwood J, Gundlach H, Haberer G, Hellsten U, Mitros T, Poliakov A (2009) The *Sorghum bicolor* genome and the diversification of grasses. *Nature* 457 (7229):551-556
- Paterson AH, Bowers JE, Burow MD, Draye X, Elsik CG, Jiang C-X, Katsar CS, Lan T-H, Lin Y-R, Ming R (2000) Comparative genomics of plant chromosomes. *The Plant Cell* 12 (9):1523-1539
- Patrick J (1997) Phloem unloading: sieve element unloading and post-sieve element transport. *Annual review of plant biology* 48 (1):191-222
- Pécricx Y, Rallo G, Folzer H, Cigna M, Gudin S, Le Bris M (2011) Polyploidization mechanisms: temperature environment can induce diploid gamete formation in *Rosa* sp. *Journal of experimental botany* 62 (10):3587-3597
- Pei Z-M, Ward JM, Harper JF, Schroeder JI (1996) A novel chloride channel in *Vicia faba* guard cell vacuoles activated by the serine/threonine kinase, CDPK. *The EMBO Journal* 15 (23):6564
- Peng J, Xia Z, Chen L, Shi M, Pu J, Guo J, Fan Z (2014) Rapid and efficient isolation of high-quality small RNAs from recalcitrant plant species rich in polyphenols and polysaccharides. *PloS one* 9 (5):e95687
- Petersen SV, Dutton A, Lohmann KC (2016) End-Cretaceous extinction in Antarctica linked to both Deccan volcanism and meteorite impact via climate change. *Nature communications* 7
- Pharr DM, Sox HN (1984) Changes in carbohydrate and enzyme levels during the sink to source transition of leaves of *Cucumis sativus* L., a stachyose translocator. *Plant science letters* 35 (3):187-193
- Piatigorsky J, Wistow G (1991) The recruitment of crystallins: new functions precede gene duplication. *Science* 252 (5009):1078-1080
- Poffenroth M, Green DB, Tallman G (1992) Sugar Concentrations in Guard Cells of *Vicia faba* Illuminated with Red or Blue Light Analysis by High Performance Liquid Chromatography. *Plant Physiology* 98 (4):1460-1471
- Poschet G, Hannich B, Raab S, Jungkunz I, Klemens PAW, Krueger S, Wic S, Neuhaus HE, Büttner M (2011) A novel *Arabidopsis* vacuolar glucose exporter is involved in cellular sugar homeostasis and affects the composition of seed storage compounds. *Plant physiology* 157 (4):1664-1676
- Proulx SR, Phillips PC (2006) Allelic divergence precedes and promotes gene duplication. *Evolution* 60 (5):881-892
- Quail PH (1991) Phytochrome: a light-activated molecular switch that regulates plant gene expression. *Annual review of genetics* 25 (1):389-409
- Quirino BF, Reiter W-D, Amasino RD (2001) One of two tandem *Arabidopsis* genes homologous to monosaccharide transporters is senescence-associated. *Plant molecular biology* 46 (4):447-457
- Ramsey J, Schemske DW (1998) Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 29 (1):467-501
- Ramsperger-Gleixner M, Geiger D, Hedrich R, Sauer N (2004) Differential expression of sucrose transporter and polyol transporter genes during maturation of common plantain companion cells. *Plant Physiology* 134 (1):147-160
- Reddy VS, Shlykov MA, Castillo R, Sun EI, Saier MH (2012) The major facilitator superfamily (MFS) revisited. *The FEBS journal* 279 (11):2022-2035
- Reinders A, Panshyshyn JA, Ward JM (2005) Analysis of transport activity of *Arabidopsis* sugar alcohol permease homolog AtPLT5. *Journal of Biological Chemistry* 280 (2):1594-1602

- Reinders A, Sivitz AB, Ward JM (2012) Evolution of plant sucrose uptake transporters. *Frontiers in plant science* 3
- Remy E, Cabrito TR, Batista RA, Hussein MAM, Teixeira MC, Athanasiadis A, Sá-Correia I, Duque P (2014) Intron retention in the 5' UTR of the novel ZIF2 transporter enhances translation to promote zinc tolerance in *Arabidopsis*.
- Renne PR, Sprain CJ, Richards MA, Self S, Vanderkluyzen L, Pande K (2015) State shift in Deccan volcanism at the Cretaceous-Paleogene boundary, possibly induced by impact. *Science* 350 (6256):76-78
- Rensing SA, Lang D, Zimmer AD, Terry A, Salamov A, Shapiro H, Nishiyama T, Perroud P-F, Lindquist EA, Kamisugi Y (2008) The *Physcomitrella* genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. *Science* 319 (5859):64-69
- Riesmeier JW, Willmitzer L, Frommer WB (1992) Isolation and characterization of a sucrose carrier cDNA from spinach by functional expression in yeast. *The EMBO Journal* 11 (13):4705
- Rizzon C, Ponger L, Gaut BS (2006) Striking similarities in the genomic distribution of tandemly arrayed genes in *Arabidopsis* and rice. *PLoS Comput Biol* 2 (9):e115
- Robertson FM, Gundappa MK, Grammes F, Hvidsten TR, Redmond AK, Lien S, Martin SAM, Holland PWH, Sandve SR, Macqueen DJ (2017) Lineage-specific rediploidization is a mechanism to explain time-lags between genome duplication and evolutionary diversification. *Genome Biology* 18 (1):111
- Roelfsema MRG, Hedrich R (2005) In the light of stomatal opening: new insights into 'the Watergate'. *New Phytologist* 167 (3):665-691
- Rolland F, Baena-Gonzalez E, Sheen J (2006) Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annu Rev Plant Biol* 57:675-709
- Roth JR, Andersson DI (2004) Amplification–mutagenesis—how growth under selection contributes to the origin of genetic diversity and explains the phenomenon of adaptive mutation. *Research in microbiology* 155 (5):342-351
- Rouhi V, Samson R, Lemeur R, Van Damme P (2007) Photosynthetic gas exchange characteristics in three different almond species during drought stress and subsequent recovery. *Environmental and Experimental Botany* 59 (2):117-129
- Roycewicz P, Malamy JE (2012) Dissecting the effects of nitrate, sucrose and osmotic potential on *Arabidopsis* root and shoot system growth in laboratory assays. *Phil Trans R Soc B* 367 (1595):1489-1500
- Sack L, Holbrook NM (2006) Leaf hydraulics. *Annu Rev Plant Biol* 57:361-381
- Sato S, Nakamura Y, Kaneko T, Asamizu E, Kato T, Nakao M, Sasamoto S, Watanabe A, Ono A, Kawashima K (2008) Genome structure of the legume, *Lotus japonicus*. *DNA research* 15 (4):227-239
- Sauer N (2007) Molecular physiology of higher plant sucrose transporters. *FEBS letters* 581 (12):2309-2317
- Sauer N, Tanner W (1989) The hexose carrier from *Chlorella*: cDNA cloning of a eucaryotic H⁺-cotransporter. *FEBS letters* 259 (1):43-46
- Scarpino SV, Levin DA, Meyers LA (2014) Polyploid formation shapes flowering plant diversity. *The American Naturalist* 184 (4):456-465
- Schnable PS, Ware D, Fulton RS, Stein JC, Wei F, Pasternak S, Liang C, Zhang J, Fulton L, Graves TA (2009) The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics. *science* 326 (5956):1112-1115
- Schneider S, Schneidereit A, Konrad KR, Hajirezaei M-R, Gramann M, Hedrich R, Sauer N (2006) *Arabidopsis* INOSITOL TRANSPORTER4 mediates high-affinity H⁺ symport of myoinositol across the plasma membrane. *Plant physiology* 141 (2):565-577

- Schneider S, Schneidereit A, Udvardi P, Hammes U, Gramann M, Dietrich P, Sauer N (2007) Arabidopsis INOSITOL TRANSPORTER2 mediates H⁺ symport of different inositol epimers and derivatives across the plasma membrane. *Plant physiology* 145 (4):1395-1407
- Schoenfelder KP, Fox DT (2015) The expanding implications of polyploidy. *J Cell Biol* 209 (4):485-491
- Scholz-Starke J, Büttner M, Sauer N (2003) AtSTP6, a new pollen-specific H⁺-monosaccharide symporter from Arabidopsis. *Plant Physiology* 131 (1):70-77
- Schoof H, Zaccaria P, Gundlach H, Lemcke K, Rudd S, Kolesov G, Arnold R, Mewes H-W, Mayer KF (2002) MIPS Arabidopsis thaliana Database (MAtdB): an integrated biological knowledge resource based on the first complete plant genome. *Nucleic Acids Research* 30 (1):91-93
- Schranz ME, Mohammadin S, Edger PP (2012) Ancient whole genome duplications, novelty and diversification: the WGD Radiation Lag-Time Model. *Current opinion in plant biology* 15 (2):147-153
- Schroeder JI, Allen GJ, Hugouvieux V, Kwak JM, Waner D (2001) Guard cell signal transduction. *Annual review of plant biology* 52 (1):627-658
- Schulz A, Beyhl D, Marten I, Wormit A, Neuhaus E, Poschet G, Büttner M, Schneider S, Sauer N, Hedrich R (2011) Proton - driven sucrose symport and antiport are provided by the vacuolar transporters SUC4 and TMT1/2. *The Plant Journal* 68 (1):129-136
- Scott P (2000) Resurrection plants and the secrets of eternal leaf. *Annals of Botany* 85 (2):159-166
- Segraves KA, Anneberg TJ (2016) Species interactions and plant polyploidy. *American journal of botany* 103 (7):1326-1335
- Seki M, Narusaka M, Ishida J, Nanjo T, Fujita M, Oono Y, Kamiya A, Nakajima M, Enju A, Sakurai T (2002) Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold and high - salinity stresses using a full - length cDNA microarray. *The Plant Journal* 31 (3):279-292
- Seo PJ, Park J-M, Kang SK, Kim S-G, Park C-M (2011) An Arabidopsis senescence-associated protein SAG29 regulates cell viability under high salinity. *Planta* 233 (1):189-200
- Seoighe C (2003) Turning the clock back on ancient genome duplication. *Current opinion in genetics & development* 13 (6):636-643
- Seoighe C, Wolfe KH (1999) Yeast genome evolution in the post-genome era. *Current opinion in microbiology* 2 (5):548-554
- Sharp RE, Poroyko V, Hejlek LG, Spollen WG, Springer GK, Bohnert HJ, Nguyen HT (2004) Root growth maintenance during water deficits: physiology to functional genomics. *Journal of Experimental Botany* 55 (407):2343-2351
- Sherrard ME, Maherali H (2006) The adaptive significance of drought escape in *Avena barbata*, an annual grass. *Evolution* 60 (12):2478-2489
- Shi Q-H, Liu P, Liu M-J, Wang J-R, Xu J (2015) A novel method for rapid in vivo induction of homogeneous polyploids via calluses in a woody fruit tree (*Ziziphus jujuba* Mill.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 121 (2):423-433
- Shimazaki K, Iino M, Zeiger E (1986) Blue light-dependent proton extrusion by guard-cell protoplasts of *Vicia faba*. *Nature* 319 (6051):324-326
- Shimazaki K-i, Doi M, Assmann SM, Kinoshita T (2007) Light regulation of stomatal movement. *Annu Rev Plant Biol* 58:219-247
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2007) Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of experimental botany* 58 (2):221-227

- Simonneau T, Barrieu P, Tardieu F (1998) Accumulation rate of ABA in detached maize roots correlates with root water potential regardless of age and branching order. *Plant, Cell & Environment* 21 (11):1113-1122
- Simonneau T, Lebon E, Coupel-Ledru A, Marguerit E, Rossdeutsch L, Ollat N (2017) Adapting plant material to face water stress in vineyards: which physiological targets for an optimal control of plant water status? *OENO One* 51 (2):167-179
- Sirichandra C, Wasilewska A, Vlad F, Valon C, Leung J (2009) The guard cell as a single-cell model towards understanding drought tolerance and abscisic acid action. *Journal of Experimental Botany* 60 (5):1439-1463
- Skiryycz A, Vandenbroucke K, Clauw P, Maleux K, De Meyer B, Dhondt S, Pucci A, Gonzalez N, Hoerberichts F, Tognetti VB (2011) Survival and growth of Arabidopsis plants given limited water are not equal. *Nature biotechnology* 29 (3):212-214
- Slewinski TL (2011) Diverse functional roles of monosaccharide transporters and their homologs in vascular plants: a physiological perspective. *Molecular plant* 4 (4):641-662
- Slewinski TL, Meeley R, Braun DM (2009) Sucrose transporter1 functions in phloem loading in maize leaves. *Journal of Experimental Botany* 60 (3):881-892
- Slotte T, Hazzouri KM, Ågren JA, Koenig D, Maumus F, Guo Y-L, Steige K, Platts AE, Escobar JS, Newman LK (2013) The *Capsella rubella* genome and the genomic consequences of rapid mating system evolution. *Nature genetics* 45 (7):831-835
- Soltis DE, Albert VA, Leebens-Mack J, Bell CD, Paterson AH, Zheng C, Sankoff D, Wall PK, Soltis PS (2009) Polyploidy and angiosperm diversification. *American journal of botany* 96 (1):336-348
- Soltis DE, Visger CJ, Soltis PS (2014) The polyploidy revolution then... and now: Stebbins revisited. *American Journal of Botany* 101 (7):1057-1078
- Soltis PS, Soltis DE (2016) Ancient WGD events as drivers of key innovations in angiosperms. *Current opinion in plant biology* 30:159-165
- Song Q, Chen ZJ (2015) Epigenetic and developmental regulation in plant polyploids. *Current opinion in plant biology* 24:101-109
- Sperdoulis I, Moustakas M (2012) Interaction of proline, sugars, and anthocyanins during photosynthetic acclimation of *Arabidopsis thaliana* to drought stress. *Journal of plant physiology* 169 (6):577-585
- Sperry J, Hacke U, Oren R, Comstock J (2002) Water deficits and hydraulic limits to leaf water supply. *Plant, Cell & Environment* 25 (2):251-263
- Srivastava AC, Ganesan S, Ismail IO, Ayre BG (2008) Functional characterization of the Arabidopsis AtSUC2 sucrose/H⁺ symporter by tissue-specific complementation reveals an essential role in phloem loading but not in long-distance transport. *Plant Physiology* 148 (1):200-211
- Stadler R, Büttner M, Ache P, Hedrich R, Ivashikina N, Melzer M, Shearson SM, Smith SM, Sauer N (2003) Diurnal and light-regulated expression of AtSTP1 in guard cells of Arabidopsis. *Plant Physiology* 133 (2):528-537
- Stebbins GL (1984) Polyploidy and the distribution of the arctic-alpine flora: new evidence and a new approach. *Bot Helvetica* 94 (1):1-13
- Stoelzle S, Kagawa T, Wada M, Hedrich R, Dietrich P (2003) Blue light activates calcium-permeable channels in Arabidopsis mesophyll cells via the phototropin signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (3):1456-1461
- Sugino RP, Innan H (2006) Selection for more of the same product as a force to enhance concerted evolution of duplicated genes. *Trends in Genetics* 22 (12):642-644
- Taiz L, Zeiger E (2010) *Plant physiology* 5th Ed. Sunderland, MA: Sinauer Associates

- Taji T, Ohsumi C, Iuchi S, Seki M, Kasuga M, Kobayashi M, Yamaguchi - Shinozaki K, Shinozaki K (2002) Important roles of drought - and cold - inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 29 (4):417-426
- Talbott LD, Zeiger E (1998) The role of sucrose in guard cell osmoregulation. *Journal of Experimental Botany*:329-337
- Tallman G, Zeiger E (1988) Light quality and osmoregulation in *Vicia* guard cells. *Plant physiology* 88 (3):887-895
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution* 30 (12):2725-2729
- Tang H, Bowers JE, Wang X, Ming R, Alam M, Paterson AH (2008) Synteny and collinearity in plant genomes. *Science* 320 (5875):486-488
- Tang H, Bowers JE, Wang X, Paterson AH (2010) Angiosperm genome comparisons reveal early polyploidy in the monocot lineage. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (1):472-477
- Tang H, Lyons E, Pedersen B, Schnable JC, Paterson AH, Freeling M (2011) Screening synteny blocks in pairwise genome comparisons through integer programming. *BMC bioinformatics* 12 (1):102
- Tank DC, Eastman JM, Pennell MW, Soltis PS, Soltis DE, Hinchliff CE, Brown JW, Sessa EB, Harmon LJ (2015) Nested radiations and the pulse of angiosperm diversification: increased diversification rates often follow whole genome duplications. *New Phytologist* 207 (2):454-467
- te Beest M, Le Roux JJ, Richardson DM, Brysting AK, Suda J, Kubešová M, Pyšek P (2011) The more the better? The role of polyploidy in facilitating plant invasions. *Annals of Botany* 109 (1):19-45
- Theodoridis S, Randin C, Broennimann O, Patsiou T, Conti E (2013) Divergent and narrower climatic niches characterize polyploid species of European primroses in *Primula* sect. *Aleuritia*. *Journal of Biogeography* 40 (7):1278-1289
- Thompson JN (1994) *The coevolutionary process*. University of Chicago Press,
- Tomato Genome C (2012) The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature* 485 (7400):635-641
- Truernit E, Sauer N (1995) The promoter of the *Arabidopsis thaliana* SUC2 sucrose-H⁺ symporter gene directs expression of β -glucuronidase to the phloem: evidence for phloem loading and unloading by SUC2. *Planta* 196 (3):564-570
- Truernit E, Stadler R, Baier K, Sauer N (1999) A male gametophyte - specific monosaccharide transporter in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 17 (2):191-201
- Turgeon R, Beebe DU (1991) The evidence for symplastic phloem loading. *Plant Physiology* 96 (2):349-354
- Tuskan GA, Difazio S, Jansson S, Bohlmann J, Grigoriev I, Hellsten U, Putnam N, Ralph S, Rombauts S, Salamov A (2006) The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *science* 313 (5793):1596-1604
- Van de Peer Y (2011) A mystery unveiled. *Genome biology* 12 (5):113
- Van de Peer Y, Fawcett JA, Proost S, Sterck L, Vandepoele K (2009) The flowering world: a tale of duplications. *Trends in plant science* 14 (12):680-688
- Van de Peer Y, Mizrachi E, Marchal K (2017) The evolutionary significance of polyploidy. *Nature Reviews Genetics* 18 (7):411-424
- van den Bergh E, Hofberger JA, Schranz ME (2016) Flower power and the mustard bomb: Comparative analysis of gene and genome duplications in glucosinolate biosynthetic

- pathway evolution in Cleomaceae and Brassicaceae. *American journal of botany* 103 (7):1212-1222
- Vanneste K, Baele G, Maere S, Van de Peer Y (2014) Analysis of 41 plant genomes supports a wave of successful genome duplications in association with the Cretaceous–Paleogene boundary. *Genome research* 24 (8):1334-1347
- Varshney RK, Song C, Saxena RK, Azam S, Yu S, Sharpe AG, Cannon S, Baek J, Rosen BD, Tar'an B (2013) Draft genome sequence of chickpea (*Cicer arietinum*) provides a resource for trait improvement. *Nature biotechnology* 31 (3):240-246
- Vavasseur A, Raghavendra AS (2005) Guard cell metabolism and CO₂ sensing. *New Phytologist* 165 (3):665-682
- Veitia RA (2003) Nonlinear effects in macromolecular assembly and dosage sensitivity. *Journal of Theoretical Biology* 220 (1):19-25
- Veitia RA (2005) Gene dosage balance: deletions, duplications and dominance. *Trends in Genetics* 21 (1):33-35
- Vekemans D, Proost S, Vanneste K, Coenen H, Viaene T, Ruelens P, Maere S, Van de Peer Y, Geuten K (2012) Gamma paleohexaploidy in the stem lineage of core eudicots: significance for MADS-box gene and species diversification. *Molecular biology and evolution* 29 (12):3793-3806
- Velasco R, Zharkikh A, Affourtit J, Dhingra A, Cestaro A, Kalyanaraman A, Fontana P, Bhatnagar SK, Troggio M, Pruss D (2010) The genome of the domesticated apple (*Malus [times] domestica* Borkh.). *Nature genetics* 42 (10):833-839
- Velasco R, Zharkikh A, Troggio M, Cartwright DA, Cestaro A, Pruss D, Pindo M, FitzGerald LM, Vezzulli S, Reid J (2007) A high quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety. *PloS one* 2 (12):e1326
- Vergara F, Kikuchi J, Breuer C (2016) Artificial autopolyploidization modifies the tricarboxylic acid cycle and GABA shunt in *Arabidopsis thaliana* Col-0. *Scientific reports* 6
- Vogel JP, Garvin DF, Mockler TC, Schmutz J, Rokhsar D, Bevan MW, Barry K, Lucas S, Harmon-Smith M, Lail K (2010) Genome sequencing and analysis of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Nature* 463 (7282):763-768
- Walsh JB (1995) How often do duplicated genes evolve new functions? *Genetics* 139 (1):421-428
- Wang D, Pan Y, Zhao X, Zhu L, Fu B, Li Z (2011) Genome-wide temporal-spatial gene expression profiling of drought responsiveness in rice. *BMC genomics* 12 (1):149
- Wang H, Wang X, Zhang S, Lou C (2000) Muscarinic acetylcholine receptor is involved in acetylcholine regulating stomatal movement. *Chinese Science Bulletin* 45 (3):250-252
- Wang K, Wang Z, Li F, Ye W, Wang J, Song G, Yue Z, Cong L, Shang H, Zhu S (2012) The draft genome of a diploid cotton *Gossypium raimondii*. *Nature genetics* 44 (10):1098-1103
- Wang W, Haberer G, Gundlach H, Gläßer C, Nussbaumer T, Luo M, Lomsadze A, Borodovsky M, Kerstetter R, Shanklin J (2014) The *Spirodela polyrhiza* genome reveals insights into its neotenus reduction fast growth and aquatic lifestyle. *Nature communications* 5
- Wang W, Zhou H, Ma B, Owiti A, Korban SS, Han Y (2016) Divergent Evolutionary Pattern of Sugar Transporter Genes is Associated with the Difference in Sugar Accumulation between Grasses and Eudicots. *Scientific Reports* 6
- Wang Z-Y, Tobin EM (1998) Constitutive expression of the CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1) gene disrupts circadian rhythms and suppresses its own expression. *Cell* 93 (7):1207-1217

- Warming E (1909) *Oecology Of Plants An Interoduction To The Study Of Plant-Communities*. University Press; Oxford,; Humphrey Milford; London,
- Wendel JF (2000) Genome evolution in polyploids. In: *Plant molecular evolution*. Springer, pp 225-249
- White S, Doebley J (1998) Of genes and genomes and the origin of maize. *Trends in Genetics* 14 (8):327-332
- Whitkus R, Doebley J, Lee M (1992) Comparative genome mapping of Sorghum and maize. *Genetics* 132 (4):1119-1130
- Wikström N, Savolainen V, Chase MW (2001) Evolution of the angiosperms: calibrating the family tree. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 268 (1482):2211-2220
- Wilkinson S (1999) pH as a stress signal. *Plant Growth Regulation* 29 (1):87-99
- Wilkinson S, Davies WJ (2002) ABA - based chemical signalling: the co - ordination of responses to stress in plants. *Plant, cell & environment* 25 (2):195-210
- Williams LE, Lemoine R, Sauer N (2000) Sugar transporters in higher plants—a diversity of roles and complex regulation. *Trends in plant science* 5 (7):283-290
- Wingenter K, Trentmann O, Wünsch I, Hörmiller II, Heyer AG, Reinders J, Schulz A, Geiger D, Hedrich R, Neuhaus HE (2011) A member of the mitogen - activated protein 3 - kinase family is involved in the regulation of plant vacuolar glucose uptake. *The Plant Journal* 68 (5):890-900
- Wolfe KH, Shields DC (1997) Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature* 387 (6634):708
- Wolfenstetter S, Wirsching P, Dotzauer D, Schneider S, Sauer N (2012) Routes to the tonoplast: the sorting of tonoplast transporters in *Arabidopsis* mesophyll protoplasts. *The Plant Cell* 24 (1):215-232
- Wood TE, Takebayashi N, Barker MS, Mayrose I, Greenspoon PB, Rieseberg LH (2009) The frequency of polyploid speciation in vascular plants. *Proceedings of the national Academy of sciences* 106 (33):13875-13879
- Wormit A, Trentmann O, Feifer I, Lohr C, Tjaden J, Meyer S, Schmidt U, Martinoia E, Neuhaus HE (2006) Molecular identification and physiological characterization of a novel monosaccharide transporter from *Arabidopsis* involved in vacuolar sugar transport. *The Plant Cell Online* 18 (12):3476-3490
- Wright SI, Andolfatto P (2008) The impact of natural selection on the genome: emerging patterns in *Drosophila* and *Arabidopsis*. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*:193-213
- Xiong L, Wang R-G, Mao G, Koczan JM (2006) Identification of drought tolerance determinants by genetic analysis of root response to drought stress and abscisic acid. *Plant physiology* 142 (3):1065-1074
- Xu G, Ma H, Nei M, Kong H (2009) Evolution of F-box genes in plants: different modes of sequence divergence and their relationships with functional diversification. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (3):835-840
- Xu Y, Tao Y, Cheung LS, Fan C, Chen L-Q, Xu S, Perry K, Frommer WB, Feng L (2014) Structures of SemiSWEET transporters in two distinct conformations. *Nature* 515 (7527):448
- Yamada K, Osakabe Y, Mizoi J, Nakashima K, Fujita Y, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2010) Functional analysis of an *Arabidopsis thaliana* abiotic stress-inducible facilitated diffusion transporter for monosaccharides. *Journal of Biological Chemistry* 285 (2):1138-1146
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2005) Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic-and cold-stress-responsive promoters. *Trends in plant science* 10 (2):88-94

- Yan N (2013a) Structural advances for the major facilitator superfamily (MFS) transporters. *Trends in biochemical sciences* 38 (3):151-159
- Yan N (2013b) Structural investigation of the proton-coupled secondary transporters. *Current opinion in structural biology* 23 (4):483-491
- Yang L, Gaut BS (2011) Factors that contribute to variation in evolutionary rate among *Arabidopsis* genes. *Molecular Biology and Evolution* 28 (8):2359-2369
- Yang R, Jarvis DJ, Chen H, Beilstein M, Grimwood J, Jenkins J, Shu S, Prochnik S, Xin M, Ma C (2013) The reference genome of the halophytic plant *Eutrema salsugineum*. *Frontiers in Plant Science* 4:46
- Yang W, Guo Z, Huang C, Duan L, Chen G, Jiang N, Fang W, Feng H, Xie W, Lian X (2014) Combining high-throughput phenotyping and genome-wide association studies to reveal natural genetic variation in rice. *Nature communications* 5
- Yu Y, Xiang Q, Manos PS, Soltis DE, Soltis PS, Song B-H, Cheng S, Liu X, Wong G (2017) Whole-genome duplication and molecular evolution in *Cornus* L.(Cornaceae)—Insights from transcriptome sequences. *PloS one* 12 (2):e0171361
- Zhang G, Liu X, Quan Z, Cheng S, Xu X, Pan S, Xie M, Zeng P, Yue Z, Wang W (2012) Genome sequence of foxtail millet (*Setaria italica*) provides insights into grass evolution and biofuel potential. *Nature biotechnology* 30 (6):549-554
- Zhang J (2003) Evolution by gene duplication: an update. *Trends in ecology & evolution* 18 (6):292-298
- Zhang J, Davies WJ (1987) Increased synthesis of ABA in partially dehydrated root tips and ABA transport from roots to leaves. *Journal of Experimental Botany* 38 (12):2015-2023
- Zhang J, Davies WJ (1989) Abscisic acid produced in dehydrating roots may enable the plant to measure the water status of the soil. *Plant, Cell & Environment* 12 (1):73-81
- Zhao X-p, Si Y, Hanson RE, Crane CF, Price HJ, Stelly DM, Wendel JF, Paterson AH (1998) Dispersed repetitive DNA has spread to new genomes since polyploid formation in cotton. *Genome Research* 8 (5):479-492
- Zufferey V, Cochard H, Ameglio T, Spring JL, Viret O (2011) Diurnal cycles of embolism formation and repair in petioles of grapevine (*Vitis vinifera* cv. Chasselas). *Journal of experimental botany* 62 (11):3885-3894

Annexes

Annexe 1 : Noms des ERD6-like identifiés sur les bases de données et dans l'étude

Espèce	Nom sur la base de données	Nom dans cette étude
<i>Aquilegia caerulea</i>	Aquca_026_00082.1	Ac26_082
	Aquca_026_00083.1	Ac26_083
	Aquca_017_00358.1	Ac17_358
	Aquca_026_00097.1	Ac26_097
	Aquca_007_00225.2	Ac07_225
	Aquca_010_00507.2	Ac10_507
	Aquca_017_00357.1	Ac17_357
<i>Arabidopsis halleri</i>	Araha.1433s0002.1	Ah01433s02
	Araha.28364s0001.1	Ah28364s01
	Araha.3226s0005.1	Ah03226s05
	Araha.32703s0010.1	Ah32703s10
	Araha.32703s0011.1	Ah32703s11
	Araha.4425s0002.1	Ah04425s02
	Araha.4531s0007.1	Ah04531s07
	Araha.4531s0008.1	Ah04531s08
	Araha.4531s0009.1	Ah04531s09
	Araha.49879s0001.1	Ah49879s01
	Araha.5150s0020.1	Ah05150s20
	Araha.5150s0021.1	Ah05150s21
	Araha.6366s0002.1	Ah06366s02
	Araha.67621s0001.1	Ah67621s01
<i>Arabidopsis lyrata</i>	474748	A1474748
	483991	A1483991
	470966	A1470966
	326968	A1326968
	477802	A1477802
	919640	A1919640
	488771	A1488771
	470961	A1470961
	477829	A1477829
	470964	A1470964
	894704	A1894704
	340683	A1340683
	929974	A1929974
	477798	A1477798
	497320	A1497320
	895543	A1895543
	926902	A1926902
	472174	A1472174

Espèce	Nom sur la base de données	Nom dans cette étude
	490113	Al490113
<i>Arabidopsis thaliana</i>	At1g08890.1	At1g08890
	At1g08900.1	At1g08900
	At1g08920.1	At1g08920
	At1g08930.1	At1g08930
	At1g19450.1	At1g19450
	At1g54730.2	At1g54730
	At1g75220.1	At1g75220
	At2g48020.1	At2g48020
	At3g05150.1	At3g05150
	At3g05155.1	At3g05155
	At3g05160.1	At3g05160
	At3g05165.1	At3g05165
	At3g05400.1	At3g05400
	At3g20460.1	At3g20460
	At4g04750.1	At4g04750
	At4g04760.1	At4g04760
	At5g18840.1	At5g18840
	At5g27350.1	At5g27350
	At5g27360.1	At5g27360
<i>Amborella trichopoda</i>	evm_27.model.AmTr_v1.0_scaffold00019.449	Atr019.449
	evm_27.model.AmTr_v1.0_scaffold00019.451	Atr019.451
	evm_27.model.AmTr_v1.0_scaffold00103.38	Atr103.038
	evm_27.model.AmTr_v1.0_scaffold00019.454	Atr019.454
	evm_27.model.AmTr_v1.0_scaffold00011.167	Atr011.167
<i>Brachypodium ditachyon</i>	Bradi5g02520.1	Bd5g02520
	Bradi4g11680.1	Bd4g11680
	Bradi1g61750.1	Bd1g61750
	Bradi1g61757.2	Bd1g61757
	Bradi2g16070.1	Bd2g16070
	Bradi2g16100.1	Bd2g16100
	Bradi2g14900.1	Bd2g14900
<i>Brassica rapa</i>	Brara.A02276.1	BrA02276
	Brara.F00564.1	BrF00564
	Brara.F02871.1	BrF02871
	Brara.H02853.1	BrH02853

Espèce	Nom sur la base de données	Nom dans cette étude
	Brara.I05287.1	BrI05287
	Brara.B03538.1	BrB03538
	Brara.E03408.1	BrE03408
	Brara.G01147.1	BrG01147
	Brara.G00156.1	BrG00156
	Brara.I05286.1	BrI05286
	Brara.B03536.1	BrB03536
	Brara.F00565.1	BrF00565
	Brara.H02852.1	BrH02852
	Brara.I01709.1	BrI01709
	Brara.J01693.1	BrJ01693
	Brara.E02158.1	BrE02158
	Brara.E03369.1	BrE03369
	Brara.F00562.1	BrF00562
	Brara.A03742.1	BrA03742
	Brara.B03534.1	BrB03534
	Brara.E02160.1	BrE02160
	Brara.E03407.1	BrE03407
	Brara.B02653.1	BrB02653
	Brara.C02738.1	BrC02738
	Brara.G03336.1	BrG03336
	Brara.I04735.1	BrI04735
	Brara.G02233.1	BrG02233
	Brara.B02151.1	BrB02151
	Brara.F01377.1	BrF01377
	Brara.I02205.1	BrI02205
<i>Capsella rubella</i>	Carubv10022354m	Cr10022354
	Carubv10010993m	Cr10010993
	Carubv10013527m	Cr10013527
	Carubv10012279m	Cr10012279
	Carubv10000857m	Cr10000857
	Carubv10003384m	Cr10003384
	Carubv10000842m	Cr10000842
	Carubv10013612m	Cr10013612
	Carubv10015164m	Cr10015164
	Carubv10000868m	Cr10000868
	Carubv10015470m	Cr10015470
	Carubv10000845m	Cr10000845
	Carubv10020200m	Cr10020200
	Carubv10012080m	Cr10012080
	Carubv10015811m	Cr10015811

Espèce	Nom sur la base de données	Nom dans cette étude
	Carubv10002998m	Cr10002998
	Carubv10021344m	Cr10021344
<i>Carica papaya</i>	evm.model.supercontig_48.2	Cp48.2
	evm.model.supercontig_1088.3	Cp1088.3
	evm.model.supercontig_447.2	Cp447.2
	evm.model.supercontig_9.137	Cp9.137
	evm.model.supercontig_48.1	Cp48.1
	evm.model.supercontig_84.123	Cp84.123
	evm.model.supercontig_925.1	Cp925.1
	evm.model.supercontig_6.119	Cp6.119
	evm.model.supercontig_1088.2	Cp1088.2
	evm.TU.contig_31100.1	Cp31100.1
	evm.TU.contig_37821.1	Cp37821.1
<i>Cicer arietinum</i>	gi 502113427 ref XP_004494647.1	Ca502113427
	gi 502109384 ref XP_004493632.1	Ca502109384
	gi 502151198 ref XP_004508324.1	Ca502151198
	gi 502078858 ref XP_004486078.1	Ca502078858
	gi 502126054 ref XP_004499162.1	Ca502126054
	gi 502153237 ref XP_004509267.1	Ca502153237
	gi 502161145 ref XP_004512048.1	Ca502161145
<i>Citrus clementina</i>	Ciclev10001032m	Cc10001032
	Ciclev10000980m	Cc10000980
	Ciclev10000960m	Cc10000960
	Ciclev10019923m	Cc10019923
	Ciclev10003224m	Cc10003224
	Ciclev10019918m	Cc10019918
	Ciclev10004839m	Cc10004839
	Ciclev10003870m	Cc10003870
	Ciclev10001263m	Cc10001263
	Ciclev10025481m	Cc10025481
	Ciclev10024572m	Cc10024572
	Ciclev10001562m	Cc10001562
<i>Citrus sinensis</i>	orange1.1g011956m	Csi011956
	orange1.1g011565m	Csi011565
	orange1.1g011388m	Csi011388
	orange1.1g011470m	Csi011470
	orange1.1g018767m	Csi018767
	orange1.1g019756m	Csi019756
	orange1.1g042030m	Csi042030
	orange1.1g035493m	Csi035493
	orange1.1g048699m	Csi048699

Espèce	Nom sur la base de données	Nom dans cette étude
<i>Cucumis melo</i>	MELO3C003830.1	Cm003830
	MELO3C006595.1	Cm006595
	MELO3C014417.1	Cm014417
	MELO3C010946.1	Cm010946
	MELO3C021377.1	Cm021377
	MELO3C015350.1	Cm015350
	MELO3C015349.1	Cm015349
<i>Cucumis sativus</i>	Cucsa.163640.1	Csa163640
	Cucsa.163630.1	Csa163630
	Cucsa.184350.1	Csa184350
	Cucsa.363370.1	Csa363370
	Cucsa.253700.1	Csa253700
	Cucsa.342370.1	Csa342370
	Cucsa.232130.3	Csa232130
<i>Eucalyptus grandis</i>	Eucgr.B02026.1	EgB02026
	Eucgr.B02023.1	EgB02023
	Eucgr.D01065.1	EgD01065
	Eucgr.B02024.1	EgB02024
	Eucgr.B02014.1	EgB02014
	Eucgr.B02016.1	EgB02016
	Eucgr.B02021.1	EgB02021
	Eucgr.B02013.1	EgB02013
	Eucgr.B02020.1	EgB02020
	Eucgr.B02019.1	EgB02019
	Eucgr.D01066.1	EgD01066
	Eucgr.B02017.1	EgB02017
	Eucgr.B02018.1	EgB02018
	Eucgr.D01063.1	EgD01063
	Eucgr.H04441.1	EgH04441
	Eucgr.H04439.1	EgH04439
	Eucgr.B02025.1	EgB02025
	Eucgr.H04438.1	EgH04438
	Eucgr.B02015.1	EgB02015
	Eucgr.H01560.1	EgH01560
	Eucgr.H01602.1	EgH01602
	Eucgr.H01571.1	EgH01571
	Eucgr.H04440.1	EgH04440
	Eucgr.D01064.1	EgD01064
	Eucgr.H01551.1	EgH01551

Espèce	Nom sur la base de données	Nom dans cette étude
	Eucgr.F01888.1	EgF01888
	Eucgr.H01278.1	EgH01278
	Eucgr.I02439.1	EgI02439
	Eucgr.F01571.1	EgF01571
	Eucgr.I02438.1	EgI02438
	Eucgr.L01459.1	EgL01459
	Eucgr.I02436.1	EgI02436
	Eucgr.H01597.1	EgH01597
	Eucgr.H01584.1	EgH01584
	Eucgr.H01593.1	EgH01593
	Eucgr.I02437.1	EgI02437
	Eucgr.H01565.1	EgH01565
<i>Genlisea aurea</i>	gi 527187513 gb EPS59997.1	Ga527187513
	gi 527204510 gb EPS70659.1	Ga527204510
	gi 527191008 gb EPS62019.1	Ga527191008
	gi 527203935 gb EPS70247.1	Ga527203935
	gi 527193144 gb EPS63288.1	Ga527193144
	gi 527191859 gb EPS62514.1	Ga527191859
<i>Glycine max</i>	Glyma03g40100.1	Gm03g40100
	Glyma19g42740.2	Gm19g42740
	Glyma03g40160.1	Gm03g40160
	Glyma19g42690.2	Gm19g42690
	Glyma13g28450.1	Gm13g28450
	Glyma13g28440.2	Gm13g28440
	Glyma15g10630.1	Gm15g10630
	Glyma19g33480.1	Gm19g33480
	Glyma03g30550.1	Gm03g30550
	Glyma14g08070.1	Gm14g08070
	Glyma17g36950.1	Gm17g36950
	Glyma19g42710.2	Gm19g42710
	Glyma16g25310.1	Gm16g25310
	Glyma02g06280.1	Gm02g06280
	Glyma02g06291.1	Gm02g06291
	Glyma16g25320.2	Gm16g25320
	Glyma07g38275.1	Gm07g38275
	Glyma17g02461.1	Gm17g02461
	Glyma03g40121.1	Gm03g40121
<i>Gossypium raimondii</i>	Gorai.007G293200.1	Gr007G2932
	Gorai.007G293100.1	Gr007G2931
	Gorai.004G084300.1	Gr004G0843

Espèce	Nom sur la base de données	Nom dans cette étude
	Gorai.008G006300.1	Gr008G0063
	Gorai.007G293000.1	Gr007G2930
	Gorai.005G056400.1	Gr005G0564
	Gorai.011G183500.1	Gr011G1835
	Gorai.007G292500.1	Gr007G2925
	Gorai.007G292300.1	Gr007G2923
	Gorai.004G054600.1	Gr004G0546
	Gorai.005G108100.1	Gr005G1081
	Gorai.007G292700.1	Gr007G2927
	Gorai.010G009900.1	Gr010G0099
	Gorai.007G292400.1	Gr007G2924
	Gorai.007G050600.1	Gr007G0506
	Gorai.007G202700.1	Gr007G2027
	Gorai.013G203800.1	Gr013G2038
	Gorai.007G292200.1	Gr007G2922
	Gorai.007G292900.1	Gr007G2929
<i>Linum usitatissimum</i>	Lus10029960	Lu10029960
	Lus10035354	Lu10035354
	Lus10035356	Lu10035356
	Lus10033812	Lu10033812
	Lus10029962	Lu10029962
	Lus10033814	Lu10033814
	Lus10029964	Lu10029964
	Lus10029629	Lu10029629
	Lus10008183	Lu10008183
	Lus10012780	Lu10012780
	Lus10027975	Lu10027975
	Lus10008179	Lu10008179
	Lus10029966	Lu10029966
	Lus10008184	Lu10008184
	Lus10027976	Lu10027976
	Lus10008182	Lu10008182
	Lus10042676	Lu10042676
	Lus10029963	Lu10029963
	Lus10033795	Lu10033795
	Lus10001656	Lu10001656
	Lus10000924	Lu10000924
	Lus10002534	Lu10002534
	Lus10028303	Lu10028303
	Lus10041748	Lu10041748
	Lus10018957	Lu10018957

Espèce	Nom sur la base de données	Nom dans cette étude
	Lus10029965	Lu10029965
	Lus10033815	Lu10033815
	Lus10033995	Lu10033995
	Lus10035355	Lu10035355
	Lus10029961	Lu10029961
<i>Lotus japonicus</i>	chr1.CM0544.700.r2.m	Lj544.700
	chr6.CM0139.1770.r2.m	Lj139.1770
	chr4.CM0387.140.r2.m	Lj387.140
	chr4.CM0165.1020.r2.m	Lj165.1020
<i>Malus domestica</i>	MDP0000325761	Md325761
	MDP0000282889	Md282889
	MDP0000231242	Md231242
	MDP0000341008	Md341008
	MDP0000319833	Md319833
	MDP0000149427	Md149427
	MDP0000293785	Md293785
	MDP0000204437	Md204437
	MDP0000299992	Md299992
	MDP0000180800	Md180800
	MDP0000163468	Md163468
<i>Manihot esculenta</i>	cassava4.1_006483m	Me06483
	cassava4.1_006494m	Me06494
	cassava4.1_006352m	Me06352
	cassava4.1_007781m	Me07781
	cassava4.1_022554m	Me22554
	cassava4.1_006595m	Me06595
	cassava4.1_023630m	Me23630
	cassava4.1_006464m	Me06464
	cassava4.1_033982m	Me33982
	cassava4.1_006521m	Me06521
	cassava4.1_006443m	Me06443
	cassava4.1_006507m	Me06507
	cassava4.1_026688m	Me26688
	cassava4.1_010998m	Me10998
<i>Medicago truncatula</i>	Medtr7g113960.1	Mt7g113960
	Medtr7g113970.1	Mt7g113970
	Medtr4g118610.1	Mt4g118610
	Medtr2g020710.1	Mt2g020710
	Medtr7g094110.1	Mt7g094110
	Medtr7g094450.1	Mt7g094450

Espèce	Nom sur la base de données	Nom dans cette étude
	Medtr1g022315.1	Mt1g022315
	Medtr8g077310.1	Mt8g077310
	Medtr5g020270.1	Mt5g020270
	Medtr8g077300.1	Mt8g077300
<i>Mimulus guttatus</i>	Migut.B01284.1	MgB01284
	Migut.D01000.1	MgD01000
	Migut.G00231.1	MgG00231
	Migut.C00744.1	MgC00744
	Migut.N00488.1	MgN00488
	Migut.H00985.1	MgH00985
<i>Musa acuminata</i>	GSMUA_Achr1T04760	Ma1T04760
	GSMUA_Achr5T09100	Ma5T09100
	GSMUA_Achr10T01380	Ma10T01380
	GSMUA_Achr9T17450	Ma9T17450
	GSMUA_Achr8T21810	Ma8T21810
<i>Nelumbo nucifera</i>	gi 719973090 ref XP_010279395.1	Nn719973090
	gi 720082347 ref XP_010242562.1 	Nn720082347
	gi 720082350 ref XP_010242564.1 	Nn720082350
	gi 720082358 ref XP_010242567.1 	Nn720082358
	gi 720082340 ref XP_010242560.1 	Nn720082340
	gi 720024476 ref XP_010263644.1	Nn720024476
	gi 719996558 ref XP_010254811.1 	Nn719996558
	gi 720088918 ref XP_010244606.1	Nn720088918
<i>Oryza sativa</i>	LOC_Os03g24860.1	Os03g24860
	LOC_Os03g24870.1	Os03g24870
	LOC_Os05g49260.1	Os05g49260
	LOC_Os05g49270.1	Os05g49270
	LOC_Os05g50280.1	Os05g50280
	LOC_Os11g42430.1	Os11g42430
<i>Panicum halli</i>	Pahal.0068s0179.1	Ph68s0179
	Pahal.0068s0180.1	Ph68s0180
	Pahal.0073s0032.1	Ph73s0032
	Pahal.0073s0033.1	Ph73s0033
	Pahal.0019s0272.1	Ph19s0272
	Pahal.0019s0177.1	Ph19s0177
	Pahal.0019s0273.1	Ph19s0273
<i>Panicum virgatum</i>	Pavir.Ea00876.1	PviEa00876
	Pavir.Ea00877.1	PviEa00877
	Pavir.Ia03316.1	PviIa03316
	Pavir.Ib01738.1	PviIb01738
	Pavir.Ib01737.1	PviIb01737

Espèce	Nom sur la base de données	Nom dans cette étude
	Pavir.J03292.1	PviJ03292
	Pavir.J02099.1	PviJ02099
	Pavir.Ca00999.1	PviCa00999
	Pavir.J08880.1	PviJ08880
	Pavir.Ca00953.1	PviCa00953
	Pavir.Ca00954.1	PviCa00954
	Pavir.J04598.1	PviJ04598
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Phvul.006G095600.1	Pvu6G095600
	Phvul.006G095300.1	Pvu6G095300
	Phvul.006G159600.1	Pvu6G159600
	Phvul.001G147200.1	Pvu1G147200
	Phvul.003G254100.1	Pvu3G254100
	Phvul.006G095200.1	Pvu6G095200
<i>Phoenix dactylifera</i>	gi 672142517 ref XP_008795112.1	Pd672142517
	gi 672142521 ref XP_008795114.1	Pd672142521
	gi 672161777 ref XP_008800718.1	Pd672161777
	gi 672178065 ref XP_008809152.1	Pd672178065
<i>Physcomitrella patens</i>	Phpat.024G076500.1	Ppa024G076500
	Phpat.020G006100.1	Ppa020G006100
	Phpat.008G091700.1	Ppa008G091700
<i>Pinus taeda</i>	PITA_000025048	Pita25048
	PITA_000040871	Pita40871
	PITA_000025047	Pita25047
	PITA_000041810	Pita41810
	PITA_000036192	Pita36192
	PITA_000067896	Pita67896
	PITA_000073858	Pita73858
	PITA_000030243	Pita30243
	PITA_000012987	Pita12987
<i>Populus trichocarpa</i>	Potri.013G027700.1	Ptr013G027700
	Potri.013G027800.1	Ptr013G027800
	Potri.002G212900.1	Ptr002G212900
	Potri.013G027500.1	Ptr013G027500
	Potri.010G026500.1	Ptr010G026500
	Potri.005G039900.1	Ptr005G039900

Espèce	Nom sur la base de données	Nom dans cette étude
	Potri.002G259900.1	Ptr002G259900
	Potri.014G136600.1	Ptr014G136600
	Potri.007G024300.1	Ptr007G024300
	Potri.005G040000.1	Ptr005G040000
	Potri.005G037000.1	Ptr005G037000
<i>Prunus persica</i>	ppa004943m	Ppe004943
	ppa004636m	Ppe004636
	ppa005144m	Ppe005144
	ppa018319m	Ppe018319
	ppa016361m	Ppe016361
	ppa004911m	Ppe004911
<i>Ricinus comunis</i>	30128.m008789	Rc30128.008789
	30128.m008706	Rc30128.008706
	30128.m008719	Rc30128.008719
	30128.m008707	Rc30128.008707
	29703.m001518	Rc29703.001518
	29726.m003958	Rc29726.003958
	30128.m008705	Rc30128.008705
	30170.m014050	Rc30170.014050
	29634.m002113	Rc29634.002113
<i>Salix purpurea</i>	SapurV1A.0353s0210.1	Spu0353s0210
	SapurV1A.0511s0020.1	Spu0511s0020
	SapurV1A.0353s0190.1	Spu0353s0190
	SapurV1A.0046s0020.1	Spu0046s0020
	SapurV1A.0053s0400.1	Spu0053s0400
	SapurV1A.0353s0180.1	Spu0353s0180
	SapurV1A.0152s0380.1	Spu0152s0380
	SapurV1A.0511s0030.1	Spu0511s0030
	SapurV1A.0511s0040.1	Spu0511s0040
	SapurV1A.0254s0210.1	Spu0254s0210
	SapurV1A.0418s0220.1	Spu0418s0220
	SapurV1A.0978s0120.1	Spu0978s0120

Espèce	Nom sur la base de données	Nom dans cette étude
	SapurV1A.0511s0010.1	Spu0511s0010
<i>Selaginella moellendorffii</i>	437958	Sm437958
	99846	Sm99846
<i>Setaria italica</i>	Si001072m	Si001072
	Si035122m	Si035122
	Si035288m	Si035288
	Si004653m	Si004653
	Si021831m	Si021831
	Si021829m	Si021829
	Si021832m	Si021832
<i>Solanum lycopersicum</i>	Solyc01g098500	Sl1g098500
	Solyc04g080460	Sl4g080460
	Solyc02g062750	Sl2g062750
	Solyc12g089180	Sl12g089180
	Solyc01g080680	Sl1g080680
	Solyc09g074230	Sl9g074230
	Solyc02g085170	Sl2g085170
	Solyc02g005180	Sl2g005180
	Solyc01g098560	Sl1g098560
	Solyc01g098490	Sl1g098490
<i>Solanum tuberosum</i>	PGSC0003DMT400073537	St73537
	PGSC0003DMT400016988	St16988
	PGSC0003DMT400073532	St73532
	PGSC0003DMT400009830	St09830
	PGSC0003DMT400073530	St73530
	PGSC0003DMT400016079	St16079
	PGSC0003DMT400039972	St39972
	PGSC0003DMT400009580	St09580
	PGSC0003DMT400009273	St09273
	PGSC0003DMT400046976	St46976
	PGSC0003DMT400040075	St40075
<i>Sorghum bicolor</i>	Sobic.003G111000.1	Sb3G111000
	Sobic.001G362500.1	Sb1G362500
	Sobic.001G362600.1	Sb1G362600
	Sobic.003G110800.1	Sb3G110800
	Sobic.009G243800.1	Sb9G243800
	Sobic.009G235600.1	Sb9G235600
	Sobic.009G235700.1	Sb9G235700
<i>Spirodela polyrhiza</i>	Spipo18G0038300	Spo18G0038300

Espèce	Nom sur la base de données	Nom dans cette étude
	Spipo6G0008000	Spo6G0008000
	Spipo6G0008400	Spo6G0008400
<i>Thellungiella halophila</i>	Thhalv10004135m	Th04135
	Thhalv10007539m	Th07539
	Thhalv10020670m	Th20670
	Thhalv10022677m	Th22677
	Thhalv10023420m	Th23420
	Thhalv10007451m	Th07451
	Thhalv10013389m	Th13389
	Thhalv10020647m	Th20647
	Thhalv10007580m	Th07580
	Thhalv10020688m	Th20688
	Thhalv10020653m	Th20653
	Thhalv10020657m	Th20657
	Thhalv10018460m	Th18460
	Thhalv10007486m	Th07486
	Thhalv10028677m	Th28677
	Thhalv10029321m	Th29321
<i>Theobroma cacao</i>	Thecc1EG046816t1	Tc46816
	Thecc1EG046814t1	Tc46814
	Thecc1EG004484t1	Tc04484
	Thecc1EG004497t1	Tc04497
	Thecc1EG046780t1	Tc46780
	Thecc1EG026514t1	Tc26514
	Thecc1EG046811t1	Tc46811
	Thecc1EG026515t1	Tc26515
	Thecc1EG034049t1	Tc34049
	Thecc1EG000373t1	Tc00373
<i>Vitis vinifera</i>	GSVIVG01022032001	Vv22032
	GSVIVG01022035001	Vv22035
	GSVIVG01022030001	Vv22030
	GSVIVG01022031001	Vv22031
	GSVIVG01022033001	Vv22033
	GSVIVG01022034001	Vv22034
	GSVIVG01017836001	Vv17836
	GSVIVG01022026001	Vv22026
	GSVIVG01022024001	Vv22024

Espèce	Nom sur la base de données	Nom dans cette étude
	GSVIVG01011047001	Vv11047
	GSVIVG01017844001	Vv17844
	GSVIVG01017845001	Vv17845
	GSVIVG01018949001	Vv18949
	GSVIVG01022023001	Vv22023
	GSVIVG01009719001	Vv09719
	GSVIVG01022022001	Vv22022
	GSVIVG01022025001	Vv22025
	GSVIVG01022029001	Vv22029
<i>Zea mays</i>	GRMZM2G077546.01	Zm077546
	GRMZM2G097768.01	Zm097768
	GRMZM2G098679.01	Zm098679
	GRMZM2G109201.01	Zm109201
	GRMZM2G109221.01	Zm109221
	GRMZM2G134192.01	Zm134192
	GRMZM2G160430.01	Zm160430
	GRMZM2G160460.01	Zm160460
	GRMZM2G160504.01	Zm160504

EXPRESSION DES AtERD6 D'ARABIDOPSIS SUITE A DES PERTURBATIONS

seuil expression (Log2) = 1,3

répression induction

Structure du gène	Groupe I		Groupe IIa			Groupe IIb										
	B1		IIa1		IIa2	IIb1		IIb2		B7	B8	B9		B10	B11	
	AT1G19450	ERDL6 At1g75220	ZIF2 At2g48020	At3g05150	At5g18840	At1g54730	At4g04750	At4g04760	At3g20460	At1g08890 ESL3 ESL2 At1g08900	ESL1 At1g08920	ERD6 At1g08930	At3g05400	At3g05160 At3g05165	SFP1 At5g27350	SFP2 At5g27360
3 : 17 exons	2 : 17 exons	x : 16 exons	2 : 17 exons	9 : 16 exons	1 : 18 exons	1 : 18 exons	1 : 18 exons	2 : 17 exons	1 : 18 exons	6 : 17 exons	5 : 17 exons	4 : 17 exons	1 : 18 exons	1 : 18 exons	1 : 18 exons	
SEED GERMINATION																
seed desiccation / freshly harvested seed samples	0,054	0,098	-0,157	-0,144	0,216	-0,09	0,01	-0,15	-0,05	0,06	-0,056	-0,18	-0,196	-0,294	0,168	0,132
imbibition 15 min at 4°C (Col-0) / imbibition 15 min at 22°C (Col-0)	-0,456	-0,173	0,276	0,339	0,06	-0,345	0,091	-0,218	-0,114	0,158	-0,055	0,261	-0,114	-0,1	-0,136	-0,145
stratification (1h) / seed desiccation	0,179	0,096	0,332	0,025	-0,079	-0,084	-0,014	-0,004	0,136	-0,322	-0,274	0,033	0,726	0,12	-0,266	
stratification (12h) / seed desiccation	0,755	-0,106	-0,093	-0,021	-0,137	0,199	-0,099	0,018	-0,035	-0,352	-0,342	1,012	-0,141	0,561	-0,256	-0,389
stratification (48h) / seed desiccation	3,506	-2,018	-0,124	-0,13	0,015	2,972	-0,226	0,095	-0,16	0,395	-0,436	3,706	0,292	0,863	-0,136	-0,411
germination (1h) / stratification (48h)	0,209	0,076	0,114	-0,021	-0,053	0,204	0,009	-0,007	-0,115	-0,025	-0,032	0,193	-0,13	-0,06	-0,048	-0,101
germination (6h) / stratification (48h)	0,015	-0,024	0,787	0,801	-0,124	-1,077	-0,007	0,049	0,012	-0,255	0,369	0,259	-0,133	0,717	-0,256	0,123
germination (12h) / stratification (48h)	-0,376	-0,427	0,821	1,717	-0,22	-2,132	-0,141	-0,446	-0,044	-0,192	1,267	0,227	1,39	0,749	0,12	0,374
germination (24h) / stratification (48h)	0,781	-1,12	0,351	3,285	-0,119	-2,529	-0,201	-0,608	-0,261	-0,352	0,543	0,913	1,688	0,095	-0,048	0,132
germination (48h) / stratification (48h)	0,565	-0,611	0,71	1,463	-0,358	-2,355	1,602	-0,283	1,377	-0,272	2,536	0,11	3,197	0,419	0,168	1,21
germination (1h) / seed desiccation	3,716	-1,942	-0,01	-0,151	-0,038	3,176	-0,217	0,088	-0,275	0,371	-0,468	3,899	0,161	0,802	0,168	-0,513
germination (6h) / seed desiccation	3,521	-2,042	0,663	0,67	-0,109	1,895	-0,232	0,145	-0,148	0,14	-0,067	3,965	0,158	1,579	-0,048	-0,289
germination (12h) / seed desiccation	3,13	-2,445	0,697	1,587	-0,205	0,84	-0,367	-0,35	-0,204	0,204	0,832	3,932	1,681	1,611	0,12	-0,038
germination (24h) / seed desiccation	4,287	-3,139	0,227	3,155	-0,104	0,443	-0,427	-0,512	-0,421	0,044	0,108	4,619	1,98	0,958	-0,256	-0,279
germination (48h) / seed desiccation	4,071	-2,63	0,586	1,333	-0,343	0,617	1,377	-0,188	1,217	0,123	2,101	3,816	3,488	1,282	-0,136	0,799
POLLEN GERMINATION																
pollen germination (in vitro 0.5h à 24°C) / dry mature pollen samples	-0,007	-0,356	-0,143	-0,032	0,051	0,094	-0,061	0,084	0,014	-0,083	-0,05	-0,144	-0,046	-0,095	0,081	0,168
pollen tube growth (in vitro 4h à 24°C) / dry mature pollen samples	-0,03	-0,484	-0,244	-0,084	0,012	0,054	0,11	0,081	-0,05	-0,028	-0,134	-0,155	0,156	-0,482	0,203	0,12
pollen tube growth (in vitro 4h à 24°C) / pollen germination (in vitro 0.5h à 24°C)	-0,023	-0,127	-0,101	-0,052	-0,039	-0,04	0,171	-0,003	-0,064	0,055	-0,084	-0,011	0,202	-0,387	0,122	-0,048
pollen tube growth (semi in vivo 8h) / dry mature pollen samples	0,415	-1,367	-0,344	-0,791	-0,191	-0,138	-0,149	-0,246	-0,04	-0,178	-0,41	-0,309	0,186	-1,911	1,537	-0,136
pollen tube growth (semi in vivo 8h) / pollen tube growth (in vitro 4h à 24°C)	0,445	-0,883	-0,1	-0,706	-0,203	-0,193	-0,259	-0,327	0,01	-0,15	-0,276	-0,154	0,031	-1,429	1,334	-0,256
FROID																
4°C cold (early) / untreated green tissue samples (early)	0,243	-0,271	-0,036	0,041	0,1	-0,489	0,144	-0,03	0,127	-0,34	-0,227	-0,563	-0,101	-0,289	-0,135	0,032
4°C cold (late) / untreated green tissue samples (late)	1,506	-0,505	0,288	0,156	0,066	-0,859	-1,28	-0,071	-0,183	1,24	1,635	1,378	-0,29	-1,146	-0,754	-0,152
4°C cold study 2 (early) / untreated root samples (early)	-0,042	-0,272	-0,07	-0,062	-0,417	0,129	0,166	-0,12	-0,005	-0,137	-0,425	-0,418	-0,128	-0,074	-0,129	0,039
4°C cold study 2 (late) / untreated root samples (late)	1,505	-0,017	-0,32	-0,38	-0,963	-0,657	-0,589	-0,011	0,039	2,047	1,174	1,056	-0,138	-0,687	-0,491	0,017
cold study 4 (8°C) / 20°C treated rosette samples (6h)	1,353	-0,266	0,785	-0,036	0,093	-0,155	-0,48	-0,008	-0,085	1,293	1,317	0,963	0,196	-0,242	-0,45	-0,201
cold study 4 (10°C) / 20°C treated rosette samples (6h)	1,302	-0,203	0,613	-0,103	0,084	-0,231	-0,491	-0,201	-0,044	1,354	1,392	0,781	0,105	-0,403	-0,566	-0,231
cold study 4 (12°C) / 20°C treated rosette samples (6h)	0,922	-0,504	0,469	-0,178	-0,002	-0,23	-0,034	0,043	-0,135	0,551	0,563	0,586	0,13	-0,308	-0,68	-0,303
cold study 4 (14°C) / 20°C treated rosette samples (6h)	0,623	-0,17	0,288	-0,047	0,113	0,001	0,116	0,087	-0,109	0,357	0,425	0,184	-0,142	-0,268	-0,333	-0,244
cold study 4 (17°C) / 20°C treated rosette samples (6h)	0,228	-0,144	0,056	-0,088	-0,053	0,015	-0,02	-0,054	-0,057	0,142	0,203	0,025	0,005	-0,178	-0,184	-0,161
cold study 5 (8°C) / 20°C treated rosette samples (78h)	1,856	-0,968	1,223	-0,05	0,262	-0,047	0,161	0,169	0,006	-0,042	0,324	-0,751	0,435	-0,637	-0,33	0,081
cold study 5 (10°C) / 20°C treated rosette samples (78h)	1,528	-0,841	1,072	-0,07	0,308	-0,06	0,341	0,247	-0,067	-0,388	0,083	-0,782	0,266	-0,607	-0,225	-0,077
cold study 5 (12°C) / 20°C treated rosette samples (78h)	0,839	-0,584	0,704	-0,162	0,228	-0,124	0,314	0,054	-0,124	0,008	-0,089	-0,337	0,295	-0,266	-0,071	-0,17
cold study 5 (14°C) / 20°C treated rosette samples (78h)	0,28	-0,382	0,481	-0,121	0,15	-0,3	0,266	-0,017	-0,059	-0,043	-0,017	-0,055	0,175	-0,092	0,123	-0,175
cold study 5 (17°C) / 20°C treated rosette samples (78h)	0,09	-0,295	0,355	-0,122	0,192	-0,113	0,168	-0,04	-0,115	-0,006	-0,085	-0,107	0,032	-0,119	0,075	-0,048
4°C-4h-cold study 6 (Col-0) / 20°C/18°C treated rosette samples (Col-0)	0,024	-2,089	0,758	0,221	0,514	-0,199	-0,175	0,287	-0,04	-0,53	-0,423	0,221	0,154	-1,299	-1,52	-1,325
4°C-24h-cold study 20 (Col-0) / untreated Col-0 rosette samples	1,087	-1,677	-1,111	-0,006	0,044	-0,593	-0,863	-0,064	0,128	0,365	0,954	-0,742	-0,221	-1,093	-1,27	-1,333
4°C-3weeks-cold study 19 (Col-0) / untreated Col-0 rosette samples	0,08	-1,089	0,522	0,15	0,392	-0,138	-1,219	-0,145	0,103	-0,059	0,035	1,621	-0,712	-0,757	-1,098	-1,318
4°C-24h-cold study 7 (Col-0) / untreated all aerial tissue samples (Col-0)	0,94	-2,48	-0,977	-0,027	-0,349	-1,472	0,416	0,205	0,041	0,961	1,425	-1,687	0,227	-1,043	-2,393	-1,435
4°C-10d-cold study 8 (Col-0) / untreated all aerial tissue samples (Col-0)	0,374	-2,857	-0,436	-0,078	-0,47	0,051	0,343	0,179	0,073	-0,56	-0,543	-1,98	-0,155	-0,718	-1,709	-0,465
4°C cold study 3 (1h) / untreated seedlings	0,128	0,131	-0,065	-0,059	-0,089	-0,351	-0,197	0,036	-0,124	-0,22	0,169	0,212	0,199	-0,053	0,03	0,176
4°C cold study 3 (24h) / untreated seedlings	0,975	-2,07	-0,583	-0,438	-0,365	-0,929	-0,156	-0,06	-0,113	1,041	1,238	-0,526	0,079	-1,637	-2,446	-1,295
4°C cold study 3 (7d) / untreated seedlings	0,033	-1,894	0,177	-0,4	-0,16	-0,227	-0,084	-0,109	0,128	0,004	0,063	-0,285	0,197	-1,197	-1,433	-1,278
4°C cold study 9 (1h) / untreated seedling samples (plate)	0,201	0,106	-0,068	-0,106	0,062	-0,339	-0,137	0,149	-0,133	-0,146	0,209	0,224	0,203	-0,046	0,086	0,099
4°C cold study 9 (7d) / untreated seedling samples (plate)	0,055	-1,938	0,188	-0,494	-0,059	-0,233	-0,025	-0,158	-0,012	0,115	0,083	-0,312	0,073	-1,167	-1,599	-1,394
4°C cold study 10 (1h) / untreated seedling samples (soil)	0,159	-0,032	-0,158	-0,04	-0,16	-0,196	0,143	0,282	0,155	0,078	0,375	0,597	-0,114	-0,042	0,065	-0,318
4°C cold study 10 (24h) / untreated seedling samples (soil)	0,963	-1,377	-0,35	-0,064	0,02	-0,612	-0,985	0,174	0,039	1,397	2,157	-0,476	-0,12	-0,749	-0,783	-1,26
4°C cold study 10 (7d) / untreated seedling samples (soil)	0,134	-1,61	0,583	0,105	-0,12	0,463	-0,331	0,29	-0,03	0,604	0,943	-0,482	-0,102	-0,422	-0,925	-1,51

20°C+4°C(14d) puis -3°C shift cold to freezing (Col-0) / cold study 23 (Col-0)	0,275	0,397	-0,636	0,239	-0,123	0,141	-0,283	0,263	0,176	0,184	0,806	0,18	0,278	-0,063	0,416	0,042
20°C+4°C(14d) puis -3°C shift cold to freezing study 2 (Col-0) / cold study 23 (Col-0)	0,923	1,005	-0,457	0,084	0,02	-0,161	-0,855	-0,032	0,052	-0,166	1,022	0,38	0,04	-0,588	-0,151	0,19
20°C+4°C(14d) puis -3°C shift cold to freezing study 3 (Col-0) / cold study 23 (Col-0)	1,353	0,599	-0,647	0,239	0,344	-0,664	-1,349	-0,157	0,02	-0,325	0,833	0,581	0,119	-0,598	0,788	-0,254

HYPOXIA-ANOXIA

10 µg/ml O ₂ : anoxia study 2 / dark grown Col-0 seedling samples	-0,662	-0,464	-0,145	-0,274	-0,099	0,35	0,612	0,098	-0,26	0,306	1,023	0,767	0,044	0,373	-0,294	0,296
0,1% O ₂ , N : hypoxia study 6 (Col-0) / untreated plant samples (Col-0)	-2,684	0,634	-1,602	1,175	0,422	-1,212	-1,613	0,127	0,066	0,038	1,337	3,908	-1,722	-0,12	-0,477	-2,546
1% O ₂ : hypoxia study 7 (Col-0) / Col-0 seedlings grown under aerobic conditions	-0,256	-0,13	-0,24	-0,097	-0,117	0,072	-0,102	0,132	-0,516	-0,047	-0,506	1,401	0,127	-0,297	-0,156	-0,181
3% O ₂ 97% N : hypoxia study 9 (Col-0) / untreated root samples (Col-0)	0,207	0,138	0,113	0,025	-0,033	0,865	-0,244	0,116	-1,011	-0,847	-0,668	1,969	-0,387	-0,661	-0,387	-0,103
hypoxia study 8 / untreated Col-0 root samples	-1,543	0,171	-0,378	-1,17	-1,477	-0,782	-0,346	-0,21	-2,94	-0,712	0,957	1,714	-0,223	-0,452	0,663	0,033
10% O ₂ : hypoxia study 10 (Col-0) / mock treated Col-0 silique and seed samples	-0,643	0,146	0,041	-0,099	0,384	0,358	-0,297	0,071	-0,338	-0,26	0,159	1,708	-0,43	0,051	0,516	0,409
ARGON : hypoxia study 11 (Col-0) / mock treated seedling samples (Col-0)	-0,22	-0,054	-0,018	-0,076	-0,393	-0,222	-0,118	-0,029	-0,06	0,026	0,654	0,162	-0,133	0,024	-0,152	-0,055
ARGON : hypoxia study 12 (Col-0) / mock treated Col-0 root samples	-0,881	-0,232	-0,432	0,084	-0,245	-0,471	-0,241	0,115	-0,858	-0,328	-0,972	0,261	-0,708	-0,7	-0,276	0,199
ARGON : hypoxia study 13 (Col-0) / mock treated Col-0 shoot samples	-0,382	-0,401	-0,164	-0,401	-0,085	-0,022	-0,249	-0,252	-0,307	-0,038	-0,228	0,427	-0,292	-0,324	-0,16	0,104
ARGON : hypoxia study 14 (Col-0) / mock treated rosette samples (Col-0)	-1,009	-0,558	-0,751	-0,222	-0,224	-0,251	-0,373	-0,039	0,081	0,116	-0,623	-0,582	-0,078	-0,157	0,437	-0,362

NUTRIENT

glucose (2h) / untreated seedlings	1,388	-2,041	-0,878	-0,813	-0,4	-1,31	0,337	0,229	-0,158	-0,581	-0,216	-0,042	0,855	0,354	-0,724	-0,07
glucose (4h) / untreated seedlings	0,712	-2,979	-1,17	-0,717	0,255	-1,399	0,484	0,161	-0,092	-0,5	0,525	-0,608	1,127	-0,066	-0,433	-0,194
glucose + estradiol (Col-0) / estradiol study 8 (Col-0)	2,174	-1,77	-1,164	-0,532	-0,063	-0,863	0,183	0,003	-0,02	-0,181	-1,338	-0,587	-0,022	-0,401	-0,818	-0,146
mannitol (2h) / untreated seedlings	-0,846	-0,238	-0,167	-0,53	-0,288	-0,526	-0,066	0,128	0,045	0,305	0,673	0,564	-0,36	-0,226	0,38	-0,093
mannitol (4h) / untreated seedlings	-0,901	-0,098	0,107	-0,505	-0,126	-0,288	-0,146	-0,028	0,066	0,572	1,189	0,523	-0,131	0,048	0,388	0,141
mannitol study 2 (Col-0) / mock treated Col-0 guard cell samples	-0,517	0,05	0,443	0,129	0,17	-0,119	0,059	0,102	0,182	-0,021	1,534	0,222	0,479	0,228	-0,044	0,101
sucrose / untreated seedlings	-0,251	-0,663	0,065	-0,716	0,414	-0,019	-0,05	-0,197	-0,163	-0,085	-0,477	0,012	-0,254	-0,129	0,109	0,022
sucrose study 5 (Col-0) / mock treated Col-0 guard cell samples	-0,074	-0,193	-1,236	-0,121	0,159	-0,864	2,262	1,17	0,126	-0,189	0,1	-0,599	1,094	0,164	-0,813	-0,295
sucrose study 6 (dark) / dark study 13	0,003	-0,743	0,211	-0,978	-0,43	-0,43	-0,356	-0,24	0,068	0,256	-0,374	-0,46	-0,465	-0,496	-0,378	
sulfate deprivation / root samples (1500µM sulfate)	-0,018	-0,16	0,083	0,001	-0,152	-0,066	0,221	0,048	-0,124	-0,085	0,429	0,042	0,25	0,436	0,232	-0,013
sulfur deficiency / Seeds of Col-0 grown with sufficient sulfur	-0,024	-0,209	-0,34	0,255	0,251	0,053	0,17	0,294	-0,306	0,213	0,348	-0,144	1,306	0,808	0,492	0,62
sulfur deficiency study 2 (3h) / mock treated root samples	0,474	-1,151	-0,073	-0,547	-0,684	0,128	0,024	0,203	-0,431	-0,494	0,309	0,083	1,389	0,118	-0,629	-0,065
sulfur deficiency study 2 (12h) / mock treated root samples	0,379	-0,595	-0,216	-0,381	-0,075	0,331	0,356	0,338	-0,672	-0,3	0,329	-0,152	1,639	0,329	-0,015	0,043
sulfur deficiency study 2 (24h) / mock treated root samples	0,361	-0,519	0,019	-0,382	-0,262	0,565	0,16	0,248	-0,846	-0,337	0,728	0,017	2,151	0,756	0,466	0,073
sulfur deficiency study 2 (48h) / mock treated root samples	0,289	-0,293	0,044	-0,421	0,213	0,438	0,183	0,095	-0,803	-0,283	1,009	-0,054	3,403	0,915	0,567	0,03
sulfur deficiency study 2 (72h) / mock treated root samples	0,341	-0,409	0,091	0,073	0,262	0,63	0,188	0,231	-0,668	-0,201	1,062	0,114	4,546	1,055	0,901	0,072
sulfur deficiency study 3 (LZ2) / sulfur deficiency study 3 (LZ1)	1,156	0,693	1,747	2,399	0,673	0,489	0,186	0,696	0,282	0,44	0,626	0,906	0,059	0,341	0,039	0,595
sulfur deficiency study 3 (LZ3) / sulfur deficiency study 3 (LZ2)	0,959	0,8	0,289	0,875	0,583	0,448	0,322	-0,378	0,057	-0,164	-0,101	0,659	0,171	0,773	0,394	-0,391
sulfur deficiency study 3 (LZ4) / sulfur deficiency study 3 (LZ3)	-1,541	-0,335	-1,733	-1,202	-1,241	-1,087	-0,307	-0,411	-0,045	-0,229	-0,202	-0,113	-0,128	0,072	-0,108	-0,086

OSMOTIC

osmotic (early) / untreated green tissue samples (early)	-0,399	-0,287	-0,245	0,047	0,079	-0,16	-0,23	0,065	0,016	0,148	0,355	0,194	-0,032	-0,23	-0,036	-0,688
osmotic (late) / untreated green tissue samples (late)	-1,523	-0,592	0,313	-0,16	0,299	-0,462	-0,484	0,014	-0,24	0,602	2,101	-0,598	0,997	0,988	0,28	-1,276
osmotic / recovery (root) / mock treated Col-0 root samples	0,265	0,114	-0,216	-0,449	0,544	0,013	0,72	0,265	-0,371	0,154	0,461	-0,379	0,137	0,222	0,462	0,33
osmotic / recovery (shoot) / mock treated Col-0 shoot samples	0,085	0,11	-0,247	-0,119	-0,057	0,341	-0,174	0,187	0,169	0,277	0,163	0,848	-0,035	0,422	0,244	0,114
osmotic study 2 (early) / untreated root samples (early)	0,069	-0,034	0,01	-0,68	-0,877	-0,185	-0,115	0,017	0,039	0,677	0,583	0,001	0,242	-0,191	-0,053	-0,012
osmotic study 2 (late) / untreated root samples (late)	-0,19	0,444	0,054	-1,508	0,559	-0,575	-0,337	0,015	-0,214	0,836	1,605	0,213	1,672	0,202	1,277	0,33
osmotic study 4 (root) / mock treated Col-0 root samples	-0,438	0,342	-0,48	-1,574	-0,625	-0,979	0,492	0,003	-0,441	0,36	2,271	0,277	0,144	0,296	0,497	0,352
osmotic study 4 (shoot) / mock treated Col-0 shoot samples	-1,408	0,675	-0,826	-0,047	0,011	-0,288	-0,214	0,127	0,26	0,29	1,097	0,21	0,058	0,86	0,47	-0,391

SALT

salt study 2 (early) / untreated root samples (early)	-0,421	0,175	0,08	0,08	-0,705	-0,347	-0,156	0,041	0,112	0,653	1,311	0,612	0,229	-0,185	-0,045	-0,112
salt study 2 (late) / untreated root samples (late)	-0,237	0,608	0,284	0,284	-0,479	-0,893	-0,251	-0,036	0,014	1,215	2,543	0,632	1,324	-0,28	0,867	-0,001
salt study 3 (Col-0) / H ₂ O treated rosette leaf samples (Col-0)	-0,574	-0,818	-1,35	-1,35	0,55	-0,575	-0,49	0,266	-0,04	0,869	2,243	-1,95	1,063	0,922	0,851	-0,666
salt study 4 (Col-0) / Hoagland solution watered Col-0 leaf samples	-0,457	0,514	-0,536	-0,536	-0,325	-0,416	-1,042	-0,177	-0,285	-0,016	1,138	2,792	0,022	-0,023	-0,08	-0,185
salt study 5 (Col-0) / mock treated primary root tip samples (Col-0)	-1,228	0,043	-0,515	-0,515	-0,423	-0,091	-0,311	0,017	-0,373	0,046	1,778	0,148	-0,004	-0,089	0,242	0,102

SH Feuille Rosette

drought (wt) / untreated leaf samples (Col)	-1,23	-0,929	-0,238	-0,081	-0,008	0,292	-1,209	-0,101	0,032	0,288	0,619	-0,48	0,358	1,107	0,883	-0,046
drought study 2 (Col-0) / untreated leaf samples (Col-0)	-0,731	-0,685	-0,315	0,013	-0,126	-0,527	1,345	0,628	-0,096	0,253	2,523	-2,212	3,864	0,981	1,46	-0,175
drought study 5 (Col-0) / untreated all aerial tissue samples (Col-0)	-0,114	-0,532	-0,179	-0,006	-0,364	-0,595	0,493	0,114	0,028	0,321	0,496	-0,137	-0,09	0,037	0,12	-0,314
drought study 5 (late day) / untreated Col-0 rosette samples (late day)	-0,683	-0,751	-0,207	0,109	0,015	0,176	1,164	-0,041	-0,001	0,045	-0,018	-0,176	-0,012	0,384	-0,039	-0,342
drought study 5 (midday) / untreated Col-0 rosette samples (midday)	-0,712	-0,688	-0,543	-0,11	0,077	-0,442	0,42	0,068	0,043	0,132	0,23	-0,192	0,015	0,186	-0,517	-0,54
drought study 5 (midnight) / untreated Col-0 rosette samples (midnight)	-0,136	0,005	-0,004	-0,213	0,029	-0,282	0,36	0,028	0,031	0,089	0,21	0,035	0,009	0,459	-0,093	-0,105
drought study 5 (pre-dawn) / untreated Col-0 rosette samples (pre-dawn)	-0,478	-0,313	-0,314	0,089	-0,026	-0,161	0,553	-0,11	0,012	0,063	0,531	-0,198	0,263	0,324	-0,307	-0,265

drought study 14 (Col-0) / untreated Col-0 rosette leaf samples	-1,692	-0,233	-1,12	0,222	0,11	0,638	0,098	-0,188	-0,262	0,521	0,275	-0,245	0,273	1,001	-0,317	-0,373
drought study 18 (Col-0) / untreated rosette leaf samples (Col-0)	-0,411	0,28	-0,958	-0,109	-0,023	0,005	-0,351	-0,04	0,037	0,45	1,33	-0,86	0,749	1,405	1,101	-0,615
light/drought (Col-0) / untreated leaf samples (Col-0)	-0,909	-0,265	-0,658	0,201	-0,041	-0,372	1,264	0,672	-0,073	-0,068	0,678	-0,635	0,667	0,623	0,047	-0,025
SH Fleurs Racines																
drought study 4 (early) / untreated root samples (early)	0,052	0,332	0,189	0,078	-0,4	0,226	-0,297	0,048	0,045	-0,037	1,178	0,104	-0,105	-0,2	-0,167	-0,203
drought study 4 (late) / untreated root samples (late)	-0,022	0,07	0,204	-0,16	-0,17	0,14	-0,117	-0,05	-0,113	0,202	0,361	-0,165	0,209	-0,148	-0,188	-0,152
drought study 15 (Col-0) / untreated Col-0 root samples	3,714	0,107	-1,78	0,036	-1,772	-1,094	0,121	0,357	-0,492	0,126	0,701	0,612	0,247	-0,109	-0,034	-0,093
drought study 17 (3d) / untreated Col-0 flower bud samples (3d)	0,102	-0,207	-0,025	-1	0,41	-0,093	0,601	0,162	-0,108	0,095	-0,305	-1,293	0,016	-0,755	-0,268	-0,304
drought study 17 (4d) / untreated Col-0 flower bud samples (4d)	-0,123	-0,211	-0,155	-0,228	-0,278	0,343	-0,636	-0,137	-0,353	0,758	0,414	1,545	0,639	0,565	0,299	-0,228
drought study 17 (5d) / untreated Col-0 flower bud samples (5d)	-0,631	0,109	-0,155	0,715	-0,059	0,384	-1,88	-1,474	-0,769	1,689	0,642	-1,381	0,069	0,656	-0,049	-1,048
drought study 17 (10d) / untreated Col-0 flower bud samples (10d)	-1,578	-0,04	-0,63	1,5	0,636	-0,138	-1,012	-0,918	-0,212	1,349	-0,051	-2,061	-0,585	0,647	-0,767	-1,882
SH Plante entière																
drought study 3 (early) / untreated green tissue samples (early)	0,029	0,013	0,069	-0,072	0,036	-0,142	0,167	-0,014	0,009	-0,041	1,092	-0,662	-0,088	-0,149	0,072	-0,065
drought study 3 (late) / untreated green tissue samples (late)	0,038	0,143	0,321	0,097	0,11	0,475	-0,163	-0,053	-0,147	0,048	0,482	0,08	0,144	0,275	0,329	0,257
drought study 5 (Col-0) / untreated all aerial tissue samples (Col-0)	-0,114	-0,532	-0,179	-0,006	-0,364	-0,595	0,493	0,114	0,028	0,321	0,496	-0,137	-0,09	0,037	0,12	-0,314
drought study 6 (Col-0) / untreated plant samples (Col-0)	-0,012	0,19	-0,374	-0,329	-0,277	-0,399	-0,421	0,215	-0,125	0,152	0,912	1,4	-0,206	-0,182	-0,419	-0,452
drought study 7 (Col-0) / untreated plant samples (Col-0)	-0,564	0,371	-0,951	-0,531	-0,686	-1,25	-0,615	0,345	-0,149	0,878	1,615	0,638	-0,485	-0,206	-0,32	-1,003
drought study 11 (Col-0) / mock treated seedling samples (Col-0)	-0,885	-0,687	-0,529	-1,174	1,412	-0,24	1,059	0,753	-0,267	0,128	0,424	-1,58	1,16	0,112	-0,104	-0,853
SUBMERSION																
submergence study 2 (7h) / rosette samples of Col-0 shifted to darkness (7h)	-0,554	0,48	0,306	-0,409	2,659	-0,137	-0,287	0,02	0,28	-0,884	-0,344	1,01	0,155	0,989	0,933	-0,234
submergence study 2 (24h) / rosette samples of Col-0 shifted to darkness (24h)	0,423	0,332	-0,022	0,205	4,275	-0,036	-0,068	0,114	-0,09	-0,692	-0,433	1,59	0,308	0,627	0,724	0,07
submergence (7h) / root samples of Col-0 shifted to darkness (7h)	0,022	-0,119	0,085	0,405	0,02	0,35	-0,064	-0,191	-0,24	-0,121	-0,767	0,075	-0,044	0,285	-0,286	-0,237
submergence (24h) / root samples of Col-0 shifted to darkness (24h)	0,125	-0,289	0,148	0,288	0,286	0,023	-0,088	-0,023	-0,121	-0,359	-1,144	0,055	-0,166	-0,348	-0,55	-0,087
HORMONES																
ABA (30min) / mock treated seedlings (30min)	-0,094	-0,069	-0,143	-0,055	-0,286	-0,156	-0,038	0,322	-0,252	0,093	0,143	-0,232	-0,123	0,037	0,051	0,078
ABA (1h) / mock treated seedlings (1h)	-0,167	-0,076	-0,192	-0,176	-0,284	-0,388	-0,16	0,239	-0,122	0,572	0,355	-0,764	0,127	-0,062	-0,011	-0,028
ABA (3h) / mock treated seedlings (3h)	-0,246	-0,351	-0,128	-0,688	-0,64	-0,674	-0,079	-0,143	-0,115	1,749	3,27	-2,536	1,186	-0,091	0,503	-0,333
ABA study 3 (Col-0) / untreated seed samples	-0,407	-0,576	-0,333	0,266	0,671	0,291	-0,475	0,089	-0,584	0,093	-0,516	-1,242	-0,635	-0,219	-1,748	-1,079
ABA study 4 (Col-0) / mock treated leaf samples (Col-0)	-0,454	0,281	0,143	0,212	0,145	-0,314	0,173	-0,008	-0,055	0,014	0,714	-0,631	-0,05	0,429	0,191	0,117
ABA study 5 (Col-0) / untreated plant samples (Col-0)	-0,176	-0,219	-0,373	-0,338	-0,392	-0,383	-0,365	-0,001	-0,013	0,443	0,653	1,296	-0,386	-0,542	-0,185	-0,617
ABA study 6 (Col-0) / untreated plant samples (Col-0)	-0,238	0,113	-0,264	-0,693	0,703	-0,373	-0,147	-0,124	-0,377	1,318	2,248	-1,271	1,17	0,314	1,253	-0,634
ABA study 7 (Col-0) / solvent treated guard cell samples (Col-0)	-0,136	-0,901	-1,098	0,089	0,045	-0,212	-0,199	0,025	0,046	1,175	2,109	-1,438	0,203	-2,392	-0,328	0,089
ABA study 8 (Col-0) / solvent treated leaf samples (Col-0)	-0,491	0,28	-0,575	0,294	-1,444	-0,811	0,203	0,288	0,142	0,528	2,534	-2,388	0,762	0,107	2,505	-0,041
ABA study 12 (Col-0) / solvent treated seedling samples (Col-0)	1,169	0,061	0,378	-0,687	0,47	-1,317	-0,101	-0,011	-0,205	1,43	3,295	-1,649	3,168	0,701	1,634	0,126
DFPM + ABA (Col-0) / solvent treated seedling samples (Col-0)	0,247	0,84	1,569	-0,655	-0,896	-1,626	-0,628	0,064	0,075	1,073	3,473	-0,519	2,945	0,379	2,007	-0,106
BL (30min) / mock treated seedlings (30min)	-0,117	0,03	-0,027	0,012	0,213	-0,313	0,093	0,234	-0,018	0,193	0,116	-0,042	0,073	0,212	-0,053	-0,144
BL (1h) / mock treated seedlings (1h)	0,085	0,435	-0,301	0,167	-0,071	-0,012	0,189	0,553	0,768	0,27	0,575	0,097	0,543	0,095	0,057	-0,222
BL (3h) / mock treated seedlings (3h)	0,109	0,198	-0,237	0,046	-0,188	-0,059	0,186	0,064	0,171	0,146	0,376	0,232	0,707	-0,183	0,243	0,205
BL/H3BO3 (2d) / untreated cell culture samples	1,641	0,326	-0,623	-4,463	-0,778	-1,827	-0,037	-0,293	0,658	-0,538	1,97	-2,213	1,908	1,198	2,947	-0,096
BL/H3BO3 (4d) / untreated cell culture samples	1,287	0,447	-0,006	-4,632	-0,382	-1,597	-0,082	-0,211	0,952	-0,759	2,142	-3,281	1,694	1,492	3,227	-0,173
BL/H3BO3 (6d) / untreated cell culture samples	1,731	0,644	0,746	-4,715	0,474	-1,078	0,041	-0,035	0,4	-0,225	2,775	-2,569	2,151	1,871	3,093	-0,168
BL/H3BO3 (8d) / untreated cell culture samples	1,295	0,627	1,283	-4,764	0,847	-1,797	-0,039	-0,122	0,051	-0,486	2,781	-2,135	1,656	1,521	3,153	-0,147
BL/H3BO3 (10d) / untreated cell culture samples	1,018	0,545	1,343	-4,666	0,813	-1,874	-0,164	-0,283	-0,285	-0,716	2,572	-1,9	1,388	1,459	3,352	-0,114
QUANTITE DE LUMIERE																
dark / 21°C (5-40min) / moderate light / 21°C (5-40min)	-0,071	0,183	0,012	-0,076	-0,1	-0,092	-0,205	0,055	-0,179	-0,008	0,29	0,75	-0,131	-0,1	0,064	0,163
dark / 21°C (60-120min) / moderate light / 21°C (60-120min)	-0,438	0,974	0,272	0,387	0,378	0,365	-1,353	0,194	-0,041	0,614	-0,071	2,265	-0,229	0,538	-0,086	0,155
dark / 21°C (140-200min) / moderate light / 21°C (140-200min)	-0,596	0,824	0,446	0,041	0,819	0,258	-1,249	-0,066	-0,103	0,332	-0,291	1,889	-0,207	0,26	-0,509	-0,525
dark / 21°C (220-280min) / moderate light / 21°C (220-280min)	-0,645	0,514	0,579	0,094	0,216	0,096	-1,414	-0,074	-0,012	-0,042	-0,455	1,563	-0,188	0,127	-0,646	-0,579
dark / 21°C (300-360min) / moderate light / 21°C (300-360min)	0,078	0,524	0,738	0,11	-0,021	0,219	-1,233	-0,2	-0,159	0,112	0,022	1,011	-0,062	0,007	0,002	0,021
dark / 21°C (640 and 1280min) / moderate light / 21°C (640 and 1280min)	-0,466	1,194	0,376	0,21	0,316	0,599	-1,801	-0,125	-0,146	1,072	0,443	0,981	-0,101	0,278	-0,143	-0,254

La famille de transporteurs de monosaccharides ERD6-like (Early Response to Dehydration six-like) : émergence, évolution chez les plantes terrestres et réponses au déficit hydrique dans les feuilles d'*Arabidopsis thaliana*

La caractérisation des réponses des plantes à la sécheresse est un enjeu actuel majeur. La gestion du carbone dans l'adaptation des végétaux aux contraintes environnementales requiert l'activité de transporteurs de monosaccharides ERD6-like (Early Response to Dehydration six-like), transporteurs impliqués dans la compartimentation subcellulaire des sucres et leur remobilisation à l'échelle de l'organisme. Le premier axe de la thèse a été dédié à l'analyse phylogénétique des *ERD6-like* par une approche de génomique évolutive. L'identification de 519 ERD6-like dans les protéomes de 47 Embryophytes a permis de reconstituer l'histoire évolutive de cette famille en mettant en exergue des événements majeurs de duplications. Le second axe a permis d'établir la cartographie de l'expression des *ERD6-like* dans les différents organes d'*Arabidopsis thaliana* et a mené à l'identification de gènes exprimés de façon constitutive dans tous les organes, et d'autres, manifestant une expression préférentielle. Le troisième axe a permis d'étudier la réponse des *ERD6-like* à la carence en eau, dans les feuilles d'*A. thaliana*. Pour cela, le phénotypage morphologique, biochimique et physiologique des rosettes de plantes cultivées en conditions normales d'alimentation hydrique ou de stress hydrique a été réalisé. Le profil d'expression des *AtERD6-like* au cours de la cinétique de carence en eau a mis en évidence l'induction de quatre *AtERD6-like* en réponse au déficit hydrique. L'analyse de simples mutants pour ces gènes, a permis d'initier l'étude de la diversification fonctionnelle des *ERD6-like* d'*A. thaliana*.

The monosaccharides ERD6-like (Early Response to Dehydration six-like) transporters family: emergence, evolution in terrestrial plants and responses to drought in *Arabidopsis thaliana* leaves

Nowadays, characterizing plants responses to drought is a major goal for plant scientists. The carbon management in response to environmental cues involves the activity of ERD6-like (Early Response to Dehydration six-like) monosaccharides transporters, playing roles in sugar subcellular partitioning and re-allocation at the scale of the whole organism. The first purpose of this PhD thesis focused on the analysis of the *ERD6-like* evolution into the plant Kingdom, using a phylogeny approach. Identification of 519 ERD6-like in the proteome of 47 plants species lead to rebuild the evolutionary story of this gene family, and to provide evidence for the major duplication events. The second purpose was the mapping of *ERD6-like* expression levels in different organs of *Arabidopsis thaliana* and lead to the identification of almost constitutively expressed copies and others displaying organ-preferential expression patterns. The third purpose was to study the responses of *ERD6-like* genes to water starvation in *A. thaliana* leaves. This highlighted the expression induction of 4 *AtERD6-like* during water deficit. Finally, the characterization of erd6-like insertional mutants initiated the study of the functional diversity of this large family of monosaccharide transporters in *Arabidopsis thaliana*.