



HAL
open science

Caractérisation d'osmosenseurs de peuplier et recherche de ligands dans le but d'une application en tant que biostimulants

Hanae Makhokh

► **To cite this version:**

Hanae Makhokh. Caractérisation d'osmosenseurs de peuplier et recherche de ligands dans le but d'une application en tant que biostimulants. Sciences agricoles. Université d'Orléans, 2023. Français. NNT : 2023ORLE1056 . tel-04654513

HAL Id: tel-04654513

<https://theses.hal.science/tel-04654513>

Submitted on 19 Jul 2024

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

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

UNIVERSITÉ D'ORLÉANS

ÉCOLE DOCTORALE SANTE, SCIENCES BIOLOGIQUES ET CHIMIE DU VIVANT

Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures

THÈSE présentée par :

Hanae MAKHOKH

soutenue le : **21 décembre 2023**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université d'Orléans**

Discipline/ Spécialité : **Biologie. Biochimie, biologie cellulaire et moléculaire**

**Caractérisation d'osmosenseurs de
peuplier et recherche de ligands dans le
but d'une application en tant que
biostimulants**

THÈSE dirigée par :

M. HERICOURT François
Mme. CARPIN Sabine

Maitre de conférences (HDR), Université d'Orléans
Maitre de conférences (HDR), Université d'Orléans

RAPPORTEURS :

Mme ROSNOBLET Claire
M. PAPON Nicolas

Maitre de conférences (HDR), Université de Bourgogne
Professeur des universités, Université d'Angers

JURY :

Mme BENEDETTI Hélène
M. WIPF Daniel
M. DRIOUICH Azeddine
M. BRAULT Mathias
Mme ROSNOBLET Claire
M. PAPON Nicolas
M. HERICOURT François
Mme. CARPIN Sabine

Directrice de recherche, CNRS Orléans, Président du jury
Professeur des universités, Université de Bourgogne
Professeur des universités, Université de Rouen
Maitre de conférences (HDR), Université Paris 7 Paris Saclay
Maitre de conférences (HDR), Université de Bourgogne
Professeur des universités, Université d'Angers
Maitre de conférences (HDR), Université d'Orléans
Maitre de conférences (HDR), Université d'Orléans

REMERCIEMENTS

En arrivant au terme de cette aventure académique, il m'est impératif de manifester ma gratitude envers celles et ceux qui ont participé de près ou de loin à la concrétisation de cette thèse.

Je tiens à remercier Mme Claire Rosnoblet, et à M. Nicolas Papon, d'avoir accepté la lourde tâche d'être rapporteurs de ce travail. Un sincère remerciement s'adresse également aux examinateurs : Mme Hélène Benedetti, M. Daniel Wipf, M. Azeddine Driouch, et M. Mathias Brault. Merci d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Je tiens à adresser mes remerciements à M. Steeve Thany pour m'avoir accueilli dans son laboratoire où j'ai eu l'opportunité de travailler au sein d'une équipe d'exception et de bénéficier des meilleures conditions pour mener à bien mes travaux.

Je voudrais exprimer ma gratitude infinie envers mon directeur de thèse, François Héricourt. Ces trois années n'ont pas été de tout repos, mais m'ont permis d'apprendre énormément à tes côtés. Ton soutien inébranlable, tes conseils avisés, ta confiance et ton expertise ont été essentiels tout au long de cette aventure. Je t'en suis profondément reconnaissante. À ma co-directrice de thèse, Sabine Carpin, je tiens à témoigner toute ma reconnaissance pour ton implication constante et ta précieuse collaboration. Tes retours, toujours pertinents, ont fortement influencé mon travail. À vous deux, merci d'avoir cru en moi, de m'avoir poussé à repousser mes limites, et d'avoir fait de cette thèse un voyage enrichissant et instructif.

Merci à l'ensemble de mon équipe « signalisation cellulaire » : Françoise Chefdor, Frédéric Lamblin, Christiane Depierreux, Sonia Malik, Mélanie Larcher et Margot Bruat pour les discussions éclairantes et pertinentes lors de nos réunions d'équipe. Chacun d'entre vous a joué un rôle essentiel en apportant son expertise, ce qui a enrichi la qualité de mon travail. Sonia, thank you for your kindness ! Mélanie, merci pour ton aide précieuse lors de mes expérimentations tout au long de ma thèse.

Je tiens également à exprimer ma profonde gratitude à Pierre Lafite. Sa maîtrise dans la purification des protéines a été essentielle pour surmonter, du moins en partie, les défis que j'ai rencontrés. Les connaissances qu'il a partagées et les cours que j'ai suivis avec lui ont été

enrichissants et formateurs. Je remercie également son équipe dévouée : Nastassja Burrini, Arnaud Pâris et Malika Mekhalfi, pour leurs contributions tout au long de ce parcours.

Je tiens également à remercier les différentes personnes qui, par leur collaboration, ont contribué à ce travail de thèse. Notamment, Emilie Destandau, sa collaboration a été essentielle, et les discussions pendant les réunions ont apporté une profondeur et une perspective inestimables à ma recherche. Merci à Océane Busont aussi pour la réalisation des expérimentations et ses allers-retours au laboratoire. Ma reconnaissance va également à Charlotte Allaire et son équipe pour leur collaboration et leur participation dans ce travail.

Je souhaite remercier Yassine Chafik, Khalid Boussaine, Sara Kaaki et Maria Taha avec lesquels j'ai partagé de formidables expériences et n'oublierai jamais leur soutien et leur amitié. Je remercie également David Chassagnaud, Elodie le souchu et Alexandre Duplan, qui ont été des compagnons de thèse agréables et précieux.

Je tiens également à remercier mes stagiaires, Alicia Jewel et Ivan Gherib, ainsi que Clara Salvador. Votre engagement, votre curiosité et votre travail assidu ont apporté une contribution importante à ce projet. Merci de m'avoir accompagné dans cette aventure scientifique.

Un grand merci à Richard Bouceffa. Ses simples gestes, tels que ses bonjours et ses saluts, accompagnés de mots bienveillants et de sourires, ont souvent égayé mes journées. Je remercie également Domenico Morabito pour sa présence et son attitude qui ont grandement contribué à créer une ambiance agréable et conviviale au sein du laboratoire. Mes remerciements vont également à Régis Fichot pour son assistance indispensable lors de l'exploration du terrain, afin de sélectionner les plantes pour nos expérimentations.

Je tiens à remercier également tous les autres membres du laboratoire : Marta Sena-Velez, Alexandra Cremades, Sylvain Bourgerie, Alison Cartereau, Aurélien Salle, Stéphane Maury, Stéphanie Bankhead, Emiliane Taillebois, Isabelle Le Jan, et Daniel Auguin...

Enfin, mes pensées se tournent vers ma famille, pilier fondamental de ma vie. Je remercie infiniment mon père, Abdellah, et ma mère, Fatiha, pour leur amour inconditionnel, leur soutien sans faille et les valeurs qu'ils m'ont transmises. Ma grande sœur, Lamyae, toujours là

pour me conseiller et m'encourager. Mon frère, Alae, pour sa bienveillance et son soutien constant. Et ma petite sœur, Chaymae, dont la joie de vivre et l'enthousiasme m'ont toujours inspirée. Et une pensée toute particulière pour Amine, mon fiancé. Merci pour ta présence constante, tes encouragements sans faille et ton amour incommensurable. Tu as été mon refuge durant les moments difficiles et ma joie dans les moments heureux. À vous tous, merci d'avoir été ma force et ma motivation tout au long de cette aventure.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
A. Contexte	2
1. Situation climatique actuelle	2
2. Recherche de biostimulants pour lutter contre les effets de la sécheresse.....	4
3. Peuplier : plante ligneuse modèle	5
B. Sécheresse et conséquences sur les plantes	9
1. Exploration des concepts : sécheresse, déficit hydrique, stress osmotique	9
2. Impact du déficit hydrique sur les plantes.....	11
C. Stratégies mises en œuvre par les plantes en réponse au déficit hydrique	13
1. Notions d'adaptation, d'acclimatation et de réaction.....	13
2. Stratégies de résistance : échappement, évitement et tolérance.....	14
3. Réponses moléculaires au déficit hydrique	16
D. Rôle des biostimulants dans la tolérance des plantes à la sécheresse.....	21
1. Définitions.....	21
2. Principales catégories des biostimulants et leurs effets sur les plantes.....	21
3. Interconnexions entre l'ABA, les CK et les biostimulants	26
E. Mécanismes de perception et de transduction du stress osmotique	28
1. Implication du système à deux composantes (TCS).....	28
2. Implication du système phosphorelais multiple (MSP) chez les eucaryotes	34
F. Objectifs de la thèse	43

MATERIELS ET METHODES	45
A. Matériels.....	46
1. Matériels biologiques	46
2. Matériels végétaux	46
3. Milieux de culture.....	50
B. Méthodes	52
1. Conditions de culture	52
2. Méthodes de transformation du matériel biologique	52
3. Réactions de polymérisation en chaîne (PCR)	53
4. Purification et analyse des acides nucléiques.....	59
5. Clonage dans les vecteurs plasmidiques	61
6. Expérience de complémentation fonctionnelle chez la levure	64
7. Production et purification des protéines recombinantes.....	65
8. Site expérimental et conditions de récolte des feuilles de peuplier	67
9. Production des phytoextraits de peuplier	69
10. Chromatographie liquide à ultra haute performance couplée à la spectrométrie de masse (UHPLC-MS)	69
11. Protocole de criblage.....	70
12. Spectrométrie de masse à haute résolution (HRMS)	71
RESULTATS	72
Partie I	73
CHAPITRE I	74

A.	Présentation de l'article	75
B.	Principaux résultats	76
C.	Conclusion et perspectives	77
CHAPITRE II		93
A.	Contexte de l'étude et objectifs	94
B.	Résultats	98
1.	Production bactérienne des domaines HK1a ECD et HK1b ECD dans <i>E. coli</i>	98
2.	Essais de solubilisation des ECD de HK1a et HK1b	101
3.	Dénaturation et renaturation à partir des corps d'inclusion	106
C.	Discussion et perspectives	114
Partie II		117
CHAPITRE III		118
A.	Contexte et objectifs de l'étude	119
B.	Résultats	121
1.	Construction du système rapporteur	121
2.	Évaluation de la fonctionnalité du système rapporteur	126
3.	Validation de la fonctionnalité du système rapporteur en tant que système d'identification de biostimulant potentiel	133
C.	Discussion et perspectives	138
CHAPITRE IV		142
A.	Contexte et objectifs de l'étude	143
B.	Résultats	144

1. Approche ciblée : test de molécules candidates (acides aminés)	144
2. Approche aléatoire	147
C. Discussion et perspectives	169
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	175
ANNEXES.....	182
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	187

LISTE DES ABBREVIATIONS

AA	Acide Aminé	DS	Domaine Senseur
ABA	Acide AB scissique	DTT	Di Thio Thré itol
ABAR	ABA Receptor	E	Glutamate
ABF	ABA Binding Factor	ECD	Extra Cellular Domain
ACN	AC eto N itrile	EDTA	Ethylène D iamine Tétra acétique
ACOEt	Acétate d'Ethyle	ESI	Ionisation Electro Epray
ADN	Acide Dé oxyribo Nuclé ique	ET	ETHylène
AFM	A tomic F orce M icroscopy	EtOH	Ethanol
AHK	A rabidopsis H istidine K inase	FAO	F ood and A griculture O rganization
AHP	A rabidopsis H istidine containing Phosphotransfer	FT	F acteurs de T ranscription
AIM	A uto- I nducible M edium	GARP	G olden/ ARR / Ps r1
AREB	ABA - R esponsive E lement B inding protein	GFP	G reen F luorescent P rotein
ARNm	ARN messenger	GIEC	G roupe I ntergouvernemental sur l'Évolution du C limat
ARR	A rabidopsis R esponse R egulator	GPCR	G Protein- C oupled R eceptor
BET	B romure d' E thidium	GPCR2	G - P rotein C oupled R eceptor 2
bZIP	basic leucine Z IPper	GPD	G lycérol-3- P hosphate D éshydrogénase
CA	C atalitic A TP-binding domain	GPD1	G lycérol-3- P hosphate D éshydrogénase 1
CACHE	C Alcium channels and C HEmotaxis receptors	GST	G lutathione S - T ransferase
CCNUCC	C onvention- C adre des N ations U nies sur les C hangements C limatiques	GUN5	G enomes U ncoupled 5
CDHR- CVL	C omité de D éveloppement H orticole de la R égion C entre- V al-de- L oire	H	H istidine
CHASE	C yclase/ H istidine-kinase A ssociated S ensory E xtracellular domain	ha	hectare
CHLH	Mg -chélatase H C hlorophyll A/B - B inding Protein of LHCII Type III	HCl	Acide chlorhydrique
CK	C yto K inine	HDX	H ydrogen/ D euterium E Xchange
CKI	C ytokinine I ndependant	HK	H istidine K inase
CMP	C onference M eeting of the P arties	HOG	H igh O smolarity G lycerol
COP21	C onference O f the P arties	HPT	H istidine-containing P hosphotransmitter
CP	P artie C ytoplasmique	HRMS	H igh R esonance M ass S pectrometry
CPC	C hromatographie de P artage C entrifuge	HS	S ubstance H umique
D	A spartate	ICOA	I nstitut de C himie O rganique et A nalytique
DE	D omaine E ffecteur	IFV	I nstitut F rançais de la V igne et du vin
DEDL	D étecteur E lectronique à D iffusion Linéaire	iP	iso P entényladénine
DHp	D imerization H istidine p hosphotransfer	IPT	I so P entényl T ransférase
dNTP	D éoxy Nuclé otide T ri P hosphate	IPTG	I so P ropyl β - D -1- T hio G alactopyranoside

Do	Drop-out	ITC	Calorimétrie Isotherme de Titration
DO₆₀₀	Densité Optique à 600 nm	JAs	JAsmonate
K	lysine	PGPB	Plant Growth-Promoting Bacteria
KAT	canal K+ chez Arabidopsis Thaliana	PMSF	PhénylMéthylSulfonyl Fluorure
LB	Lysogeny Broth	PP2C	Protéines Phosphatases de type 2C
LBLGC	Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures	ProBioSec	Production de Biostimulant pour la tolérance à la Sécheresse
LiAc	Acétate de Lithium	PRR	Pseudo-RR
MAPKK	MAP Kinase Kinase	PYL	PYrabactin resistant-Like
MAPKKK	MAP Kinase Kinase Kinase	SSK1	Suppressor of Sensor Kinase 1
mAU	milli Unité d'Absorbance	STL1	Suger Transporter-Like protein
MCP	Methylated Chemotaxis Protein	TAE	Tris-Acétate- EDTA
MES	4-MorpholineEthaneSulfonate	TCS	Two-Component System
MPa	MégaPascal	TD	Domaine Transmetteur
MS	Mass Spectrometry	TM	Domaine TransMembranaire
MSP	MultiStep-Phosphorelay system	Trx	Thiorédoxine
NaOH	Hydroxyde de sodium	UA	Unité Arbitraire
NCEI	Centre National pour l'Information Environnementale	UHPLC	Ultra High Performance Liquid Chromatography
NOAA	Administration Nationale Océanique et Atmosphérique	UV	UltraViolets
P2E	Physiologie, Ecologie et Environnement	YNB	Yeast Nitrogen Base
PAS	Per/Arnt/Sim	YPD	Yeast extract-Peptone-Dextrose
PCR	Réactions de polymérisation en chaîne	YPD1	TYROSINE Phosphatase Dependent 1
PEG6000	PolyEthylène Glycol 6000	YPGal	Yeast extract-Peptone-Galactose

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Projections de la variation saisonnière de la température de surface moyenne (en °C) et des précipitations moyennes (en %) pour la période 2081-2100, comparées à la période de référence 1995-2014.....	4
Figure 2. Surface et volume sur pied de peupliers cultivés en France	8
Figure 3. Schéma représentant les différentes catégories de sécheresse et leur évolution.....	10
Figure 4. La variation du potentiel de l'eau entre le sol et l'air permet à l'eau de circuler dans la plante.....	12
Figure 5. Schéma représentant les différentes stratégies de résistance des plantes à la sécheresse.	16
Figure 6. Résumé de la voie de perception et de signalisation ABA	19
Figure 7. Représentation synthétisée des effets des biostimulants sur les plantes au niveau moléculaire et cellulaire, ainsi qu'au niveau du phénotype de la plante.	26
Figure 8. Schéma illustratif du système à deux composantes chez les procaryotes.	29
Figure 9. Schéma représentant l'organisation modulaire des histidine kinases chez les procaryotes.	31
Figure 10. Schéma de trois exemples de système de transduction à deux composantes chez les bactéries	33
Figure 11. Partenaires clés des voies de signalisation liées aux récepteurs SLN1 et SHO1 chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	35
Figure 12. Représentation schématique des régulateurs de réponse chez <i>Arabidopsis thaliana</i> : RR-A, RR-B, RR-C et pseudo-RR.	40
Figure 13. Schéma du principe de la mutagenèse dirigée par PCR.	57
Figure 14. Stratégie de clonage par recombinaison homologue dans le vecteur pYX 212 directement dans la souche de levure MH179 pour des mutants par échange de domaines.....	62
Figure 15. Stratégie de clonage du domaine ECD dans le vecteur d'expression bactérienne pET32a.	64
Figure 16. Dispositif expérimental en pépinière.....	68
Figure 17. Topologie des éléments de structure du domaine périplasmique de la protéine Tlp3 de <i>Campylobacter jejuni</i>	95
Figure 18. Vue d'ensemble des étapes de la caractérisation biochimique des ECD des récepteurs HK1a et HK1b.....	97
Figure 19. Production des ECD de HK1a et HK1b dans <i>E. coli</i> à partir du plasmide pET28a.....	100
Figure 20. Production des ECD de HK1a et HK1b dans <i>E. coli</i> à partir du plasmide pET32a.....	101
Figure 21. Mécanisme d'auto-induction pour l'expression protéique dans un milieu auto-inductible.	103
Figure 22. Essais de solubilisation des ECD de HK1a et HK1b dans la souche BL21	105
Figure 23. Solubilisation des ECD de HK1a et HK1b par dénaturation des corps d'inclusion.	108
Figure 24. Effet de la congélation sur la solubilisation des corps d'inclusion de HK1a ECD et HK1b ECD dans les souches BL21 et Rosetta.	109
Figure 25. Schéma du protocole de solubilisation des corps d'inclusion bactériens.....	110
Figure 26. Analyse de la renaturation des ECD de HK1a et HK1b à partir des corps d'inclusion.....	113
Figure 27. STL1 est activé spécifiquement par HOG1 en présence du stress osmotique.....	123
Figure 28. Construction du système rapporteur avec le gène <i>GFP_{UV}</i> sous le contrôle du promoteur de stress PSTL1	125
Figure 29. Fonctionnement du système rapporteur en absence et en présence de stress osmotique.	126
Figure 30. Vérification de la fonctionnalité du système rapporteur sous lumière UV.	127
Figure 31. Vérification de la fonctionnalité du système rapporteur par mesure de la fluorescence.	129

Figure 32. Réponse du système rapporteur face à divers agents osmotiques.....	131
Figure 33. Schéma représentant le protocole de criblage des ligands pour les récepteurs HK1a et HK1b.	133
Figure 34. Évaluation de la fonctionnalité du système rapporteur à travers le criblage d'extraits dérivés d'algue.	135
Figure 35. Evaluation de l'effet des biostimulants E13, E14 et E17 sur SLN1, HK1a et HK1b.....	136
Figure 36. Evaluation de l'effet des biostimulants issus de levure sur SLN1, HK1a et HK1b.	138
Figure 37. Criblage des 20 acides aminés pour leur interaction avec les récepteurs HK1a et HK1b.	145
Figure 38. Effet du tryptophane sur l'activité des osmosenseurs SLN1, HK1a et HK1b.	146
Figure 39. Frise chronologique des différentes étapes de récoltes des feuilles de peuplier et d'analyses des phytoextraits dans le cadre du projet ProBioSec	149
Figure 40. Profils chromatographiques obtenus par UHPLC-MS des phytoextraits foliaires des cinq génotypes de la récolte de St-Cyr-en-Val	151
Figure 41. Profils chromatographiques obtenus par UHPLC-MS du phytoextrait de Skado irrigué... ..	152
Figure 42. Profils chromatographiques obtenus par UHPLC-MS des phytoextraits foliaires des quatre génotypes de peuplier	154
Figure 43. Effets des extraits foliaires de peuplier sur l'activité de HK1a et HK1b.....	156
Figure 44. Impact des phytoextraits Skado et Koster sur le taux de mortalité des pensées en absence et en présence de stress hydrique.	158
Figure 45. Effets des phytoextraits Skado et Koster sur la hauteur chez <i>Nemesia</i> face au stress hydrique.....	160
Figure 46. Suivi d'humidité du substrat en absence et en présence du stress hydrique.....	161
Figure 47. Effets des phytoextraits sur la hauteur et le nombre d'étages foliaires des tomates.....	163
Figure 48. Identification des composés présents dans les phytoextraits Skado et Koster par HRMS.....	164
Figure 49. Effets des exsudats racinaires de peuplier issus de cultures en aéroponie sur les récepteurs SLN1, HK1a et HK1b.	166
Figure 50. Effets des exsudats racinaires de peuplier issus de cultures en hydroponie sur les récepteurs SLN1, HK1a et HK1b.	168
Figure 51. Effets d'un extrait racinaire issu d'une lignée de hairy-root à partir de peuplier hybride sur les récepteurs SLN1, HK1a et HK1b	169

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Fonctions écologiques et utilisations des différentes parties du peuplier	7
Tableau 2. Caractéristiques et propriétés des différents génotypes de peuplier utilisés dans l'étude.	48
Tableau 3. Caractéristiques des plantes modèles utilisées pour les tests des phytoextraits de peuplier.....	49
Tableau 4. Composition des milieux de culture bactérienne.	50
Tableau 5. Composition et caractéristiques des milieux de culture levure.....	51
Tableau 6. Composition des réactions de PCR utilisant la polymérase GoTaq® ou Q5®. dNTPs pour désoxynucléotides.	54
Tableau 7. Paramètres du programme de PCR pour la polymérase GoTaq® et Q5®	54
Tableau 8. Liste des amorces spécifiques utilisées pour la création de mutants ponctuels et de mutants d'échange de domaine pour HK1a et HK1b.....	56
Tableau 9. Liste des amorces utilisées pour le séquençage.	58
Tableau 10. Amorces utilisées pour le clonage du domaine ECD dans le vecteur pET32a.	64
Tableau 11. Osmolarité mesurée pour les milieux avec différents agents osmotiques.....	132
Tableau 12. Les différentes modalités testées dans l'essai.....	157
Tableau 13. Analyse des pics majeurs et suggestions de composés identifiés à partir de la littérature.	165

INTRODUCTION

A. Contexte

1. Situation climatique actuelle

Dans le monde actuel, l'une des préoccupations majeures est l'intensification du changement climatique. Des prévisions scientifiques datant de 1967 avaient déjà prédit une hausse de la température moyenne de 2,3°C en conséquence directe du doublement de la concentration de CO₂ prévue pour le début du XXI^{ème} siècle (*Manabe & Wetherald, 1967*).

En 1979, face à l'urgence de la situation, la première conférence mondiale sur le climat à Genève a mené à la création d'un programme de recherche en climatologie à l'échelle mondiale (*Article Euronews, 2015*). Quelques années plus tard, en 1988, le **Groupe Intergouvernemental sur l'Evolution du Climat (GIEC)** fut créé, chargé du suivi et de l'étude des mécanismes du réchauffement climatique et propose des scénarios de prédiction des modifications climatiques dans ses rapports (**Fig. 1**).

Ces efforts ont permis d'identifier des tendances alarmantes. Par exemple, chaque décennie depuis les années 1980 a été plus chaude que toutes les décennies précédentes depuis 1850, et la période 2011-2020 a été marquée par une température moyenne de la surface de la terre plus élevée de 1,1 °C que celle de la fin du XIX^e siècle (niveaux pré-industriels).

Basé sur l'analyse statistique du **Centre National pour l'Information Environnementale (NCEI)**, il y a une probabilité de plus de 99% que 2023 sera l'année la plus chaude jamais enregistrée (*NCEI. NOAA, 2023*). De plus, l'**Administration Nationale Océanique et Atmosphérique (NOAA)** a confirmé que septembre 2023 a été le mois de septembre le plus chaud en 174 ans de relevés mondiaux (*NCEI. NOAA, 2023*).

En plus de ces augmentations de température, la NOAA a noté des différences significatives dans la manière dont le réchauffement affecte différentes régions du monde. En septembre, l'Afrique, l'Europe, l'Amérique du Nord et du Sud ont enregistré leurs températures les plus élevées pour ce mois, tandis que l'Asie et l'Océanie ont connu leur deuxième et troisième mois de septembre les plus chauds respectivement. Quant aux régions polaires, l'Antarctique a vécu son mois de septembre le plus chaud et l'Arctique le deuxième plus chaud. Cela a pour conséquence d'augmenter la probabilité d'événements météorologiques extrêmes, tels que

des vagues de chaleur et des sécheresses, qui peuvent se produire simultanément, exacerbant leurs effets.

L'agriculture et la sylviculture sont des domaines particulièrement vulnérables au réchauffement climatique, car leurs rendements peuvent être affectés par les variations de température et de précipitations, ainsi que par l'augmentation de la fréquence et de l'intensité des événements météorologiques extrêmes. En conséquences, leurs effets impacteront à la fois la sécurité alimentaire et la biodiversité entraînant à la fois une instabilité géopolitique et une intensification de l'effondrement déjà observé concernant la biodiversité. Devant l'urgence de cette situation, la communauté internationale s'est mobilisée. Lors de la 21^{ème} **C**onference **O**f the **P**arties (**COP21**) à la **C**onvention-**C**adre des **N**ations **U**nies sur les **C**hangements **C**limatiques (**CCNUCC**), et la 11^{ème} **C**onference **O**f the parties au protocole de Kyoto ou **M**eeting of the **P**arties to the Protocol (**CMP-11**) en 2015, un accord historique a été conclu pour limiter l'augmentation de la température moyenne mondiale entre 1,5°C et 2°C par rapport aux niveaux pré-industriels.

Cependant, malgré ces efforts, le réchauffement climatique continue à un rythme accéléré. Il est donc impératif de développer des solutions durables pour atténuer les effets de ce changement climatique.

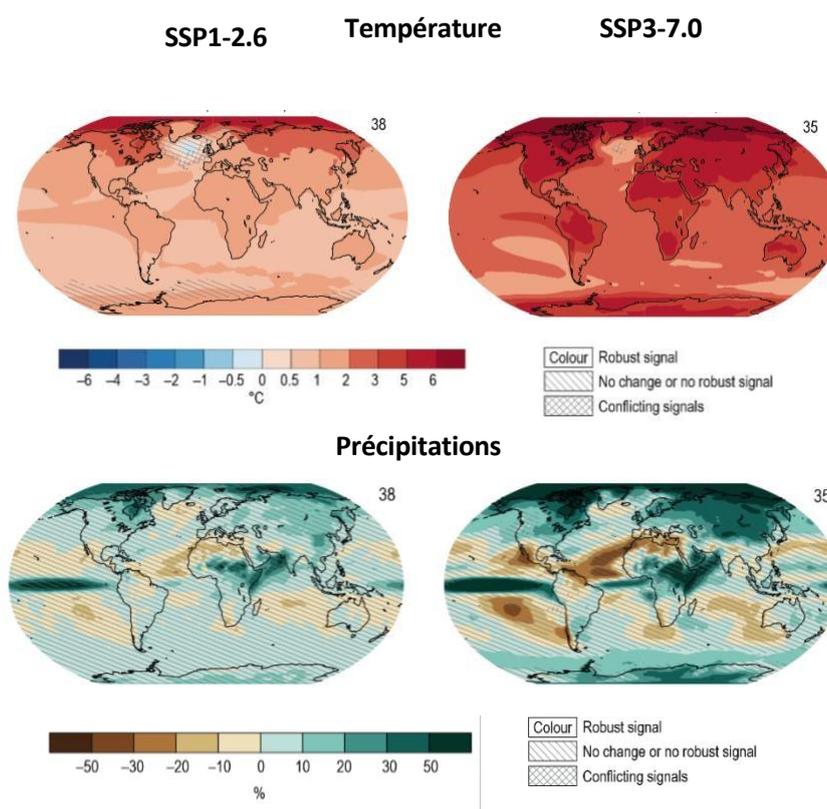


Figure 1. Projections de la variation saisonnière de la température de surface moyenne (en °C) et des précipitations moyennes (en %) pour la période 2081-2100, comparées à la période de référence 1995-2014.

Ces projections sont basées sur deux scénarios du GIEC : le scénario d'émissions faibles SSP1-2.6 et le scénario d'émissions élevées SSP3-7.0 (Source : GIEC, IPCC, 2021).

2. Recherche de biostimulants pour lutter contre les effets de la sécheresse

Parmi les solutions envisageables concernant la protection des espèces végétales des effets de l'augmentation des sécheresses, l'utilisation de biostimulants qui sont des substances ou des micro-organismes capables d'améliorer la vigueur, la productivité et la résistance des plantes face au stress, représente une voie prometteuse (du Jardin, 2015).

C'est dans ce contexte que le projet **ProBioSec** (Production de **B**io**s**t**i**m**u**lant pour la tolérance à la **S**écheresse) a été initié au laboratoire, un projet soutenu financièrement par la région Centre Val-de-Loire. **ProBioSec** se concentre sur le peuplier, une décision motivée par divers facteurs clés qui seront discutés plus en détail ultérieurement. Ce projet a pour but d'identifier de nouvelles molécules obtenues à partir d'extraits végétaux qui pourraient potentiellement

être utilisées dans la production de biostimulants pour aider les plantes à résister à la sécheresse et, par conséquent, atténuer les impacts de ce stress sur l'agriculture. Cette recherche pourrait ouvrir de nouvelles voies pour renforcer la résilience de nos systèmes agricoles face à un climat de plus en plus imprévisible et aride.

3. Peuplier : plante ligneuse modèle

Le peuplier appartient à la famille des Salicacées, composée de deux genres : le genre *Salix* représenté par plus de 350 espèces de saules et d'osiers, et le genre *Populus* qui comprend plus de 35 espèces d'arbres caduques. Le genre *Populus* se divise généralement en six sections : *Abaso*, *Aigeiros*, *Leucoides*, *Tacamahaca*, *Populus* et *Turanga* (Dickmann & Kuzovkina, 2008). Ces arbres sont originaires des régions tempérées de l'hémisphère nord, où ils jouent un rôle important dans les écosystèmes forestiers et les habitats riverains (Liu et al., 2022).

Les peupliers sont de grands arbres atteignant souvent des hauteurs de 20 à 30 mètres, voire plus dans certains cas (Hartmann et al., 1990). Ils sont dioïques, ce qui signifie que les fleurs mâles et femelles sont portées par des arbres séparés (Cronk, 2005). Ils présentent une grande variabilité génétique, leur permettant de s'adapter à une vaste gamme de conditions climatiques et de types de sols (Bradshaw et al., 2000). Cette variabilité génétique se manifeste aussi par des différences morphologiques visibles, telles que la forme et la taille des feuilles, la couleur de l'écorce et la vitesse de croissance entre autres (Frewen et al., 2000). Cette diversité est donc un atout majeur pour les forêts de plantation monoclonale (populiculture) apportant de multiples bénéfices économiques, tout comme pour les forêts naturelles de ripisylves, importantes d'un point de vue écologique.

a. Le rôle du peuplier dans les pratiques environnementales et économiques

Les peupliers, réputés pour leur croissance rapide, sont de précieux acteurs dans diverses applications environnementales. En effet, ils fournissent une source durable de bois (**Tab. 1**) pour de nombreux usages et sont de plus en plus utilisés pour la production de biocarburants et de produits chimiques biosourcés (Nikolić et al., 2017).

Ces caractéristiques, combinées à la multifonctionnalité des peupliers et à leur potentiel pour la restauration et la valorisation des terres, les rendent essentiels pour une multitude de pratiques écologiques (*Boothroyd-Roberts et al., 2013*). À titre d'illustration de leur importance écologique et historique, Pando, une colonie de peupliers, en est un exemple frappant, étant considérée comme l'organisme vivant le plus lourd et le plus ancien de la planète (*Mitton & Grant, 1996 ; Rogers & McAvoy, 2018*).

Les peupliers se distinguent notamment par leur capacité à séquestrer le carbone plus rapidement et efficacement que de nombreuses autres espèces d'arbres (*McKenney et al., 2004 ; Fang et al., 2007*). En outre, lorsque leur bois est utilisé dans la construction ou d'autres applications à long terme, le carbone reste séquestré pendant toute la durée de vie du produit **(Tab. 1)**.

Par ailleurs, les peupliers s'adaptent rapidement aux sols perturbés et contribuent efficacement à leur restauration. Leur système racinaire étendu favorise la structuration du sol en créant des voies pour l'air et l'eau, facilitant ainsi l'infiltration de l'eau et réduisant le ruissellement. En stabilisant le sol, ils aident à prévenir l'érosion, surtout dans les zones perturbées (*Puletti et al., 2019*), et jouent un rôle dans la prévention des inondations, particulièrement dans les zones où le sol est saturé d'eau **(Tab. 1)**.

Dans le domaine de la dépollution, les peupliers sont souvent employés pour décontaminer les sols pollués par des métaux lourds et pour traiter les eaux usées ou de ruissellement agricole (*Mertens et al., 2007*). Les forêts de peupliers peuvent offrir un habitat à une grande diversité d'espèces animales. Plantés en rangées, ils peuvent servir de brise-vent pour protéger les cultures, les pâturages ou les habitations, tout en améliorant le microclimat **(Tab. 1)**.

Tableau 1. *Fonctions écologiques et utilisations des différentes parties du peuplier.*

Parties du peuplier	Exploitations	Rôles écologiques
Tronc	- Production de bois d'œuvre, papier, et bioénergie	- Séquestration du carbone
Racines	- Artisanat et sculpture - Fabrication de teintures	- Prévention de l'érosion du sol et sa stabilisation - Phytoremédiation
Feuilles	- Médecine traditionnelle - Alimentation pour la faune - Artisanat et teintures	- Régulation du cycle de l'eau par transpiration - Production d'oxygène
Bourgeons	- Cosmétique et pharmacologie	- Sources de nourriture pour la faune

b. Aperçu mondial de la culture du peuplier

De par son importance économique et écologique, le peuplier est largement cultivé en populiculture, formant une part notable de la sylviculture mondiale.

D'après les évaluations régulières des ressources forestières mondiales par l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (**FAO**), les forêts représentent environ 31% de la superficie terrestre mondiale, soit près de 4,06 milliards d'hectares (ha). Les peupliers couvrent environ 75 millions ha du territoire forestier mondial, répartis en 70 millions ha en peuplements naturels et 5 millions ha en peupleraies (*FAO, 2020*).

Il est intéressant de noter que plus de la moitié (54%) de la couverture forestière mondiale est concentrée dans cinq pays : la Fédération de Russie, le Brésil, le Canada, les États-Unis d'Amérique et la Chine (*FAO, 2020*). La Chine et l'Inde sont les deux pays les plus engagés dans la culture du peuplier, avec respectivement 4,8 et 1 million ha de peupliers plantés. En Chine, la superficie en peupliers plantés est utilisée à la fois pour la production de bois (2 millions ha) et pour la protection de l'environnement (2,8 millions ha) (*FAO, 2018*). En Europe, la populiculture est également une pratique significative, et les plus grandes surfaces plantées de peupliers comprennent la France (235 000 ha), la Hongrie (160 000 ha), la Roumanie (160 000 ha), la Turquie (130 000 ha) et l'Italie (120 000 ha) (*FAO, 2018*).

La populiculture est une pratique traditionnelle en France, remontant au milieu du XVIIIème siècle et ayant connu un essor après 1942, à la suite de l'arrêt des importations de certaines essences d'arbres. Aujourd'hui, la France est le troisième producteur mondial de peupliers

notamment la région Centre-Val de Loire qui compte 2 636 propriétaires forestiers détenant plus de 4 ha dédiés à la culture du peuplier. Parmi les zones de plantation, les peupleraies cultivées s'étendent sur environ 208 000 hectares (**Fig. 2**). Chaque année, elles croissent de 2,0 millions de mètres cubes et ont produit 1,5 million de mètres cubes de bois en 2018. En outre, la production de biomasse est parfois réalisée à partir de peupliers cultivés sous forme de taillis à courte ou très courte rotation (FAO, 2018 ; IGN, 2020).

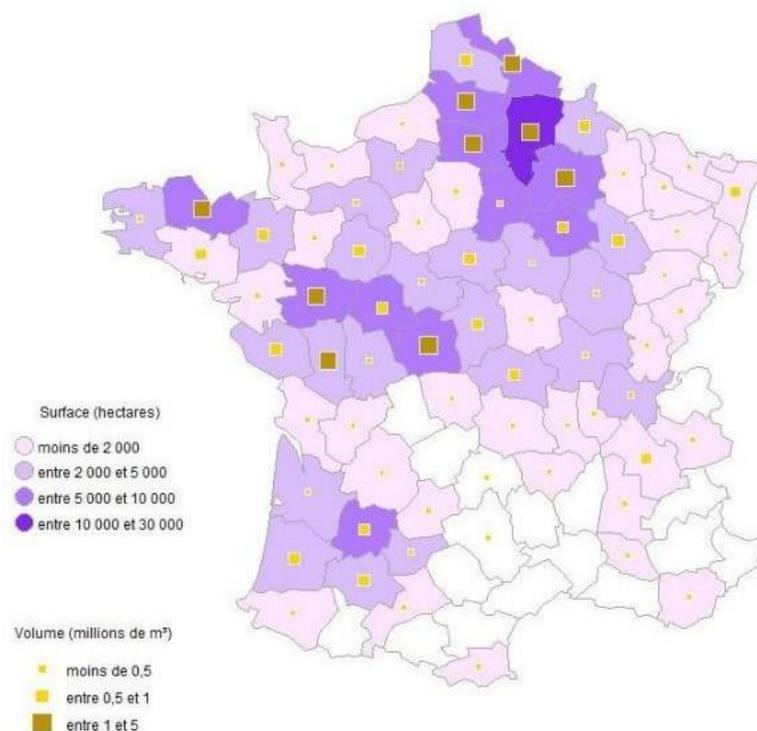


Figure 2. Surface et volume sur pied de peupliers cultivés en France (IGN 2016-2020).

c. Intérêts scientifiques du peuplier en tant qu'espèce modèle

La prépondérance économique des peupliers a entraîné la mobilisation de ressources de recherche considérables. À l'instar d'*Arabidopsis thaliana*, modèle pour les plantes herbacées, le peuplier est devenu un arbre de référence pour l'étude des ligneux.

Il convient de souligner que les peupliers offrent des atouts non négligeables pour les chercheurs en biologie. Ces arbres, répandus dans l'ensemble de l'hémisphère Nord, regroupent des espèces capables de résister à une vaste gamme de conditions environnementales (Wullschleger et al., 2002), que ce soit la sécheresse, à laquelle résiste le peuplier *P. euphratica* du sud, ou les températures basses, supportées par les peupliers

baumiers d'Alaska. De plus, diverses espèces de peupliers présentent des degrés variables de résistance contre divers parasites, ce qui peut affecter leur utilisation.

Ainsi, les peupliers se distinguent comme un modèle d'investigation particulièrement intéressant, en raison de leur cycle de vie plus court comparé à la majorité des autres arbres ligneux, rendant la recherche génétique plus accessible (*Bradshaw et al., 2000*). Le peuplier se distingue également par sa simplicité génomique relative, avec 38 chromosomes et environ 152 millions de paires de bases, ce qui a permis un séquençage complet réalisé à partir du clone "Nisqually-1" de *Populus trichocarpa* (*Tuskan et al., 2006*), ouvrant de nouvelles perspectives pour comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans son fonctionnement et son développement.

Enfin, la capacité de cette espèce à se propager rapidement par multiplication végétative, couplée à une maturité sexuelle relativement précoce (5 à 10 ans), facilite les études génétiques et de croisements. De plus, les techniques de transformation génétique du peuplier sont bien établies, permettant une exploration plus approfondie du rôle de différents gènes (*Bradshaw et al., 2000 ; Taylor, 2002 ; Jansson & Douglas, 2007*). En effet, il est facilement transformable par *Agrobacterium*, une propriété qui offre de nombreuses opportunités pour étudier les mutants et leurs conséquences phénotypiques (*Busov et al., 2005*). De plus, après sa transformation, le peuplier présente des capacités de régénération *in vitro*, ce qui facilite l'observation des modifications phénotypiques (*Morabito et al., 2011*). Par ailleurs, le peuplier peut être cultivé selon d'autres modalités, en aéroponie et en hydroponie.

B. Sécheresse et conséquences sur les plantes

1. Exploration des concepts : sécheresse, déficit hydrique, stress osmotique

La sécheresse est l'un des principaux facteurs qui affectent la survie d'une plante. Elle survient lorsque l'approvisionnement en eau des racines est limité ou la perte d'eau par transpiration est très élevée. Elle peut se manifester de trois manières (**Fig. 3**) (*Wilhite & Glantz, 1985 ; Tallaksen & Lanen, 2004 ; Mishra & Singh, 2010*) :

- **La sécheresse météorologique ou atmosphérique**, due à une diminution des précipitations pendant une période prolongée.
- **La sécheresse agricole ou édaphique**, survenant lorsque le manque de pluie affecte directement les sols et la végétation. Son impact varie en fonction de la nature du sol, de son degré d'humidité, des pratiques agricoles et du type de plantes concernées.
- **La sécheresse hydrologique**, un phénomène qui résulte de la diminution des réserves d'eau des nappes phréatiques, des cours d'eau et des lacs en dessous des valeurs moyennes attendues. Cette situation peut être provoquée par une sécheresse météorologique survenue durant une longue période, particulièrement intense en automne et en hiver, ou par une surexploitation des ressources en eau. Parfois, une distinction est établie entre la sécheresse des eaux souterraines, qui correspond à des niveaux d'eau souterraine inférieurs à la normale, et la sécheresse des cours d'eau, qui se manifeste par un débit fluvial plus faible que la normale (Peters, 2003).

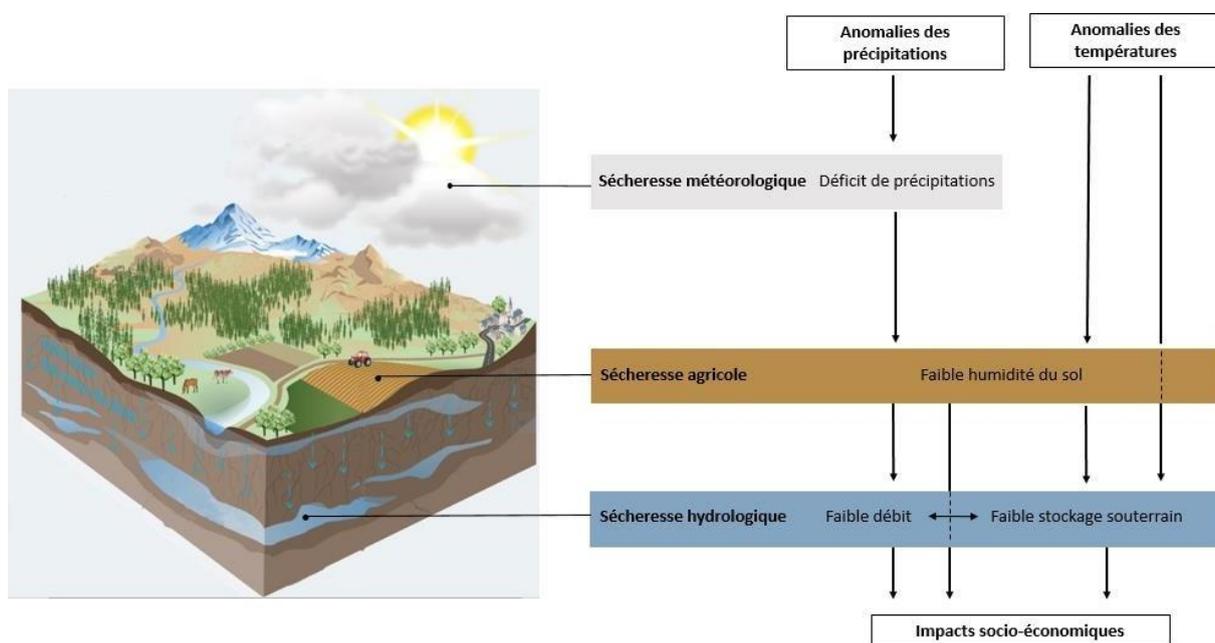


Figure 3. Schéma représentant les différentes catégories de sécheresse et leur évolution.

(Van Loon, 2015).

En réponse à la sécheresse, les plantes peuvent subir un état de stress hydrique, une réaction physiologique à un déficit d'eau dans le sol (Chaves et al., 2002). Les signes de stress hydrique

chez les plantes peuvent inclure le flétrissement, le jaunissement et d'autres modifications de l'apparence et de la croissance de la plante (détaillée ci-dessous).

En outre, sous certaines conditions défavorables, comme un sol salé, les plantes peuvent aussi subir un stress osmotique au niveau cellulaire où la concentration de solutés (tels que les sels, les sucres ou les protéines) dans une cellule est plus élevée à l'intérieur qu'à l'extérieur, ou *vice versa*. Cela crée une pression osmotique qui implique un déplacement de l'eau du compartiment le moins concentré vers le compartiment le plus concentré en solutés. Le stress osmotique peut être causé par un certain nombre de facteurs, y compris la salinité du sol et le gel, mais il peut également être un effet secondaire d'un déficit hydrique. Lorsque l'eau est limitée, la concentration de solutés à l'intérieur des cellules de la plante peut augmenter, ce qui peut à son tour causer un stress osmotique (*Munns, 2002*).

2. Impact du déficit hydrique sur les plantes

Dans un contexte de changement climatique, le déficit hydrique (**Cf. Section B.1**) devient une contrainte environnementale majeure qui affecte la productivité végétale à travers le monde (*Allen et al., 2010 ; Trenberth et al., 2014*). Il est crucial d'étudier comment ce déficit influence le fonctionnement des plantes pour comprendre les mécanismes sous-jacents de ces effets.

a. Mécanisme de transport de l'eau dans les plantes

Le mouvement de l'eau au sein de la plante est régulé par un gradient de **potentiel hydrique**, une mesure de l'énergie libre nécessaire pour accomplir le travail. Il s'effectue depuis le sol, où l'eau est absorbée, jusqu'à l'atmosphère. Ce transport est principalement assuré par le xylème (*Zwieniecki et al., 2001*). L'eau s'élève au sein de la plante, principalement grâce à la tension créée par l'évapotranspiration et la cohésion entre les molécules d'eau. Ce processus est illustré en détail dans la **Fig. 4**.

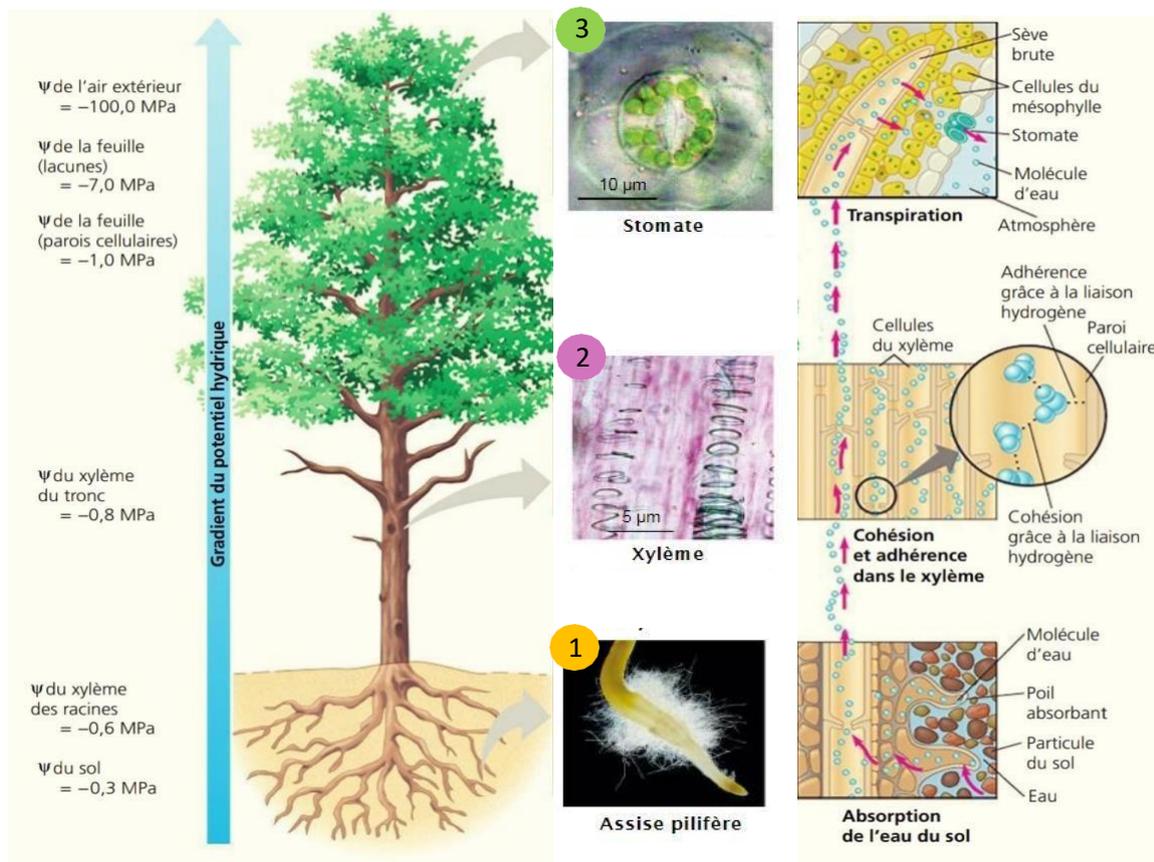


Figure 4. La variation du potentiel de l'eau entre le sol et l'air permet à l'eau de circuler dans la plante.

La montée de la sève brute est rendue possible par plusieurs processus physiologiques : la transpiration (l'évaporation de l'eau à travers les stomates des feuilles), la cohésion et l'adhésion des molécules d'eau et les différences de pression entre les racines et les feuilles. La force qui fait monter la sève brute du sol (1) vers les feuilles (3) en passant par le xylème (2) est créée par un gradient de **potentiel hydrique ψ** . Les feuilles dont l'eau des nervures est typiquement portée à un potentiel hydrique de l'ordre de -1 MPa, sont soumises à des fortes tensions hydrauliques, les rendant les plus vulnérables de la plante. Modifiée d'après (Roichard, 2023).

b. Conséquences du déficit hydrique sur les plantes

Durant les périodes de déficit hydrique, couramment observées pendant les sécheresses, la circulation de l'eau et des nutriments au sein de la plante est compromise, restreignant l'accès aux ressources essentielles pour sa croissance (Chaves et al., 2003). L'insuffisance d'eau engendre une série de réactions physiologiques et biochimiques défavorables qui entravent la croissance et la productivité de la plante (Farooq et al., 2009).

En effet, plusieurs impacts majeurs découlent de ce déficit hydrique :

Premièrement, la croissance des plantes est réduite car l'expansion cellulaire est entravée lorsque l'apport en eau est insuffisant (Chaves et al., 2002). Deuxièmement, la photosynthèse

est limitée car les stomates se ferment en situation de déficit hydrique pour limiter la perte d'eau par transpiration (*Buckley, 2005*), réduisant ainsi l'absorption du CO₂ et entraînant une baisse de la production de biomasse (*Flexas & Medrano, 2002*). Troisièmement, un stress hydrique sévère et prolongé peut conduire à la dégradation des tissus par la sénescence des feuilles, affectant sa capacité à absorber l'eau et les nutriments du sol (*Skirycz & Inzé, 2010*). Enfin, le déficit hydrique peut provoquer un stress oxydatif par l'augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans les cellules des plantes. Ces molécules et radicaux libres très réactifs, s'ils ne sont pas équilibrés par les mécanismes antioxydants de la plante, pouvant causer d'importants dommages aux lipides, protéines et ADN des cellules végétales, altérant ainsi le fonctionnement normal de la plante (*Choudhury et al., 2017*).

C. Stratégies mises en œuvre par les plantes en réponse au déficit hydrique

1. Notions d'adaptation, d'acclimatation et de réaction

L'**adaptation** fait référence à un ensemble de changements héréditaires au sein d'un organisme, qui améliorent la probabilité de survie dans un environnement spécifique. Ces changements, souvent le résultat de mutations aléatoires ou de recombinaisons, peuvent être observés de manière significative chez les plantes soumises à des contraintes hydriques.

En réponse à la sécheresse, ces plantes présentent des adaptations qui augmentent leurs chances de survie. Ces adaptations peuvent être classées en plusieurs catégories :

- Les adaptations **morphologiques**, qui se manifestent par exemple par un ratio élevé entre la biomasse racinaire et aérienne, une croissance aérienne lente, ou une taille réduite (*Poorter et al., 2012*).
- Les adaptations **anatomiques**, qui favorisent l'économie de l'eau, comme la présence de petites feuilles à cuticule épaisse ou une inclinaison des feuilles pour minimiser l'interception du rayonnement (*Niinemets, 2001*).
- Les adaptations **physiologiques**, comme un très faible potentiel osmotique à pleine turgescence, qui permet à la plante de retenir davantage d'eau dans ses tissus (*Chaves et al., 2003 ; Flexas et al., 2006*).

- Les adaptations **cellulaires et moléculaires**, qui peuvent impliquer la modification de l'expression ou de la régulation de certains gènes (*Zhu, 2002 ; Chaves et al., 2003 ; Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 2007 ; Golldack et al., 2011*).

Par ailleurs, l'**acclimatation** est un concept lié, mais distinct, faisant référence à des changements phénotypiques induits par des variations des facteurs environnementaux (*Ghalambor et al., 2007 ; Nicotra et al., 2010*). Par exemple, une résistance accrue à la contrainte hydrique chez les plants régulièrement exposés à des sécheresses modérées est une forme d'acclimatation, qui peut se manifester par un ajustement osmotique, une diminution de la surface foliaire, ou une sensibilité accrue des stomates.

Enfin, la **réaction** à une contrainte correspond à la réponse immédiate ou à court terme de la plante face à une contrainte. Cette réponse peut être déclenchée par la libération ou la synthèse de composés chimiques telles que les ROS (*Apel & Hirt, 2004*) ou la synthèse de protéines de choc thermique (*Mittler et al., 2012*), ou par un signal physique. Par exemple, la fermeture stomatique en réponse à une augmentation de la concentration en **Acide ABscissique** (ABA) dans la feuille est une réaction permettant une régulation efficace des flux d'eau (*Buckley, 2005*).

2. Stratégies de résistance : échappement, évitement et tolérance

Les plantes adoptent diverses stratégies pour gérer le stress hydrique, qui peuvent être regroupées en trois catégories principales : l'échappement, l'évitement et la tolérance (**Fig. 5**) (*Levitt, 1980 ; Kooyers, 2015 ; Khan et al., 2016*).

L'**échappement** est une stratégie souvent utilisée par les espèces des milieux désertiques ou celles qui vivent dans des régions à saison des pluies courte. Ces plantes réalisent leur cycle de vie - germination, croissance, développement, floraison et production de graines - de manière accélérée dès que les conditions sont favorables. Elles évitent ensuite la période sèche sous une forme qui tolère une forte déshydratation, comme les graines ou d'autres structures de survie.

L'**évitement** est une stratégie où les plantes investissent beaucoup d'énergie pour minimiser les pertes en eau. Elles le font notamment par la fermeture stomatique, la perte des feuilles,

la réduction de la taille des feuilles, ou encore un enracinement profond pour maximiser le prélèvement d'eau. Cependant, cette stratégie a un coût : la croissance est rapidement stoppée.

La **tolérance** est une autre stratégie où les plantes survivent dans des conditions de faible disponibilité en eau dans le sol. Ces plantes sont capables de maintenir la transpiration jusqu'à des niveaux de potentiels hydriques très bas, grâce à leur capacité d'ajustement osmotique qui rend l'eau difficilement extractible de leurs tissus.

Chacune de ces stratégies présente des avantages et des inconvénients (**Fig. 5**), et plusieurs facteurs influent sur la capacité de résistance des plantes à la sécheresse. La génétique joue un rôle clé, certaines plantes ayant naturellement développé des mécanismes de résistance au manque d'eau, comme des modifications structurelles ou métaboliques (*Passioura, 2007*).

L'âge et le stade de développement affectent également la réponse des plantes au stress hydrique, les jeunes plantes étant généralement plus vulnérables, en particulier pendant la germination et la floraison (*Passioura, 2007; Farooq et al., 2009*).

Les conditions environnementales, telles que la température, la luminosité (*Buckley, 2005*), la qualité du sol et la disponibilité des nutriments (*Brda et al., 2006*) ont un impact sur la résistance des plantes à la sécheresse.

Enfin, d'autres facteurs de stress comme les parasites, les maladies, la salinité du sol ou d'autres formes de stress abiotique peuvent également affecter la capacité d'adaptation des plantes au déficit hydrique (*Atkinson & Urwin, 2012 ; Pandey et al., 2015*).

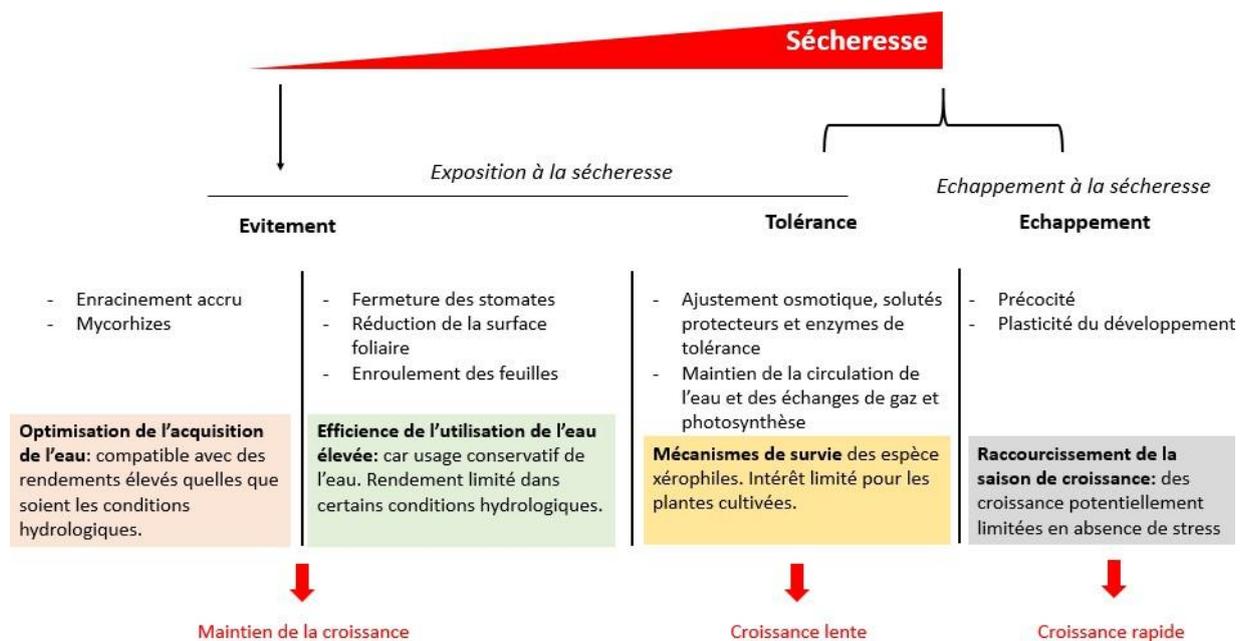


Figure 5. Schéma représentant les différentes stratégies de résistance des plantes à la sécheresse.

(Levitt, 1980 ; Kooyers, 2015 ; Khan et al., 2016).

3. Réponses moléculaires au déficit hydrique

Les plantes ont élaboré une multitude de mécanismes moléculaires afin d'identifier et de faire face au stress hydrique, notamment par la mise en place de voies de signalisation spécifiques. Grâce à des précurseurs inorganiques simples, elles peuvent générer une vaste gamme de composés organiques de faible masse molaire pour résister à différents types de stress : biotique, abiotique et nutritionnel. D'un point de vue fonctionnel, ces composés organiques de faible masse molaire se répartissent en métabolites primaires, métabolites spécialisés et hormones végétales (Taiz et al., 2015).

a. Rôle de l'ABA dans le développement des plantes et leur réponse à la sécheresse

L'ABA, une hormone végétale essentielle, appartient à la catégorie des sesquiterpénoïdes. Composée de quinze atomes de carbone, elle est majoritairement synthétisée à partir de caroténoïdes. Ce processus de synthèse se déroule au sein des chloroplastes (Nambara & Marion-Poll, 2005).

L'une des fonctions primordiales de l'ABA est d'abord la régulation de la dormance des graines. L'ABA inhibe activement la germination des graines, assurant ainsi que ces dernières restent en état de dormance jusqu'à ce que les conditions environnementales soient propices à leur germination (*Finkelstein et al., 2008 ; Finkelstein, 2013*). L'ABA est également impliqué dans l'initiation et le développement des tissus de l'écorce notamment dans la régulation de la différenciation des cellules de l'écorce (*Lakehal & Bellini, 2019*).

Par ailleurs, l'ABA est communément qualifié de "hormone de stress" en raison de son rôle prépondérant dans la régulation de la réponse des plantes à divers stress environnementaux tels que : la sécheresse, la salinité et le froid (*Verslues et al., 2006 ; Cutler et al., 2010 ; Kim et al., 2010 ; Miyakawa et al., 2013*). L'augmentation de la teneur en ABA au sein de la plante, que ce soit par le biais du clivage de formes conjuguées d'ABA (*Lee et al., 2006*), ou par biosynthèse *de novo* (*Nambara & Marion-Poll, 2005*), est une réponse significative aux stress abiotiques. Ce phénomène permet de réguler l'expression des gènes de réponse au stress, ce qui facilite l'adaptation de la plante à ces conditions environnementales défavorables (*Hetherington, 2001*).

Concernant la croissance et le développement des tissus végétaux, la présence de l'ABA a des effets particulièrement marqués sur les racines. Par exemple, l'ABA a été montré capable de moduler l'élongation des racines en réponse au stress hydrique (*Sharp & LeNoble, 2002*). De plus, les taux d'ABA augmentent en réponse à la sécheresse, provoquant une accélération de la croissance des racines. Ce mécanisme permet à la plante d'explorer davantage le sol pour obtenir plus d'eau, ce qui est vital pour sa survie en condition de sécheresse (*Spollen et al., 2000 ; Sharp et al., 2004*). Par ailleurs, une étude a montré que l'ABA peut inhiber l'initiation des racines latérales (*Guo et al., 2012*) et influencer le gravitropisme des racines (*Harris, 2015*).

En outre, l'ABA a un rôle clé dans la régulation de l'ouverture et de la fermeture des stomates. En effet, durant les périodes de sécheresse, la synthèse de l'ABA est induite, conduisant à la fermeture des stomates pour minimiser la perte d'eau par transpiration. Enfin, l'ABA joue un rôle important dans la dormance des bourgeons pour aider les plantes à résister aux conditions hivernales. Chez le peuplier, l'ABA a été associé à la dormance des bourgeons lors de l'entrée en dormance hivernale (*Rinne et al., 1998*).

b. Acteurs clés de la voie de signalisation de l'ABA

Des travaux de recherche, comme ceux menés par *Raghavendra et al.* (2010), ont mis en évidence le rôle clé de l'ABA dans l'orchestration de voies de signalisation, qu'elles soient dépendantes ou indépendantes de l'ABA (*Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 1997 ; Roychoudhury et al., 2013*).

Les recherches sur la voie de signalisation de l'ABA ont permis d'identifier plusieurs composants interagissant, dont les principaux sont les récepteurs nucléocytoplasmiques de l'ABA appartenant à la famille **PYR/PYL/RCAR** (**PY**rabactin **R**esistant/**PY**rabactin resistant-**L**ike/**R**egulatory Component of **ABA** Receptor) au nombre de 14, les **Protéines Phosphatases** de type **2C** (**PP2C**) au nombre de 80 chez *Arabidopsis* et 3 protéines **Sucrose nonfermenting Kinase-1-Related protein Kinase 2** (**SnRK2**). Cette voie est illustrée en détails dans la **Fig. 6** (*Klingler et al., 2010 ; Guo et al., 2011 ; Hauser et al., 2011 ; Takezawa et al., 2011 ; Zhang et al., 2015*).

Quand les plantes sont confrontées à divers stress, la teneur en ABA endogène augmente, activant ainsi ce réseau de signalisation. L'ABA se lie aux récepteurs PYR/PYL/RCAR formant un complexe qui interagit physiquement avec les PP2C. Dans des conditions normales, sans stress, les PP2C inhibent l'activité des protéines kinases SnRK2. Cependant, avec l'augmentation du niveau d'ABA due au stress, le complexe PYR/PYL/RCAR-ABA parvient à inhiber l'action des PP2C, ce qui permet d'activer les kinases SnRK2 et de traduire le signal en aval vers d'autres cibles cellulaires. Ces kinases peuvent cibler les NADPH oxydases et les canaux ioniques comme le **S**low **A**nion **C**hannel-associated **1** (**SLAC1**) et le canal **K**⁺ chez *Arabidopsis Thaliana 1* (**KAT1**). Ces cibles jouent un rôle crucial dans la régulation de la fermeture des stomates (*Geiger et al., 2009 ; Sirichandra et al., 2009 ; Vahisalu et al., 2010*).

De plus, les SnRK2 une fois libérées, peuvent être activées par autophosphorylation. Elles ont alors le potentiel de phosphoryler les canaux ioniques et les **F**acteurs de **T**ranscription (**FT**) en aval (*Fujita et al., 2009 ; Ma et al., 2009 ; Umezawa et al., 2009*) (**Fig. 6**). Un groupe notable de ces FT sont les **ABA-Responsive Element Binding protein/ABA Binding Factor** (**AREB/ABF**) (*Nakashima et al., 2009*), qui jouent un rôle central dans cette voie et sont essentiels pour la réponse adaptative des plantes au stress, que ce soit dans les graines ou les tissus végétatifs (*Fujita et al., 2009 ; 2013*).

D'autres protéines comme **GPCR2 (G-Protein Coupled Receptor 2)**, qui interagit avec la seule sous-unité $G\alpha$ d'*Arabidopsis*, a été impliquée dans cette voie de signalisation comme récepteur ABA (Liu et al., 2007 ; Wang & Zhang, 2008 ; Pandey et al., 2009). Enfin, la sous-unité Mg-chélatase H Chlorophyll A/B-Binding Protein of **LHCII Type III/ Genomes UNcoupled 5 / ABA Receptor (CHLH/GUN5/ABAR)** d'*Arabidopsis* ainsi que son homologue de *Vicia faba* ont été identifiés comme des protéines de liaison à l'ABA, apportant une dimension supplémentaire à ce réseau de signalisation (Shen et al., 2006 ; Wang & Zhang, 2008 ; Guo et al., 2011).

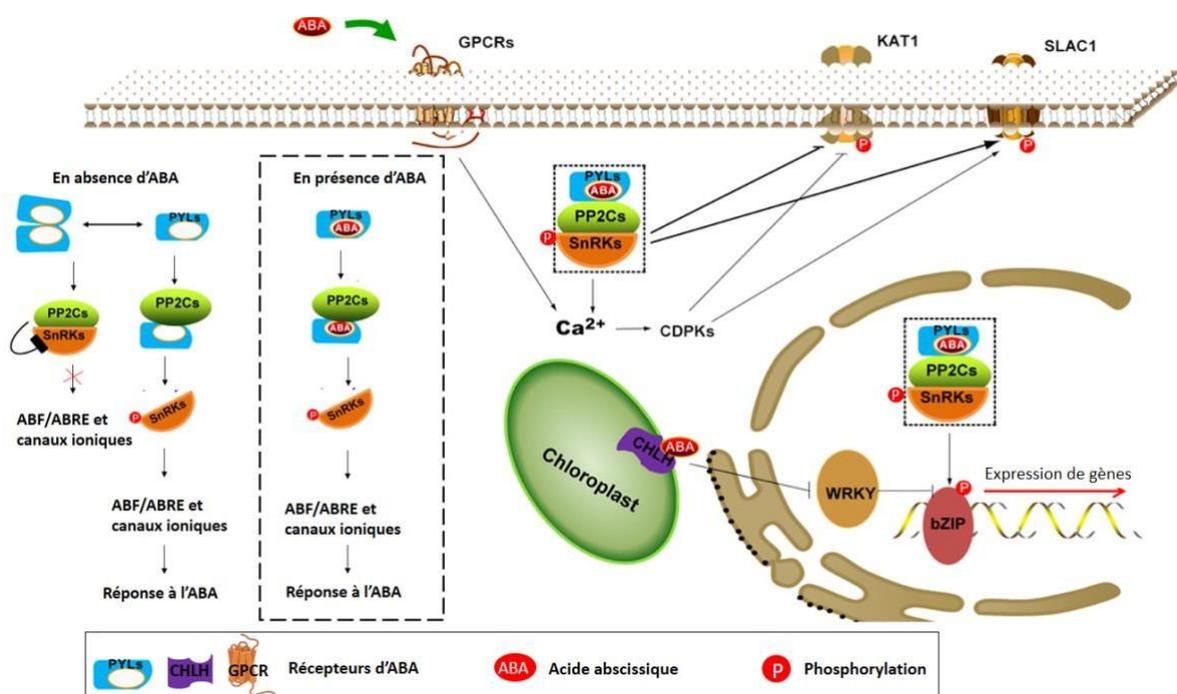


Figure 6. Résumé de la voie de perception et de signalisation ABA.

La signalisation de l'ABA implique des récepteurs nucléocytoplasmiques **PYR/PYL/RCAR (PYL)**, la sous-unité Mg-chélatase H dans les plastes (**CHLH/GUN5/ABAR**), et des protéines G de type **GPCR** dans la membrane plasmique. La voie de signalisation centrale comprend **PYL**, **PP2C** et **SnRK2** (rectangle en pointillé noir agrandi à gauche), qui régulent l'expression génique et la fermeture stomatique. **En absence d'ABA**, les dimères **PYL** ne peuvent pas se lier aux **PP2C**, ce qui permet à **PP2C** d'inhiber les **SnRK2s**. Néanmoins, une sous-famille de **PYL** monomères présente une activité inhibitrice constitutive sur les **PP2C**. **En présence d'ABA**, les **PYL** inhibent les **PP2C**, ce qui active les **SnRK2s** par autophosphorylation. Les **SnRK2s** activés ciblent ensuite les facteurs de liaison aux éléments sensibles à l'ABA **bZIP** (comme **ABF/ABRE**) pour réguler l'expression génique, et les canaux cationiques **SLOW ANION CHANNEL-ASSOCIATED 1 (SLAC1)** et **POTASSIUM CHANNEL IN ARABIDOPSIS THALIANA 1 (KAT1)** pour induire la fermeture stomatique. Modifiée d'après (Zhang et al., 2015).

c. Au-delà de l'ABA : le rôle des cytokinines dans la tolérance des plantes à la sécheresse

Les **CytoKinines (CK)** jouent un rôle important dans divers aspects du développement des plantes, y compris dans la régulation de la croissance, le développement des bourgeons, la division cellulaire, et la réponse au stress environnemental, comme la sécheresse (*Ha et al., 2012 ; Nguyen et al., 2016*). Dans les années 1950, Miller et Skoog ont découvert la kinétine, la première cytokinine identifiée comme une molécule d'origine végétale favorisant la division cellulaire (*Miller et al., 1956*).

De nombreuses études ont démontré que les CK peuvent influencer la tolérance ou la résistance au stress de manière positive comme négative (*Ghanem et al., 2008 ; Nishiyama et al., 2011*). Il est notable que l'augmentation de la production endogène de CK renforce la tolérance de nombreuses plantes à la sécheresse. Néanmoins, des niveaux réduits de CK peuvent aussi favoriser la tolérance à la sécheresse (*Werner et al., 2010 ; Qin et al., 2011 ; Macková et al., 2013 ; Li et al., 2021*). Cependant il semble que les cytokinines ne puissent atténuer le stress abiotique seules ; elles agiraient en coordination avec d'autres voies de signalisation (*Antoniadi et al., 2020 ; Li et al., 2021*). Il a été démontré que les CK interagissent avec l'ABA, les **JAsmonates (JAs)**, l'**ETHylène (ET)**, l'**Acide Salicylique (SA)**, illustrant ainsi l'existence d'un réseau coordonné entre ces phytohormones, toutes impliquées dans la tolérance des plantes au stress (*Efroni et al., 2013 ; Thu et al., 2017 ; Artner & Benkova, 2019 ; Antoniadi et al., 2020 ; Skalák et al., 2021*).

Dans certaines expériences utilisant des techniques de transgénèse, une surproduction de l'**isoPentényladénine (iP)**, une des nombreuses formes de CK, a été induite dans le riz et le tabac, ce qui a entraîné une meilleure tolérance à la sécheresse (*Kuppu et al., 2013*). En particulier, des recherches ont démontré que des plants de riz génétiquement modifiés, avec une concentration accrue de CK, présentaient une meilleure tolérance à la sécheresse et une productivité augmentée en conditions de stress hydrique (*Peleg et al., 2011*). De plus, lors d'événements de stress hydrique, une augmentation de l'expression des gènes associés au métabolisme des CK a été détectée (*Nishiyama et al., 2011*). Les niveaux de zéatine, par exemple, augmentent dans les racines d'*Arabidopsis* sous stress hydrique (*Nishiyama et al., 2011*).

D. Rôle des biostimulants dans la tolérance des plantes à la sécheresse

1. Définitions

Différentes approches existent pour améliorer la tolérance des plantes à la sécheresse mais celle de l'usage des biostimulants émerge comme un outil prometteur.

Diverses définitions ont été avancées pour caractériser ces substances, mettant en lumière leurs fonctions variées et leurs avantages potentiels pour les plantes :

Le terme "biostimulant" a été utilisé pour la première fois dans les années 1990 pour décrire *"des matériaux, autres que les nutriments et les pesticides, qui favorisent la croissance des plantes lorsqu'ils sont appliqués en faibles quantités"* (Kauffman et al., 2007).

L'intérêt pour ces substances a conduit à des descriptions plus détaillées au fil du temps, en soulignant l'aspect d'amélioration de la qualité des cultures et en les décrivant comme des *"substances et/ou des micro-organismes dont la fonction, lorsqu'appliqués aux plantes ou à l'environnement rhizosphérique, est de stimuler les processus naturels pour améliorer/avantager l'absorption des nutriments, l'efficacité des nutriments, la tolérance aux stress abiotiques, la qualité des cultures, et la disponibilité des nutriments dans le sol ou la rhizosphère."* (du Jardin, 2015 ; Yakhin et al., 2017 ; Ricci et al., 2019).

Plus récemment, le règlement de l'Union Européenne 2019/1009 définit les biostimulants de plantes comme *"un produit stimulant les processus nutritionnels des plantes indépendamment de la teneur du produit en éléments nutritifs, ayant pour effet d'améliorer l'état nutritionnel des plantes, leur tolérance aux stress abiotiques et/ou la qualité des récoltes"* (Parlement européen et du Conseil, 2019).

2. Principales catégories des biostimulants et leurs effets sur les plantes

Bien que l'Union européenne ait établi une définition, de nombreux pays, notamment les États-Unis, sont toujours en quête d'une définition réglementaire uniforme pour ces produits. Cette hétérogénéité réglementaire rend difficile l'établissement d'une liste exhaustive et d'une catégorisation précise des substances et micro-organismes concernés. Cependant,

plusieurs classifications majeures ont été établies et sont couramment reconnues par la communauté scientifique, les organismes régulateurs et les différents acteurs du secteur, englobant à la fois des substances et des micro-organismes (*Yakhin et al., 2017*).

a. Organiques

1) Extraits d'algues

Depuis de nombreuses années, les algues ont été valorisées en agriculture comme fertilisants. Néanmoins, ce n'est que récemment que l'on a pris conscience de leurs propriétés biostimulantes, ce qui a poussé le secteur agricole à envisager une utilisation commerciale de leurs extraits et composés, tels que les polysaccharides comme la laminarine, les alginates et les carraghénanes (*Khan et al., 2009 ; Craigie, 2011*). Une grande partie de cette attention est centrée sur les algues brunes, dont les genres principaux sont *Ascophyllum*, *Fucus* et *Laminaria*. Ces algues sont riches en composants qui stimulent la croissance des plantes. Si les algues contiennent des hormones connues, il est intéressant de noter que les effets hormonaux observés pourraient en réalité résulter davantage de la manière dont les extraits d'algues influencent la régulation génique dans les plantes que de leur propre teneur en hormones (*Wally et al., 2013a ; 2013b*). En outre, on attribue aux extraits d'algues des propriétés protectrices face au stress, soutenues par la présence de composés comme des antioxydants (*Calvo et al., 2014*).

2) Protéines hydrolysées et acides aminés

L'hydrolyse chimique et enzymatique de sous-produits agro-industriels conduit à la formation de protéines hydrolysées, un ensemble riche en acides aminés et peptides. Ces sous-produits proviennent autant de résidus végétaux que de déchets animaux, notamment le collagène et les tissus épithéliaux (*Calvo et al., 2014 ; Halpern et al., 2015*). Outre ces procédés naturels, une synthèse chimique permet d'obtenir des composés simples ou mixtes.

Au cœur de ces protéines, nous retrouvons des **Acides Aminés (AA)** spécifiques telle que la proline (*du Jardin, 2015*). D'autres composés notables comprennent les bêtaïnes, les polyamines et les "acides aminés non protéiques", dont les rôles au sein des écosystèmes restent à définir précisément. Parmi eux, la glycine bêtaïne se distingue par ses propriétés anti-stress avérées (*Chen, 2011*).

Les protéines hydrolysées et leurs dérivés exercent un effet marqué sur les plantes. Directement, elles régulent l'absorption et l'assimilation de l'azote, (*Calvo et al., 2014 ; Halpern et al., 2015*). Elles peuvent également fonctionner comme régulateurs de croissance végétale en raison des peptides qu'ils contiennent (*Colla et al., 2014*). De nombreux peptides bioactifs, identifiés dans différentes plantes, présentent des activités similaires à celles des phytohormones (*Kondo et al., 2006*).

Dans la pratique, ces composés confèrent une panoplie d'avantages physiologiques aux plantes, incluant une amélioration de la croissance (*Almadi et al., 2020*), qui est due à la capacité des protéines hydrolysées à faciliter la division cellulaire et à promouvoir un développement plus robuste du système racinaire, l'amélioration de l'absorption des éléments nutritifs (*Ertani et al., 2013 ; Celletti et al., 2020*), ainsi que la stimulation de la floraison (*Colla et al., 2015 ; Polo & Mata, 2017*). De plus, ils renforcent la tolérance de la plante face à diverses contraintes (*Ertani et al., 2009 ; Bavaresco et al., 2020*) tels que le stress thermique, hydrique, salin, ...

3) Substances humiques

Les **Substances Humiques (HS)** représentent une partie essentielle de la matière organique du sol. Elles sont le produit de la décomposition des résidus végétaux, animaux et microbiens, mais résultent aussi des interactions entre ces résidus, l'activité métabolique de la microflore et les racines des plantes. Ces substances sont classées en plusieurs types : humines, acides humiques et acides fulviques, en fonction de leur solubilité et de leur poids moléculaire (*Stevenson, 1994*).

L'application des HS en agriculture a démontré des avantages notables pour la croissance des plantes. *Rose et al. (2014)* ont constaté que les plantes traitées avec les HS enregistrent une hausse du poids sec, avec une augmentation de 22% pour les pousses aériennes et de 21% pour les racines. Cependant, la réponse des plantes à l'application des HS dépend de plusieurs variables, dont la source des HS (*Canellas et al., 2015*). Ces substances peuvent être extraites de matières organiques naturellement humifiées, de composts, de lombricomposts ou de gisements minéraux tels que la léonardite (*Trevisan et al., 2010*). Il existe également des alternatives aux HS naturelles : les "substances de type humique", obtenues à partir de sous-produits agricoles traités chimiquement (*Eyheraguibel et al., 2008*).

Au niveau fonctionnel, les HS jouent un rôle crucial dans la fertilité des sols, influençant leurs caractéristiques physiques, chimiques et biologiques. Ils favorisent la nutrition des racines en améliorant l'absorption des nutriments et en rendant le phosphore plus disponible. *Jindo et al. (2012)* ont également mis en avant un mécanisme essentiel : la stimulation des ATPases de la membrane plasmique, essentielles pour l'absorption des nutriments. En outre, les HS aident à renforcer la résilience des plantes face au stress, en particulier par l'amélioration du métabolisme des phénylpropanoïdes. Ce métabolisme est fondamental pour la production de composés phénoliques, qui jouent un rôle dans la réponse des plantes au stress (*Schiavon et al., 2010 ; Olivares et al., 2015*).

b. Microbiens

Dans les divers écosystèmes, de la rhizosphère à l'atmosphère, les plantes cohabitent et interagissent constamment avec une multitude de microorganismes, incluant les champignons et les bactéries (*Berendsen et al., 2012*). Ces rencontres peuvent varier en nature, allant de relations mutuellement bénéfiques, comme le mutualisme, à des relations plus unilatérales comme le parasitisme (*Lemanceau et al., 2017*).

1) Champignons mycorhiziens

L'un des exemples les plus notables de mutualisme est la symbiose entre les plantes et les champignons formant des mycorhizes. Ces interactions favorisent l'efficacité nutritionnelle, en particulier dans l'absorption du phosphore et d'autres micronutriments. De plus, elles jouent un rôle crucial dans la régulation de l'équilibre hydrique des plantes et offrent une protection contre divers stress biotiques et abiotiques. Ainsi, les mycorhizes sont de plus en plus perçues comme un outil essentiel pour une agriculture durable, permettant de réduire les intrants chimiques tout en préservant la productivité (*Van Der Heijden et al., 2006 ; Hamel, 2007 ; Gianinazzi et al., 2010*).

2) Bactéries

Par ailleurs, les bactéries jouent également un rôle multifonctionnel dans le monde végétal. Qu'elles résident dans le sol, sur la surface des racines ou à l'intérieur des tissus végétaux, ces bactéries peuvent influencer la croissance des plantes de manière profonde. Elles participent aux cycles biogéochimiques, fournissent des nutriments essentiels, renforcent la tolérance

des plantes aux maladies et aux stress, et peuvent même moduler leur morphogénèse. Certaines d'entre elles, comme les bactéries de la famille *Bacillus* ou *Azospirillum*, ont été identifiées comme particulièrement bénéfiques et sont utilisées comme biostimulants dans les pratiques agricoles (Fiorentino et al., 2018 ; Nguyen et al., 2019 ; Rafique et al., 2021).

c. Inorganiques

Les sels inorganiques sont des composés ioniques formés d'anions et de cations (Deliopoulos et al., 2010). Parmi eux, on trouve les phosphites, phosphonates, bicarbonates, silicates, sulfates et nitrates (du Jardin, 2012). De nombreuses recherches ont démontré que le phosphore influe directement sur le métabolisme des plantes, leurs mécanismes de défense et le fonctionnement des stomates (Deliopoulos et al., 2010 ; du Jardin, 2012). Le silicium, quant à lui, présente plusieurs bénéfices pour les plantes. Il renforce la résistance aux champignons, rectifie les déséquilibres nutritifs, atténue la toxicité des métaux et améliore la tolérance aux contraintes abiotiques. De plus, certains de ces éléments sous forme de sels, comme les chlorures ou les silicates, ont été utilisés en tant que fongicides (Deliopoulos et al., 2010).

Ces différentes catégories de biostimulants, sont reconnues pour leur capacité à favoriser la croissance et le développement des plantes, à accroître l'absorption des nutriments, le rendement et la rétention d'eau, tout en améliorant la qualité nutritionnelle des récoltes. Ils prennent une importance grandissante dans l'agriculture d'aujourd'hui, jouant un rôle essentiel pour affiner les aspects moléculaires, cellulaires et phénotypiques des plantes. Un résumé des impacts significatifs de ces biostimulants sur les plantes et le sol est illustrée dans la **Fig. 7**.

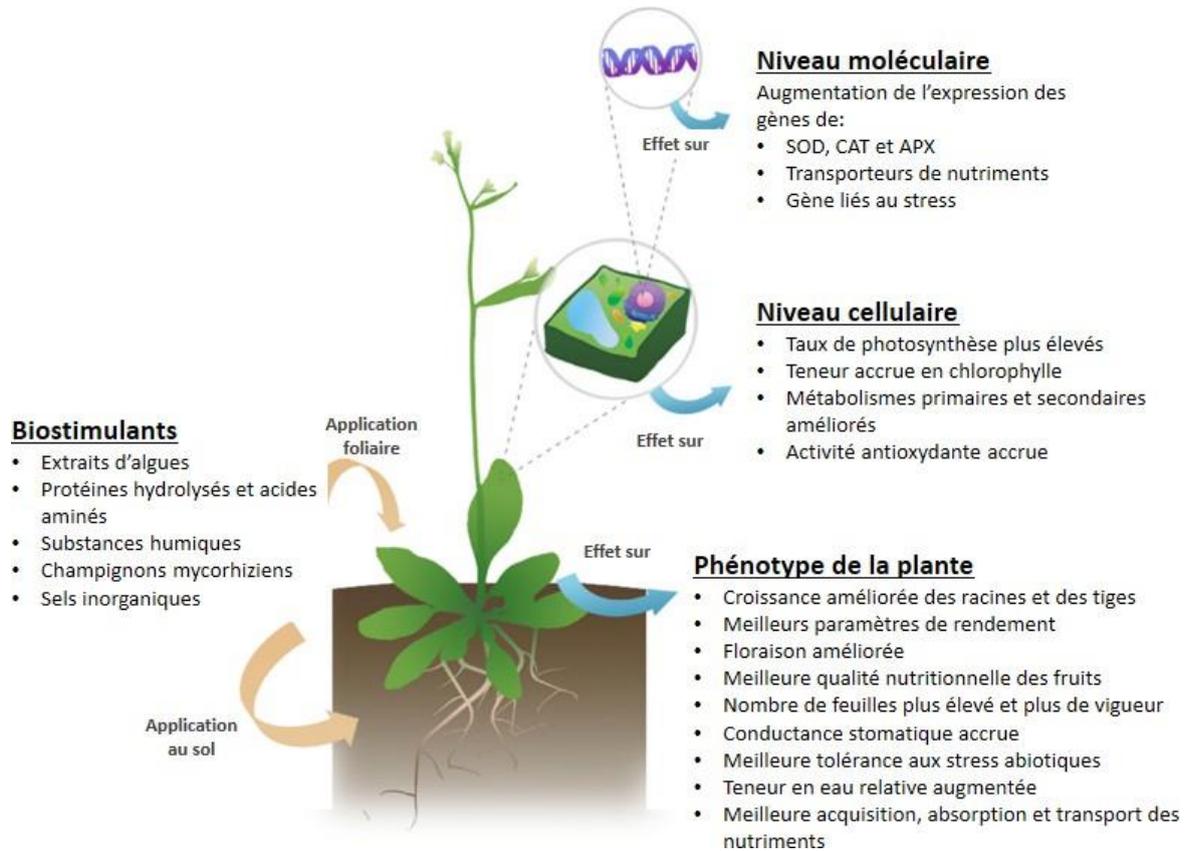


Figure 7. Représentation synthétisée des effets des biostimulants sur les plantes au niveau moléculaire et cellulaire, ainsi qu'au niveau du phénotype de la plante.

SOD désigne la SuperOxyde Dismutase, CAT est la CATalase, et APX fait référence à l'Ascorbate PeroXydase." Ces trois enzymes sont des acteurs clés de la défense antioxydante des plantes. Modifiée d'après (Baltazar et al., 2021).

3. Interconnexions entre l'ABA, les CK et les biostimulants

Bien que les CK soient traditionnellement associées à la promotion de la croissance cellulaire, leur capacité à retarder la sénescence des plantes suggère une augmentation de la tolérance des plantes face à la sécheresse. En effet, il a été démontré que la sénescence des feuilles pouvait être retardée chez les plantes transgéniques exprimant l'IsoPenténylTransférerase (**IPT**), une enzyme qui catalyse l'étape limitante de la synthèse de la CK de type iP (Rivero et al., 2007).

Une étude a démontré que l'initiation du stress entraîne une augmentation rapide (en moins d'une heure) du contenu en ABA, mais une diminution des niveaux endogènes de CK, accompagnée d'une expression réduite des gènes des récepteurs de CK (Dobrá et al., 2015).

Les CK peuvent également retarder la fermeture des stomates induite par l'ABA (*Pospíšilová & Baťková, 2004*). Il a été montré que la kinétine et la zéatine retardent la fermeture des stomates induite par l'ABA sur les jeunes feuilles de maïs (*Blackman & Davies, 1984*). Par ailleurs, les chercheurs ont exploré comment la voie de signalisation ABA interagit avec les CK dans le contexte de la transition florale. Ils ont découvert que l'ABA inhibe la transition florale en régulant à la baisse la signalisation des CK, un processus dans lequel ABI5 (FT essentiel dans la signalisation ABA) joue un rôle important (*Wang et al., 2013*). Ainsi, le maintien d'un équilibre entre ces deux hormones est vital pour assurer un développement végétal harmonieux (*Tran et al., 2007*). À titre illustratif, pendant la maturation des graines, l'ABA induit la dormance alors que les CK stimulent la germination (*Shu et al., 2016*).

La régulation de l'équilibre hormonal des plantes peut être modulée par les biostimulants. *Wani et al. (2016)* montrent que les biostimulants favorisent la production d'ABA, ce qui aide les plantes à tolérer le stress, notamment le stress hydrique, par la fermeture des stomates, réduisant la perte d'eau par transpiration. Par ailleurs, selon *Ertani et al. (2013)*, certains biostimulants peuvent augmenter la biosynthèse des CK chez le maïs exposé à un stress salin, provoquant une stimulation de la croissance des plantes et la mitigation du stress salin.

Les interactions entre l'ABA, les CK et les biostimulants sont complexes et dépendent de nombreux facteurs, y compris le type de plante, les conditions environnementales et le type de stress rencontré. Par exemple, à la suite de l'application de biostimulants, une augmentation des niveaux de CK et une réduction de la concentration d'ABA sont observées, traduisant ainsi une amélioration de la tolérance des plantes à la sécheresse (*du Jardin, 2015 ; Parađiković et al., 2018*). Les inoculats microbiens, qui incluent des bactéries comme les **PGPB (Plant Growth-Promoting Bacteria)** favorisent le développement végétal non seulement par la production d'hormones végétales, incluant les auxines, les CK, les gibbérellines et l'ET, mais également par leur dégradation (*Idris et al., 2007 ; Dodd et al., 2010 ; Bhattacharyya & Jha, 2012*). Plus encore, ces inoculats peuvent réajuster l'équilibre hormonal des plantes (*Belimov et al., 2009*). Ces interactions et modifications sont centrales pour comprendre comment maximiser la croissance des plantes, leur santé et leur productivité.

En somme, en agissant à l'interface entre l'ABA et les CK, les biostimulants peuvent affiner la réponse de la plante aux divers défis environnementaux, confirmant leur rôle à jouer dans l'agriculture contemporaine.

E. Mécanismes de perception et de transduction du stress osmotique

La transduction du signal implique la transformation d'un signal détecté par la cellule en changements d'expression génique ou en d'autres adaptations cellulaires (Hoch, 2000). Les mécanismes de phosphorylation et de déphosphorylation des protéines figurent parmi les processus régulateurs les plus courants dans les systèmes biologiques et participent aux voies de transmission des signaux à l'intérieur des cellules (Wurgler-Murphy & Saito, 1997). Parmi ces mécanismes de signalisation se trouvent deux voies apparentées et appelés **Two-Component System (TCS)** et **MultiStep-Phosphorelay system (MSP)** (Mira-Rodado, 2019 ; Singh et al., 2021). Le TCS est un mécanisme simple mais profondément efficace, impliquant deux partenaires pour percevoir et transduire le signal (West & Stock, 2001). D'autre part, le MSP, dérivé du TCS, est un système plus complexe qui implique un troisième partenaire intermédiaire, permettant ainsi une transduction du signal plus modulable.

1. Implication du système à deux composantes (TCS)

Le TCS est une des voies de signalisation les plus répandues chez les procaryotes (Mira-Rodado, 2019). Comme l'évoque sa dénomination, ce mécanisme fondamental repose sur deux éléments majeurs : une **Histidine Kinase (HK)** qui joue le rôle de senseur, et un **Régulateur de Réponse (RR)** dont l'action est modulée par l'HK (**Fig. 8**). Sous l'action d'un stimulus, l'HK s'autophosphoryle et transfère son phosphate au RR pour activer les gènes de réponse au stimulus. Le TCS est présent chez les bactéries, mais il est absent chez les métazoaires (Schultz et al., 2000). De nombreuses études ont démontré que ces voies de signalisation étaient impliquées dans la transduction de signaux internes de type hormonal ou azoté impliqué dans des processus de croissance et le développement des bactéries (Bekker et al., 2006 ; Le et al., 2011) ou de signaux environnementaux liés aux stress abiotique ou biotique impliquant notamment des processus de chimiotaxie. De plus, l'expression de nombreux gènes TCS

fluctue en réponse à divers stress environnementaux (Karan et al., 2009 ; Nishiyama et al., 2013).

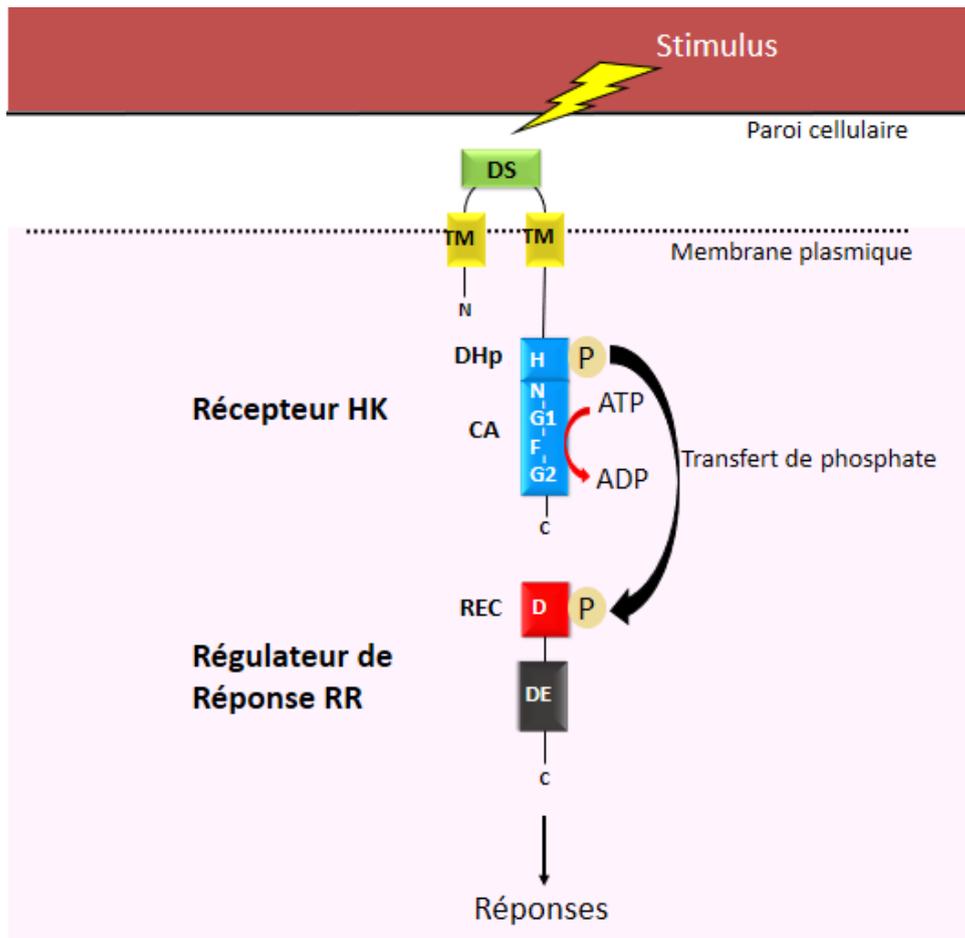


Figure 8. Schéma illustratif du système à deux composants chez les procaryotes.

Le TCS consiste en une **Histidine Kinase (HK)**, fixée à la membrane grâce à deux hélices **TransMembranaires (TM)**, qui détecte les stimuli grâce à un **Domaine Senseur (DS)**. Ensuite, un transfert de phosphate s'opère depuis le résidu histidine du domaine catalytique de l'HK, incluant les domaines DHp et CA et comprenant des séquences hautement conservées (H, N, G1, F et G2), vers le résidu aspartate du domaine **RECEveur (REC)** du **Régulateur de Réponse (RR)**, pour une réponse adaptée orchestrée par le **Domaine Effecteur** du RR (**DE**). Modifiée d'après (Gao & Stock, 2009).

a. Partenaires du système à deux composants des procaryotes

- Les récepteurs HK

Les HK représentent les capteurs primaires de la cascade de signalisation TCS et agissent comme des éléments senseurs (**Fig. 8**). Elles déclenchent la cascade suite à la perception du

signal par un **Domaine Senseur (DS)** présent le plus souvent dans le domaine extracellulaire situé entre deux domaines **TransMembranaires (TM)**.

La super-famille des HK est dotée d'une architecture spécifique comprenant deux domaines conservés dans la partie C-terminale : un domaine **CA**lytique et de liaison à l'ATP (**CA**) en C-terminal renfermant les boîtes N, G1, F, G2, largement conservé et également référencé sous le nom de HATPase-c dans la base de données Pfam (*Finn et al., 2008*) ; et un domaine de **Dimérisation** et de **Phosphotransfert d'Histidine (DHP)**, moins conservé. Ce domaine intègre le résidu **Histidine (His)**, indispensable pour la phosphorylation, alors que le domaine CA conduit l'activité catalytique, transférant un groupe phosphoryl de l'ATP au résidu His. Du point de vue biochimique, les HK catalysent trois types de réaction de transfert de phosphate : leur auto-phosphorylation (de l'ATP au résidu histidine), la phosphorylation du RR (du résidu histidine au résidu aspartate) et la déphosphorylation du RR (sur le résidu aspartate) (*Stock et al., 2000*).

Les HK peuvent être classées en fonction de la localisation de leurs domaines sensoriels, qui peuvent se situer à l'extérieur de la cellule, à l'intérieur, ou directement au niveau de la membrane cellulaire (**Fig. 9**) (*Mascher, 2006 ; Cheung & Hendrickson, 2010*) :

- Les HK qui possèdent des domaines senseurs extracellulaires ou périplasmiques : leur partie senseur est exposée soit à l'environnement externe de la cellule (extracellulaire) soit à l'espace périplasmique chez les bactéries à Gram négatif (périplasmique) (**Fig. 9A**). Ces domaines sont généralement impliqués dans la détection de signaux environnementaux, comme les variations de pH ou de concentration en nutriments (*Stock et al., 2000*).
- Les HK qui possèdent des domaines senseurs cytoplasmiques : ces domaines sont situés à l'intérieur de la cellule et fonctionnent entièrement dans le cytoplasme (**Fig. 9B, C et D**). Ils répondent aux signaux internes à la cellule et peuvent par exemple détecter des changements de paramètres tels que le niveau d'ATP, qui est un indicateur de l'état énergétique de la cellule, ou le potentiel redox, qui est lié au niveau de stress oxydatif (*Gao & Stock, 2009*).
- Les HK qui possèdent des domaines senseurs transmembranaires : ces domaines senseurs sont ancrés ou intégrés dans la membrane cellulaire (**Fig. 9E**). Ils ne sont ni

complètement extracellulaires, ni complètement intracellulaires. Ils peuvent percevoir des modifications directement à la membrane, comme l'étirement ou des variations de tension.

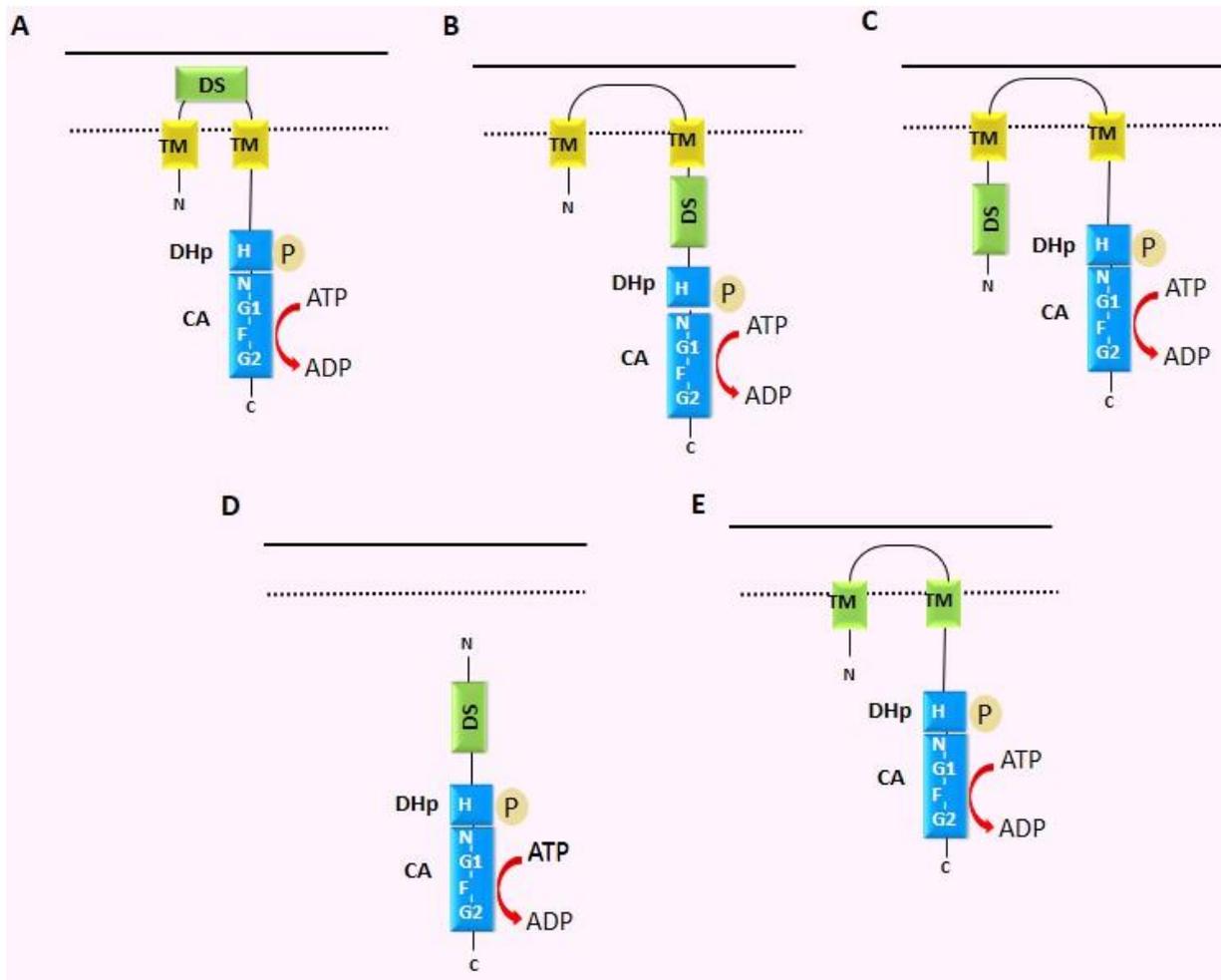


Figure 9. Schéma représentant l'organisation modulaire des histidine kinases chez les procaryotes.

Trois groupes majeurs d'architectures des HK : **A**) le DS est souvent formé en tant que boucle extracellulaire repliée entre les deux TM de l'HK. Le DS cytoplasmique peut être situé en C-terminal ou en N-terminal par rapport aux TM dans l'HK ancrée à la membrane (**B** et **C** respectivement). **D**) Le DS cytoplasmique peut se situer en N-terminal dans l'HK soluble dépourvue de TM. **E**) Le DS peut être intégré à l'intérieur de la membrane, composé d'hélices transmembranaires. Modifiée d'après (Cheung & Hendrickson, 2010).

- Les régulateurs de réponse (RR)

Le second partenaire des TCS correspond aux **Régulateurs de Réponse (RR)** (**Fig. 8**), éléments clé dans la transduction du signal perçu. De façon prototypique, un RR est composé de deux

domaines : un domaine **RE**Ceuvreur N-terminal (**REC**) et un **Domaine** Effecteur (**DE**) variable (*Gao & Stock, 2009*). Le domaine REC, d'environ 120 résidus, peut initier deux actions majeures : recevoir un groupe phosphoryl de l'HK, activant ainsi le régulateur, et également se déphosphoryler, mettant ainsi fin à la signalisation (*Casino et al., 2009 ; Gao & Stock, 2009*). Suite à sa phosphorylation, le domaine REC peut subir un changement conformationnel, potentiellement renforçant l'interaction du DE avec d'autres molécules (*Galperin, 2010*). Ce dernier, quant à lui, est responsable de l'activation de la réponse et sa diversité offre au TCS une grande gamme de réponses possibles (*Stock et al., 2000*). La fonction spécifique du DE dépend de la nature spécifique de la protéine RR dans laquelle il se trouve. Cependant, en général, il peut se lier à l'ADN et affecter l'activité transcriptionnelle en activant ou en désactivant des gènes (*Stock et al., 2000*). Il peut également interférer avec d'autres composants cellulaires pour apporter des changements métaboliques ou structuraux (*Galperin, 2006*).

b. Cas typique de systèmes à deux composantes chez les bactéries

La diversité des TCS chez les bactéries est remarquable. Il existe plus de 30 TCS différents identifiés chez *E. coli*, illustrant la variété des signaux environnementaux que ces bactéries doivent surveiller pour survivre et se reproduire efficacement (*Gao & Stock, 2009*). Certaines estimations suggèrent que le nombre de TCS pourrait s'élever à plusieurs centaines chez certaines espèces bactériennes, démontrant ainsi l'importance cruciale de cette forme de signalisation pour l'adaptation bactérienne. Cette variété se reflète non seulement dans la détection de différents signaux, mais également dans les régulations géniques distinctes qu'ils orchestrent. Parmi ces nombreux TCS, trois TCS emblématiques chez les bactéries sont présentés ci-dessous : EnvZ/OmpR, CheA/CheY et ArcB/ArcA (**Fig. 10**).

1. Voie de signalisation EnvZ/OmpR : Régulation de la réponse osmotique chez les bactéries

Ce système est activé en réponse à des changements d'osmolarité. EnvZ, l'HK senseur, détecte des variations de l'osmolarité environnante et s'autophosphoryle puis transfère le phosphate à OmpR, son RR. OmpR phosphorylé provoque des modifications de l'expression des gènes OmpF ou OmpC pour permettre à la bactérie de s'adapter aux conditions osmotiques (*Hsing*

& Silhavy, 1997). Des données plus récentes montrent que la perception serait en fait réalisée principalement par le domaine cytoplasmique (Foo et al., 2015).

2. Voie de signalisation CheA/CheY : Contrôle de la mobilité bactérienne via la régulation flagellaire

Ce système régule la motilité bactérienne en réponse à des stimuli chimiques. CheA est une HK senseur associée à des récepteurs chimiotactiques. Suite à la détection de composés chimiques spécifiques, CheA s'autophosphoryle puis transfère le phosphate à CheY qui agit sur les moteurs flagellaires, modifiant le comportement de nage ou de tournoiement de la bactérie pour se déplacer vers ou loin de la source de stimulus (Bren & Eisenbach, 2000).

3. Voie de signalisation ArcB/ArcA : Régulation de la respiration cellulaire

Ce système est impliqué dans la détection de l'oxygène. Sous des conditions faibles en oxygène, l'HK senseur ArcB s'autophosphoryle et transfère le phosphate à son RR, ArcA. Une fois phosphorylé, il modifie l'expression génique pour permettre à la bactérie de s'adapter aux conditions aérobies/anaérobies (Georgellis et al., 2001).

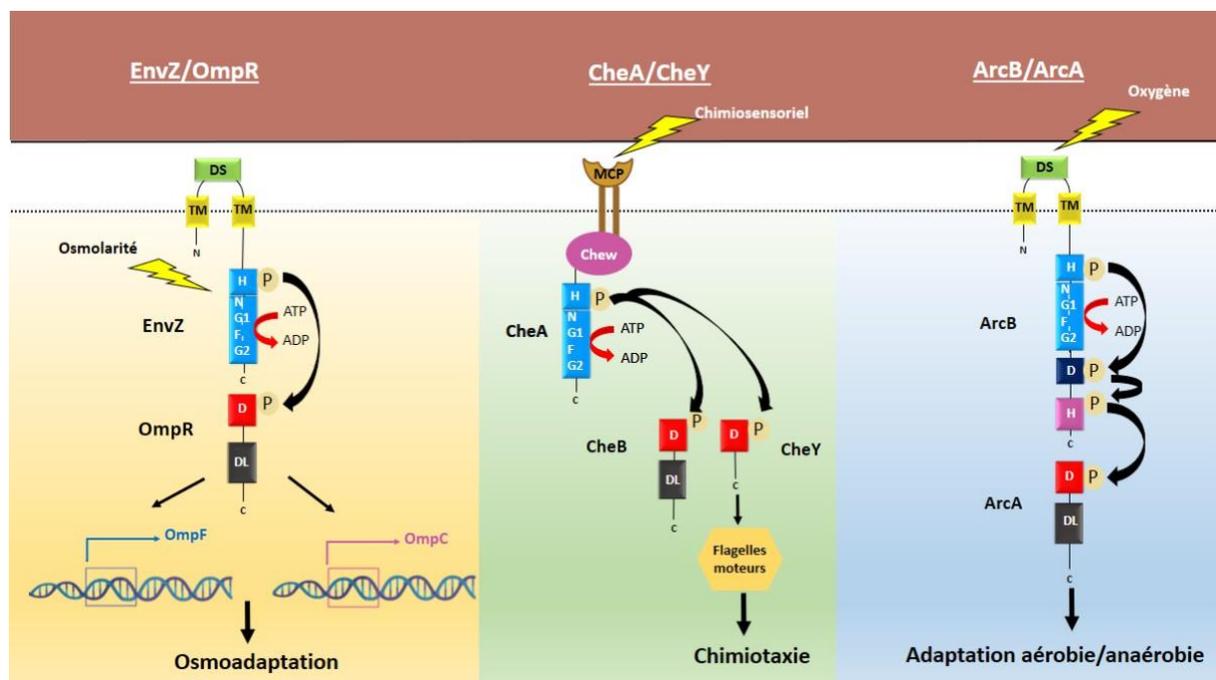


Figure 10. Schéma de trois exemples de système de transduction à deux composants chez les bactéries.

La MCP désigne Methylated Chemotaxis Protein. Modifiée d'après (Wadhams & Armitage, 2004).

2. Implication du système phosphorelais multiple (MSP) chez les eucaryotes

Les MSP représentent un mécanisme de signalisation particulier présent chez les procaryotes et largement utilisé par les eucaryotes. Contrairement aux TCS chez les bactéries, les MSP sont plus complexes chez les eucaryotes du fait de la présence du noyau, impliquant généralement une étape supplémentaire de transfert de phosphate, assurée par les protéines transmetteurs de phosphates à histidine ou **HPt (Histidine-containing Phosphotransmitter)** (Nongpiur et al., 2012). De plus, les HK sont de type hybride, (Histidine-aspartate kinase), possédant à la fois un domaine transmetteur et un domaine receveur de phosphate dans la même molécule (Schaller et al., 2011). Dans les génomes bactériens caractérisés, seulement 20% codent pour des kinases hybrides, tandis que chez les archées, ce chiffre n'est que de 1% (Wuichet et al., 2010).

a. MSP impliqué dans l'osmorégulation chez *Saccharomyces cerevisiae*

Le MSP le plus étudié en ce qui concerne la perception de la contrainte osmotique est celui de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Les variations de l'osmolarité, oscillant entre l'hyperosmolarité et l'hypo-osmolarité, ont conduit cet organisme à développer des stratégies d'osmorégulation pour maintenir son équilibre interne (Posas et al., 1996). Parmi ces stratégies, le glycérol joue un rôle central en tant qu'osmolyte lors des situations d'hyperosmolarité (Reed et al., 1987 ; Hohmann, 2002 ; Saito & Posas, 2012). Sa synthèse est régulée par la voie métabolique **HOG (High Osmolarity Glycerol response)**, qui est une cascade de type MAPK, incluant les kinases SSK2/SSK22, PBS2 et HOG1 (Brewster et al., 1993 ; Hohmann, 2002). Ce dernier régulateur, HOG1, orchestre l'expression de près de 600 gènes, notamment la production du gène **GPD (Glycérol-3-Phosphate Déshydrogénase)** (Albertyn et al., 1994 ; O'Rourke & Herskowitz, 2004). L'accumulation de glycérol permet ainsi à la cellule de retenir l'eau intracellulaire, garantissant son intégrité face à des conditions extérieures défavorables.

Mais comment cette levure perçoit-elle ces changements dans son environnement ? La réponse réside en amont de la voie HOG, où deux protéines osmosenseurs clés, SHO1 et SLN1, entrent en jeu (**Fig. 11**). Ces protéines régulent indépendamment la voie HOG, offrant à la cellule un double mécanisme pour surveiller son environnement osmotique (Posas et al., 1998 ; Reiser et al., 2003). Toutefois, ces deux voies présentent des spécificités en fonction de l'intensité de la contrainte osmotique : là où la voie SLN1 répond à une gamme large d'hyper-

osmolarité, la voie SHO1 est plus sélective (Reiser et al., 2003). En cas de choc osmotique, les osmosenseurs SLN1 s'assemblent rapidement en formant des agrégats bien distribués le long de la membrane. Cependant, les osmosenseurs SHO1 sont associées à la membrane plasmique principalement du côté du pôle de croissance de la cellule et dont la localisation ne change pas en réponse à un tel choc osmotique (Reiser et al., 2003).

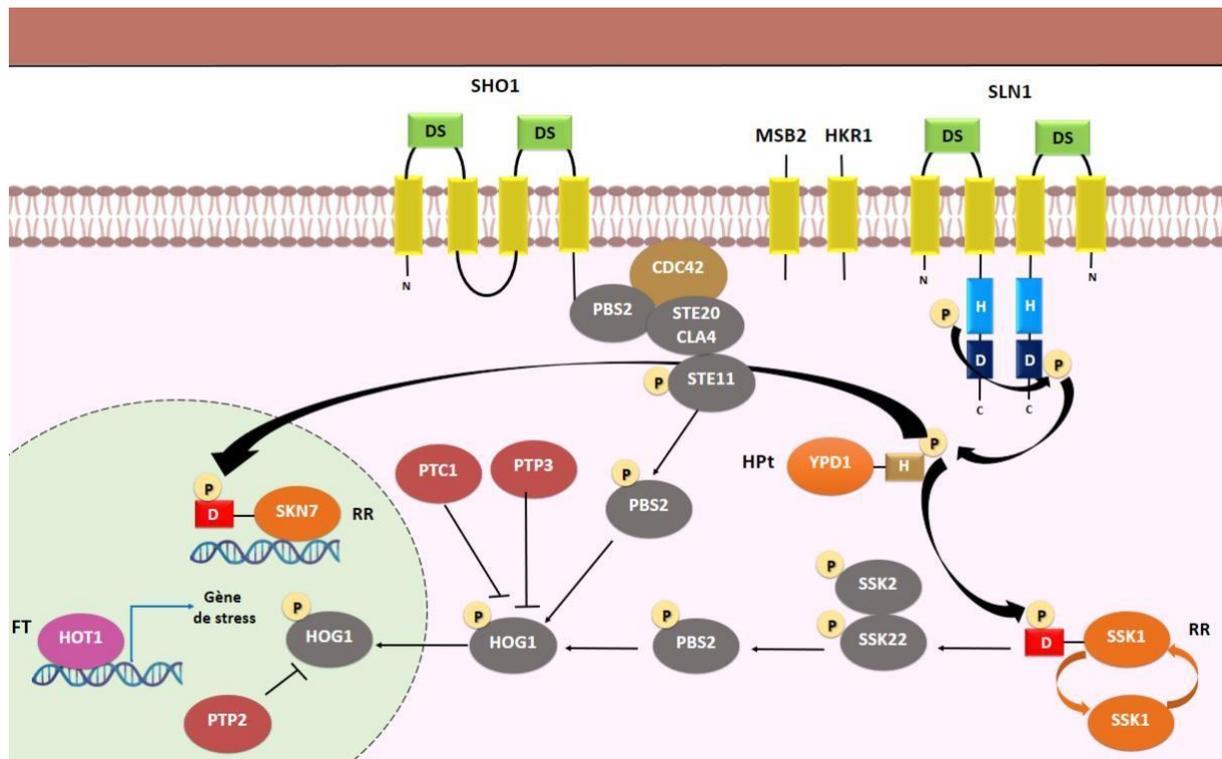


Figure 11. Partenaires clés des voies de signalisation liées aux récepteurs SLN1 et SHO1 chez *Saccharomyces cerevisiae*.

Les osmosenseurs clés dans ces voies sont SLN1, SHO1. MSB2 et HKR1 sont des osmosenseurs putatifs. L'autophosphorylation de SLN1 s'effectue sur le résidu Histidine (H) du domaine transmetteur qui transmet le groupement phosphorylé vers le résidu Aspartate (D) du domaine receveur. Les larges flèches noires représentent le processus de transfert de phosphate entre les différents éléments du MSP. Les flèches noires plus fines illustrent les phosphorylations effectuées par les kinases. Enfin, une flèche d'inhibition dépeint l'activité phosphatase. (Miermont et al., 2011).

- Perception du changement de l'osmolarité par l'osmosenseur SLN1

L'osmosenseur SLN1 contrôle la voie MSP et comprend deux domaines transmembranaires, encadrant un domaine extracellulaire (ECD) en N-terminal. Il dispose également d'un domaine cytoplasmique, qui se subdivise en un **Domaine Transmetteur (TD)** pour

l'autophosphorylation et un domaine **Receveur (Rec)** en C-terminal. Ceci fait de SLN1 une HK hybride, et constitue le premier élément d'un phosphorelais multiple impliquant également les protéines : **YPD1 (TYROSINE Phosphatase Dependent 1)**, qui est une HPT et **SSK1 (Suppressor of Sensor Kinase 1)**, qui est un RR phosphorylant HOG dernière kinase de la cascade MAPKinase (*Maeda et al., 1994 ; Posas et al., 1996 ; 1998 ; Saito & Posas, 2012*).

Sous des conditions normales ou de faible osmolarité, SLN1 a une activité kinase basale, nécessaire à la viabilité des levures (*Lu et al., 2003*). Cette activité kinase nécessite la dimérisation de SLN1, et la transphosphorylation de chaque monomère (*Posas et al., 1996*). Cette dimérisation s'effectue grâce au domaine de type DHp présent entre le second TM et le TD. SLN1 autophosphorylé, transfère le groupement phosphate à l'HPT YPD1, qui le transfère à son tour au RR SSK1, ce qui entraîne l'inactivation de ce dernier. Cette inactivation est cruciale pour la survie cellulaire (*Lu et al., 2003*). L'inactivation de SSK1 conduit à la désactivation de la voie HOG régulatrice de la production de glycérol. *Lu et al. (2003)* ont montré que la protéine YPD1 peut se déplacer dans le noyau pour aller phosphoryler un second RR, SKN7, puis retourner dans le cytoplasme.

En situation d'hyper-osmolarité, l'autophosphorylation de SLN1 est réduite devenant alors inactif, ce qui conduit à l'accumulation de SSK1 non phosphorylé. Cela active les premières **MAP Kinase Kinase Kinase (MAPKKK)** de la voie HOG qui sont SSK2/SSK22 et, en conséquence, la seconde **MAP Kinase Kinase (MAPKK)** de la voie HOG *via* la kinase PBS2, qui elle-même activera la MAPK HOG1 (*Maeda et al., 1994 ; Posas et al., 1998*).

Dans certaines souches mutantes où SSK1 ne peut pas être phosphorylée, la voie HOG devient constitutivement active, même en l'absence de stress osmotique, ce qui s'avère létale pour la cellule (*Maeda et al., 1994 ; Posas et al., 1996*).

- *Perception du changement de l'osmolarité par SHO1*

La voie SHO1 est contrôlée par les osmosenseurs putatifs transmembranaires MSB2p et HKR1p, fortement glycosylés (*Tatebayashi et al., 2007*). Initialement considérée comme un osmosenseur, des études indiquent que SHO1 sert plutôt à recruter d'autres protéines pour la transduction du signal osmotique (*Krantz et al., 2006*). SHO1 possède quatre domaines transmembranaires et un domaine SH3 cytoplasmique qui se lie à PBS2 (*Posas et al., 1998*).

En cas de stress hyper-osmotique, PBS2 est recrutée à la membrane et s'associe aux kinases STE20 et CLA4 ainsi qu'à STE11. Après phosphorylation par STE20/CLA4, STE11 active PBS2, qui à son tour active HOG1 (**Fig. 11**) (Saito & Posas, 2012).

b. MSP chez *Arabidopsis thaliana*

Chez les plantes, c'est chez *Arabidopsis thaliana* que les composants fondamentaux du MSP ont d'abord été identifiés. Puis, ce système a été exploré dans un plus grand éventail d'espèces végétales comme : *Physcomitrella patens* (Ishida et al., 2010), *Zea mays* (Yonekura-Sakakibara et al., 2004), *Oryza sativa* (D'Agostino & Kieber, 1999 ; Pareek et al., 2006), *Rumex palustris* (Sakakibara et al., 2000), *Populus* (Bertheau et al., 2012; 2013; 2015 ; Héricourt et al., 2013 ; 2016 ; 2019 ; Chefdor et al., 2018 ; Djeghdir et al., 2021), *Catharanthus roseus* (Papon et al., 2002), et *Lotus japonicus* (Ishida et al., 2009), ...

1) MSP impliqué dans la réponse aux cytokinines

- Les récepteurs aux CK

Les trois récepteurs aux CK de type HK spécifiques d'*Arabidopsis* **AHK2**, **AHK3** et **AHK4/CRE1/WOL** ont été isolés et caractérisés en 2001 (Inoue et al., 2001 ; Suzuki et al., 2001 ; Ueguchi et al., 2001 ; Yamada et al., 2001). Ces récepteurs possèdent un domaine de perception des CK appelé **CHASE** (Cyclase/Histidine-kinase Associated Sensory Extracellular domain). L'identification de ces récepteurs a été précédée par la découverte des récepteurs Cytokinine Indépendant **1 et 2 (CKI1 et CKI2/AHK5)**, qui fonctionnent indépendamment des CK. L'observation de l'expression du gène CKI1 dans les parties aériennes de la plante comme les siliques, les fleurs et les tiges (Hejátko et al., 2009 ; Deng et al., 2010) indique son implication potentielle dans le développement de ces structures chez *Arabidopsis* (Pischke et al., 2002 ; Hejátko et al., 2003 ; 2009 ; Deng et al., 2010). CKI2/AHK5 a été démontré comme régulant la fermeture des stomates en réponse à H₂O₂ et à d'autres stimuli dépendant de H₂O₂ (Desikan et al., 2008 ; Mira-Rodado et al., 2012).

Chaque récepteur aux CK a des spécificités qui lui sont propres. Par exemple, AHK4/CRE1/WOL est connu pour son implication dans la régulation de la division cellulaire et la morphogénèse racinaire, tandis qu'AHK2 et AHK3 sont davantage associés à la régulation de la croissance et du développement des parties aériennes de la plante (Higuchi et al., 2004 ; Nishimura et al.,

2004). Ces récepteurs peuvent également avoir des rôles dans la réponse au stress abiotique (Zwack & Rashotte, 2015 ; Li et al., 2016 ; Pavlů et al., 2018). En effet, il a été démontré que l'expression des récepteurs AHK2 et AHK3 est stimulée par la sécheresse ainsi que par les stress salins et osmotiques, suggérant une sensibilité renforcée aux cytokinines dans ces situations (Zwack & Rashotte, 2015).

- Les protéines HPt

Chez Arabidopsis, il existe cinq authentiques **AHP** (**A**rabidopsis **H**istidine containing **P**hosphotransfer), qui possèdent dans leur séquence le résidu histidine conservé accepteur de phosphate donné par le récepteur : AHP1 à AHP5 (Miyata et al., 1998 ; Suzuki et al., 2000). AHP6 est une pseudo-HPt présentant une mutation du résidu histidine en résidu asparagine (Suzuki et al., 2000) mais pour autant joue un rôle inhibiteur dans la voie CK permettant la formation du protoxylème chez Arabidopsis (Mähönen et al., 2006). La structure complète des HPt est connue depuis que les cristaux des protéines HPt du maïs, ZmHP1 et ZmHP2 ont été obtenus (Sugawara et al., 2005a ; 2005b). Elles possèdent une localisation nucléocytoplasmique. AHP2, AHP3 et AHP5 sont largement exprimés dans une variété de tissus et d'organes tels que les racines, les tiges, les feuilles et les inflorescences (Mähönen et al., 2006).

Les AHP jouent un rôle important dans la régulation de la réponse au stress hydrique chez *A. thaliana*. Des études ont montré que les trois HPt, AHP2, AHP3 et AHP5 agissent comme des régulateurs négatifs de cette réponse (Nishiyama et al., 2013) alors qu'elles agissent comme des régulateurs positifs dans la réponse aux CK (Hutchison et al., 2006).

- Les régulateurs de réponse RR

Ces protéines sont caractérisées par le domaine DDK (aspartate, aspartate, lysine), qui est également conservé dans les RR de bactéries et de levures. Le deuxième résidu aspartate sert de site de réception pour le phosphate transféré depuis les HPt. Une fois phosphorylés en ce site, ces RR subissent des changements conformationnels qui permettent la transduction du signal (Schaller et al., 2011). Il existe quatre types de RR chez *A. thaliana* : RR-A, RR-B, RR-C et Pseudo-RR (**Fig. 12**) :

Chez Arabidopsis, les RR-A sont encodés par un ensemble de 10 gènes, spécifiquement ARR3 à ARR9 et ARR15 à ARR17 (*Schaller et al., 2008*). Ces protéines sont induits par les CK et sont des régulateurs négatifs rapides de la signalisation des CK (*To et al., 2004*).

Les RR-B sont au nombre de 11, identifiés comme ARR1, ARR2, et ARR10 à ARR14, ainsi qu'ARR18 à ARR21 (*D'Agostino et al., 2000*). Ces protéines possèdent un domaine **GARP** (**Golden/ARR/Psr1**), qui est un domaine Myb-like de liaison à l'ADN, un domaine de trans-activation et un signal de localisation nucléaire VRK (R/K) à leur extrémité C-terminale (*Hwang & Sheen, 2001 ; Sakai et al., 2001 ; Imamura et al., 2003*). Ces RR sont des facteurs de transcription qui activent l'expression de gènes cibles (*Mason et al., 2005*).

Les RR-C sont représentés par les RR22 et 24 chez Arabidopsis (*Pils & Heyl, 2009*). Comparativement moins étudiés, ces RR, non induits par les CK les distinguant ainsi des RR-A, semblent avoir des fonctions divergentes et pourraient être impliqués dans la réponse aux stress abiotiques (*Kang et al., 2013*).

Les **Pseudo-RR (PRR)** sont semblables aux RR mais ne possèdent pas le motif consensus receveur de phosphate, ce qui les rend incapables de recevoir un phosphate (*Mizuno, 2004*). En effet, le résidu aspartate phosphorylable et normalement conservé est remplacé par un résidu glutamate, glutamine ou asparagine au sein de ces RR (*Hwang et al., 2002*). PRR3, 5, 7 et 9 ont déjà été identifiés comme impliqués dans le mécanisme moléculaire de l'horloge circadienne (*Strayer et al., 2000 ; Matsushika et al., 2002*).

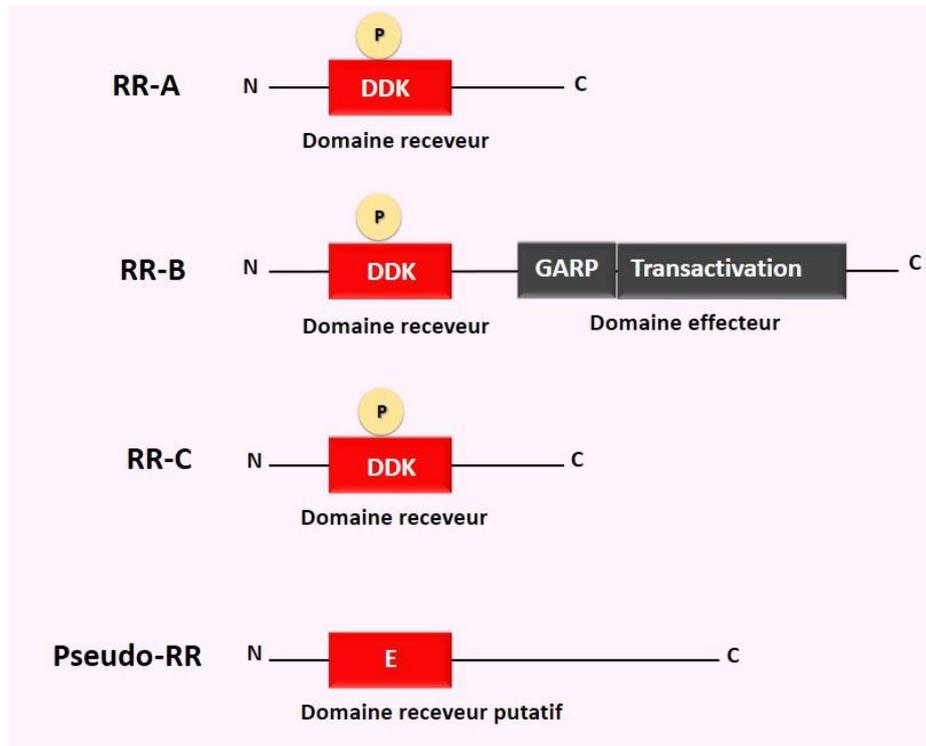


Figure 12. Représentation schématique des régulateurs de réponse chez *Arabidopsis thaliana* : RR-A, RR-B, RR-C et pseudo-RR.

Les résidus d'aspartate (D) phosphorylés et de lysine (K) sont spécifiés, ainsi que le glutamate non phosphorylé (E). Modifiée d'après (Gupta & Rashotte, 2012).

2) MSP impliqué dans la réponse au stress osmotique

- Le récepteur AHK1

La découverte de protéines HK senseurs pour la perception de l'éthylène ou des CK dans les plantes supérieures, ainsi que le rôle de l'HK SLN1 en tant qu'osmosenseur chez la levure, ont conduit à la proposition que des HK pourraient également jouer un rôle dans la perception de changements d'osmolarité dans les plantes. Le récepteur d'*Arabidopsis* nommé AHK1 a été proposé en tant qu'osmosenseur (Urao *et al.*, 1999). Il comprend deux domaines transmembranaires encadrant un domaine extracellulaire, ainsi qu'un domaine donneur de phosphate contenant un résidu histidine conservé et un domaine receveur de phosphate contenant un résidu aspartate conservé. Il a été démontré, grâce à des expériences de complémentation fonctionnelle, que des levures mutées pour les récepteurs SLN1 et SHO1 sont capables de croître en condition d'hyper-osmolarité lorsqu'elles expriment la protéine AHK1 (Urao *et al.*, 1999). *In planta*, en conditions d'osmolarité normale, l'analyse de

l'expression des transcrits de ce récepteur montre que les transcrits *AHK1* sont plus abondants dans les racines que dans les autres tissus. De plus, leur expression s'accroît lors d'un stress hyperosmotique (Urao *et al.*, 1999). Des études de gain et de perte de fonction chez *Arabidopsis* ont démontré que *AHK1* agit comme un régulateur positif de la réponse au stress hydrique et au stress salin (Tran *et al.*, 2007). De plus, il a été montré qu'*AHK1* régule l'expression de gènes liés au stress osmotique chez *Arabidopsis* ainsi que la densité stomatique (Kumar *et al.*, 2013).

- Les protéines HPT

Des recherches ont été menées pour élucider le rôle des protéines AHP dans la réponse de la plante aux stress abiotiques comme le froid et la sécheresse. Il a été observé que le triple mutant *ahp2, 3, 5* affiche une meilleure résistance à la sécheresse (Nishiyama *et al.*, 2013). Ces résultats aboutissent à la mise en évidence que ces AHP agissaient de manière coordonnée comme des régulateurs négatifs de la réponse des plantes à la sécheresse. De plus, les travaux d'Urao *et al.* (1999) montrent une interaction entre la protéine *AHK1* et *AHP2* en utilisant la méthode du double-hybride dans la levure.

- Les régulateurs de réponse RR

Les recherches sur l'implication des ARR dans la gestion du stress hydrique par *Arabidopsis thaliana* sont relativement limitées. Cependant, quelques études ont mis en lumière des liens spécifiques. Par exemple, l'ARR18 s'est révélé être un activateur positif dans la réponse au stress hydrique, montrant une expression accrue en réponse à une application de PolyÉthylène Glycol 6000 (PEG6000) à une concentration de 10% (Veerabagu *et al.*, 2014). D'autre part, les ARR1, 10 et 12 ont été identifiés comme des régulateurs négatifs dans la réponse à la sécheresse. De plus, l'ARR22 a été associé à une amélioration de la tolérance à la sécheresse en contribuant à la stabilisation de la membrane plasmique (Kang *et al.*, 2013).

c. Synthèse des recherches sur la voie MSP chez le peuplier

Au sein du Laboratoire de Physiologie, Ecologie et Environnement, anciennement LBLGC et tout récemment renommé (P2E), notre équipe "Signalisation Cellulaire" se focalise sur la compréhension des mécanismes de perception et de transduction de la contrainte hydrique chez le peuplier. La fonction d'osmosenseur de l'HK de levure (SLN1) et celle d'*Arabidopsis*

(AHK1) a conduit l'équipe à se focaliser sur l'étude de l'implication d'un tel phosphorelais dans la perception de la sécheresse chez le peuplier.

Dans ce contexte, notre équipe a identifié un récepteur nommé HK1, présentant une grande similarité avec AHK1 d'*Arabidopsis* (Chefdor *et al.*, 2006). Une augmentation de l'expression de *HK1* au niveau racinaire a été montrée, cinq minutes seulement après l'application d'une contrainte osmotique. Ce résultat renforce l'hypothèse du rôle de HK1 en tant qu'osmosenseur chez le peuplier. De plus, quatre HPt (HPt1-4) ont également pu être isolées et l'interaction entre HK1 et HPt2 a été démontrée (Chefdor *et al.*, 2006).

Par la suite, il a été démontré que l'expression de la protéine HK1 de peuplier dans des souches de levures déficientes en osmosenseurs *SLN1* et *SHO1* permet leur survie en conditions d'hyper-osmolarité validant ainsi la fonctionnalité de la voie de signalisation par complémentation de la voie MSP dans la levure osmodéficente (Héricourt *et al.*, 2013). Un total de 10 HPt (HPt1-10) ont été isolées et trois présentent un partenariat privilégié avec HK1 (Bertheau *et al.*, 2013).

Plus récemment, un second récepteur HK1 appelés HK1b a été identifié (Héricourt *et al.*, 2016). Celui-ci présente 96% de similitude avec le premier HK1, renommé HK1a, et présente une fonction d'osmosenseur lors d'un essai de complémentation fonctionnelle dans la même souche osmodéficente (Héricourt *et al.*, 2016). De façon intéressante, ce travail a permis de montrer une divergence fonctionnelle entre HK1a et HK1b.

Enfin, une analyse complète du réseau d'interaction entre les trois HK CK de peuplier avec les 10 HPt a permis de définir certaines HPt comme spécifiques de la voie CK et d'autres comme étant partagées entre la voie CK et la voie osmosensing (Héricourt *et al.*, 2019). Ce résultat pose l'hypothèse d'une possible balance entre les deux voies pour la survie en condition de stress.

Pour les derniers partenaires de cette voie, des travaux ont permis d'isoler neuf RR-B (Bertheau *et al.*, 2012 ; 2015) et dix RR-A (Chefdor *et al.*, 2018). Des études d'interaction par la technique double-hybride ont démontré que six RR-B et huit RR-A interagissent avec les trois HPt (HPt2, 7 et 9) constituant les partenaires privilégiés de HK1a/b. Ces résultats ont donc permis de mettre à jour l'ensemble des acteurs du MSP potentiellement lié à l'osmosensing

chez le peuplier. Enfin, une étude menée par *Djeghdir et al. (2021)* a révélé l'homodimérisation et l'hétérodimérisation de tous les RR-B mais l'absence de l'hétérodimérisation pour certaines paires RR-B, suggérant que la spécificité du signal pour le stress osmotique pourrait être en partie attribuée à l'incapacité de certains RR-B à former des hétérodimères.

F. Objectifs de la thèse

Dans le contexte climatique actuel, marqué par des défis tels que la sécheresse et la nécessité de préserver les ressources en eau, les biostimulants se révèlent être une solution prometteuse pour soutenir l'agriculture. Forts de notre connaissance sur les mécanismes de réaction au stress, notamment *via* la voie MSP, le projet ProBioSec a été créé pour développer des biostimulants capables d'améliorer la résilience des plantes face à la sécheresse. Cette thèse a été réalisée dans le cadre de ce projet qui possède un volet fondamental et un volet appliqué. Les deux objectifs principaux de cette thèse sont de caractériser les osmosenseurs du peuplier et d'identifier leur ligand potentiel dans le but de pouvoir développer de nouveaux biostimulants destinés à augmenter la tolérance des plantes à la sécheresse. Mon travail de thèse a porté principalement sur le volet fondamental avec deux grandes parties :

- Caractérisation fonctionnelle des domaines de deux récepteurs de peuplier. Cette étape a fait appel à deux approches complémentaires : une approche génétique, qui a consisté à créer des mutants du domaine "senseur" et à tester leur fonctionnalité, et une approche biochimique, qui a impliqué la production et la purification du domaine "senseur" pour une analyse structurale par cristallographie.
- Identification des ligands de ces récepteurs. Pour ce faire, une approche aléatoire par criblage a été utilisée pour tester divers extraits de peuplier, principalement foliaires, dans un système rapporteur fluorescent d'osmosensing spécialement conçu pour ce projet. En complément, une approche ciblée par criblage de molécules candidates a été réalisée.

Pour la partie appliquée, des tests sur plante pour évaluer la capacité des extraits foliaires sélectionnés à améliorer la tolérance à la sécheresse ont été réalisés sur plusieurs espèces de plantes.

Ce manuscrit de thèse s'organise donc sous la forme de deux grandes parties. La première partie est composée de deux chapitres, dont le premier correspond à un article publié. La deuxième partie est composée également de deux chapitres dont un fait l'objet d'une publication en cours de préparation.

MATERIELS ET METHODES

A. Matériels

1. Matériels biologiques

a. Souches de bactéries

Trois souches spécifiques d'*Escherichia coli* sont utilisées :

La souche DH5 α , obtenue auprès de New England Biolabs, dont le génotype est fhuA2 Δ (argF-lacZ) U169 phoA glnV44 Φ 80 Δ (lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17. Cette souche est employée pour les transformations bactériennes, permettant ainsi d'obtenir des plasmides en grande quantité.

Lors des tests de production des protéines recombinantes HK1a ECD et HK1b ECD, nous avons utilisé la souche BL21 également obtenue de New England Biolabs, dont le génotype se caractérise par F-, ompT, hsdSB (rB-, mB-), dcm, gal, λ (DE3).

La souche dérivée Rosetta (Novagen) est utilisée compte tenu de sa capacité à traduire les codons rarement rencontrés chez *E. coli*. Cette dernière propriété est d'autant plus utile dans le cadre de la production de protéines codées par des gènes eucaryotes.

b. Souches de levures

La souche de levure MH1354 (MAT α ura3-52 leu2D1 trp1D62 his3D200 sho1::hphNT1 sln1::LEU2 + pGP22) est utilisée dans toutes les expériences de criblage.

La souche de levure MH179 (ura3 leu2 his3 sln1 :: LEU2 sho1 :: TRP1 + pGP22, avec pGP22 : GALp-PTP2/pRS413 (HIS3, CEN)) est utilisée dans les tests de complémentation fonctionnelle.

2. Matériels végétaux

a. Peuplier

Cette étude examine la réponse de neuf génotypes distincts de peuplier à un stress hydrique modéré. Les échantillons proviennent de deux sites expérimentaux différents : le premier est situé à Ardon à l'INRAE d'Orléans et comprend quatre génotypes (**Tab. 2**) :

- Un peuplier pur : *Populus nigra* L. cv. **Jean Pourtet**.

- Un hybride intra-spécifique : *Populus deltoïdes* Bartr. (ex Marsh.) cv. **Dellinois**.
- Un hybride interspécifique Euraméricain : *Populus deltoïdes* Bartr. (ex Marsh.) × *Populus nigra* L. cv. **Koster**.
- Un hybride interspécifique Américano-asiatique : *Populus trichocarpa* Torr & Gray (ex Hook) × *Populus maximowiczii* Henry cv. **Skado**.

Le second site expérimental est à St-Cyr-en-Val et comporte cinq génotypes de type hybride interspécifique (Euraméricain) :

- *Populus deltoïdes* X *Populus nigra* cv. **Dorskamp**
- *Populus deltoïdes* X *Populus nigra* cv. **Flevo**
- *Populus deltoïdes* X *Populus nigra* cv. **I-214**
- *Populus deltoïdes* X *Populus x euramericana* cv. **Triplo**
- *Populus x generosa* X *Populus nigra* cv. **Monviso**

b. Autres plantes

Dans le cadre de cette thèse, des extraits de peuplier sont testés sur trois types de plantes horticoles (fleuries, fruitiers et potagers, **Tab. 3**) et une plante viticole (cépage chenin blanc), afin de tester l'amélioration de la tolérance à la sécheresse. Ces tests visent à évaluer l'efficacité de l'extrait sur le développement de la plante.

- Plantes à fleurs : **Pensées (*Viola x wittrockiana*)**
Rose d'Inde (*Tagetes erecta*)
Nemesia (*Nemesia fruticans*)
- Plante fruitière : **Framboisier (*Rubus idaeus*)**
- Plante potagère : **Tomates (*Solanum lycopersicum*)**

Tableau 2. Caractéristiques et propriétés des différents génotypes de peuplier utilisés dans l'étude.

Génotypes	Parenté	Intérêt	Utilisations potentielles
Jean Pourtet 	<i>Populus nigra</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Utilisé comme peuplier témoin des peuplements naturels <i>Populus nigra</i>. - Adapté aux sols riches et humides, résiste aux inondations et aux maladies communes, croissance rapide. 	<ul style="list-style-type: none"> - Production de bois, stabilisation des sols, plantations riveraines.
Dellinois 	<i>Populus deltoïdes</i> x <i>Populus deltoïdes</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Homologué par le GIS peuplier. - Excellente croissance, adaptabilité aux différents types de sols, tolérance aux inondations. 	<ul style="list-style-type: none"> - Plantations de bois, plantations pour la biodiversité.
Koster 	<i>Populus deltoïdes</i> x <i>Populus nigra</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Le clone le plus vendu en France. - Tolérance aux sols humides, résistance à certaines maladies, croissance rapide. 	<ul style="list-style-type: none"> - Production de bois, restauration des sols, bioénergie.
Skado 	<i>Populus trichocarpa</i> x <i>Populus maximowiczii</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Une durée de saison de croissance plus longue et rapide. - Adapté à une variété de conditions environnementales, potentiel pour la production de biomasse. 	<ul style="list-style-type: none"> - Production de biomasse, production de bois, restauration des habitats.

Tableau 3. *Caractéristiques des plantes modèles utilisées pour les tests des phytoextraits de peuplier.*

Plantes	Caractéristiques
<p>Pensée (<i>Viola x wittrockiana</i>)</p> 	<ul style="list-style-type: none"> - Plante à fleurs ornementale annuelle ou vivace. - Hauteur jusqu'à 20-25 cm. Fleurs de 2-3 cm de diamètre, couleurs variées. - Couramment utilisée en aménagement paysager.
<p>Rose d'Inde (<i>Tagetes erecta</i>)</p> 	<ul style="list-style-type: none"> - Plante à fleurs ornementale annuelle. - Hauteur de 30-120 cm. - Fleurs généralement orange ou jaune.
<p>Nemesia (<i>Nemesia fruticans</i>)</p> 	<ul style="list-style-type: none"> - Plante à fleurs annuelles ou vivaces. - Populaire dans l'industrie ornementale et utilisée comme plante de compagnonnage pour attirer les pollinisateurs. - Hauteur de 30-50 cm. - Fleurs petites mais abondantes, couleurs variées.
<p>Framboisier (<i>Rubus idaeus</i>)</p> 	<ul style="list-style-type: none"> - Plante fruitière vivace. - Sensible à la sécheresse. - Important pour l'industrie fruitière, l'amélioration de la tolérance à la sécheresse peut avoir des implications significatives. - Hauteur de 1,5-2 mètres. - Fruits rouges, noirs, pourpres ou dorés selon la variété.
<p>Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>)</p> 	<ul style="list-style-type: none"> - Plante potagère annuelle. - L'une des cultures légumières les plus largement cultivées. - Sensible à la sécheresse, affectant la qualité et la quantité de fruits. - Hauteur de 1 à 3 mètres. - Fruits de différentes couleurs selon la variété.

3. Milieux de culture

a. Milieux de culture de bactéries

Les milieux de culture **Lysogeny Broth (LB)** et **LB auto-inductible (Tab. 4)** sélectifs pour la croissance des bactéries, sont supplémentés avec des antibiotiques appropriés pour la sélection des souches porteuses de différents vecteurs plasmidiques. L'ampicilline à une concentration de 50 µg/mL, la kanamycine à une concentration de 50 µg/mL et le chloramphénicol à une concentration de 34 µg/mL sont ajoutées, quand la température des milieux est inférieure à 60°C, pour la sélection des bactéries porteuses de plasmides résistant à ces antibiotiques. Le milieu **Super Optimal Broth with Catabolite Repression (SOC, Tab. 4)** est utilisé pendant les transformations bactériennes. Le milieu LB est stérilisé par autoclavage à 121°C avant utilisation.

Tableau 4. *Composition des milieux de culture bactérienne.*

Milieux de culture	Composition	Concentrations
Milieu LB	Extrait de levure	5 g/L
	Tryptone	10 g/L
	NaCl	10 g/L
	Agar	15 g/L
Milieu LB auto-inductible	Extrait de levure	5 g/L
	Tryptone	10 g/L
	NaCl	10 g/L
	Agar	15 g/L
	MgSO ₄	0,15
	KH ₂ PO ₄	6,8
	Glucose	0,5
	(NH ₄) ₂ SO ₄	3,3
	Na ₂ HPO ₄	7,10
Alpha Lactose	2	
Milieu SOC	Extrait de levure	5 g/L
	Tryptone	20 g/L
	NaCl	10 mM
	KCl	2.5 mM
	MgCl ₂	10 mM
	MgSO ₄	10 mM

b. Milieux de culture de levures

Le tableau 5 résume les caractéristiques et la composition des différents milieux utilisés pour la croissance des levures. Tous ces milieux sont stérilisés par autoclavage à 121°C avant utilisation.

Tableau 5. Composition et caractéristiques des milieux de culture levure.

YNB correspond à **Yeast Nitrogen Base**; **SA** correspond à **Sulfate d'Ammonium** ; **YPD** correspond au milieu **Yeast extract-Peptone-Dextrose** ; **YPGal** correspond au milieu **Yeast extract-Peptone-Galactose** ; **Do** pour **Drop-out** + Agar 20 g/L (milieux solides)

Milieux de culture	Composition	Sélection
YPD	Peptone 20 g/L Extrait de levure 10 g/L Glucose 20 g/L	Aucune sélection, permet la croissance de toutes les levures
YPGal	Peptone 20 g/L Extrait de levure 10 g/L Galactose 20 g/L	Aucune sélection, permet la croissance de toutes les levures, mais active les gènes sous contrôle du promoteur GAL1
-UW+Gal	YNB 1,7 g/L SA 5 g/L Galactose 20 g/L Do -UW 1,92 g/L NaOH 10 M	Sélection double pour les cellules transformées avec des plasmides contenant les gènes URA3 et TRP1
-UW+Glu	YNB 1,7 g/L SA 5 g/L Glucose 20 g/L Do -UW 1,92 g/L NaOH 10 M	Sélection double pour les cellules transformées avec des plasmides contenant les gènes URA3 et TRP1, mais répression de gènes sous contrôle du promoteur GAL1
-U+Gal	YNB 1,7 g/L SA 5 g/L Galactose 20 g/L Do -U 1,92 g/L NaOH 10 M	Sélection pour les cellules transformées avec un plasmide contenant le gène URA3
-U+Glu	YNB 1,7 g/L SA 5 g/L Glucose 20 g/L Do -U 1,92 g/L NaOH 10 M	Sélection pour les cellules transformées avec un plasmide contenant le gène URA3, mais répression de gènes sous contrôle du promoteur GAL1

B. Méthodes

1. Conditions de culture

a. Cultures de bactéries

Les souches de *E. coli* sont cultivées dans du milieu LB liquide à 37°C sous agitation à 250 rpm pour la culture liquide, ou sur des boîtes de Pétri contenant du milieu LB solide (ajout de 20 g/L d'agar) pour l'isolement des colonies.

b. Cultures de levures

Les souches de levures osmodéficientes MH179 et MH1354 sont cultivées une nuit à 30°C sous agitation à 250 rpm pour la culture liquide, ou pendant 3 à 4 jours sur des boîtes de Pétri contenant du milieu –U ou -UW en présence de la source de carbone galactose/glucose.

2. Méthodes de transformation du matériel biologique

a. Transformation des bactéries par choc thermique

Dix ng d'ADN est ajouté à 50 µL de cellules compétentes (BL21 ou rosetta), et incubées sur glace pendant 30 minutes, puis exposées à 42°C pendant 30 secondes, puis refroidies rapidement sur glace pendant 5 minutes, et incubées à 37°C sous agitation à 250 rpm dans 950 µL de milieu SOC pendant 1h pour permettre la récupération et l'expression du gène de résistance aux antibiotiques. Le volume approprié de transformation est étalé sur des boîtes de sélection LB contenant l'antibiotique approprié.

Pour la sélection d'*E. coli* transformée, l'antibiotique approprié est ajouté au milieu de culture à une concentration spécifiée. Les bactéries sont incubées pendant la nuit (environ 16 h) pour assurer une croissance complète, et une PCR sur colonies de bactérie est effectuée pour vérifier la présence de l'insert.

b. Transformation des levures

La transformation des levures est effectuée conformément à la méthode établie par *Gietz et al. (1995)*. La souche de levure osmodéficiente (MH179 ou MH1354) est pré-cultivée dans le milieu de culture riche YPGal (**Tab. 5**) pendant une nuit à 30°C en agitation constante. Cette pré-culture est diluée à raison de 5 mL/transfo pour obtenir une $DO_{600}=0,25$ puis incubée jusqu'à une $DO_{600}=1$, permettant de démarrer la phase exponentielle optimale pour la transformation. Les cellules sont alors récoltées par centrifugation à 3000 rpm, puis lavées avec de l'eau distillée. Le culot cellulaire est ensuite resuspendu dans une solution d'acétate de lithium (LiAc) à 0,1 M, qui permet la perméabilité cellulaire et par conséquent, l'intégration de l'ADN étranger.

Pour chaque transformation, un mélange comprenant du PEG₃₃₅₀ à 50%, du LiAc à 1 M, de l'ADN carrier à 2 mg/mL, et entre 500 ng et 1 µg de plasmide est soigneusement préparé. 50 µL de levures préparées précédemment sont ensuite incorporés à ce mélange pour chaque transformation qui est ensuite soumis à une incubation de 30°C pendant 30 minutes pour permettre l'action du LiAc sur les cellules, suivie d'un choc thermique à 42°C pendant 20 minutes, qui permet la perforation transitoire des levures pour l'entrée de l'ADN étranger.

Après ces étapes, une centrifugation est effectuée à 7000 rpm pendant 30 secondes pour récolter les cellules transformées. Le culot cellulaire est alors resuspendu dans 200 µl d'eau stérile et déposé sur le milieu adapté à la sélection des cellules transformées. Ces boîtes sont ensuite incubées à 30°C pendant 3 à 4 jours.

3. Réactions de polymérisation en chaîne (PCR)

a. PCR classiques

L'amplification du fragment d'ADN cible est menée à bien grâce à une PCR qui utilise une matrice plasmidique et peut recourir à deux types d'ADN polymérases. La première est une ADN polymérase de basse fidélité, GoTaq®DNA Polymerase (Promega), principalement utilisée pour confirmer la présence des plasmides d'intérêt dans les levures et bactéries transformées. La deuxième est la Q5® High-Fidelity DNA polymerase (New England Biolabs ou NEB), une ADN polymérase de haute-fidélité, utilisée pour l'amplification de l'ensemble des

inserts dans un but de clonage. Les informations détaillées concernant les composants utilisés pour cette réaction ainsi que leurs concentrations finales sont décrites dans le **Tab. 6**.

Tableau 6. *Composition des réactions de PCR utilisant la polymérase GoTaq® ou Q5®. dNTPs pour désoxynucléotides.*

Composants	Volumes	Concentration finale
ADN matrice (5 ng/μL)	1 μL	5 ng
Tampon 5X	10 μL	1x
Mix dNTP (10 mM)	1 μL	0,2 mM
Amorce forward (10 μM)	2 μL	0,4 μM
Amorce reverse (10 μM)	2 μL	0,4 μM
GoTaq (5U/μl) ou Q5 (2U/μL) polymérase	0,3 ou 0,5 μL	1,5 ou 1 U
H2O qsp	50 μL	

Le programme de PCR pour chaque polymérase est détaillé dans le **Tab. 7**.

Tableau 7. *Paramètres du programme de PCR pour la polymérase GoTaq® et Q5®.*

*La température d'hybridation dépend de la composition en base de chaque amorce utilisée.

Étapes	Température GoTaq	Durée GoTaq	Cycles GoTaq	Température Q5	Durée Q5	Cycles Q5
Dénaturation initiale	95°C	2 min	1	98°C	30 sec	1
Dénaturation	95°C	30 sec		98°C	10 sec	
Hybridation*	-	30 sec	30	-	20 sec	25-30
Élongation	72°C	1 kb/min		72°C	1 kb/30 sec	
Élongation finale	72°C	5 min	1	72°C	2 min	1

b. Mutagenèse dirigée par PCR

La mutagenèse dirigée par PCR est employée tout au long de ce travail de thèse pour générer plusieurs mutants des récepteurs HK1 de peuplier (**Fig. 13**). Cette technique a permis de créer à la fois des mutants ponctuels et des mutants par échange de domaines ECD et/ou TM2.

Pour les mutations ponctuelles, des modifications spécifiques sont introduites dans les séquences HK1a et HK1b. Ceci est accompli par PCR utilisant des amorces mutées spécifiques

(Tab. 8). Cela a permis de générer des mutations simples dans le plasmide pGEM-T (Promega, **annexe. 1**). Ensuite, des triples mutants sont obtenus après trois cycles de mutagenèse dirigée, en utilisant les amorces correspondant aux mutations d'intérêt **(Tab. 8)**.

Par ailleurs, des mutations d'échange de domaine ECD et/ou TM2 sont introduites dans les séquences HK1a et HK1b par PCR, toujours en utilisant des amorces spécifiques **(Tab. 8)**. Ces amorces ont permis de générer des mutations dans le domaine ECD et/ou TM2. Pour la création des doubles mutants par échange de domaine, nous avons procédé comme suit : pour HK1b, la séquence mutée est récupérée à partir de levure par PCR, puis clonée dans le vecteur pJET1.2 (ThermoFisher, **annexe. 1**) *via* une simple ligation, générant ainsi le mutant simple par échange de domaine HK1b. Sur cette base, une mutagenèse dirigée est réalisée pour créer le double mutant. Pour HK1a, afin de créer le double mutant par échange de domaine ECD et/ou TM2, la mutation est introduite sur le mutant simple par PCR en utilisant des amorces mutées spécifiques **(Tab. 8)**.

Le produit de chaque PCR est traité avec la T4 polynucléotide Kinase (NEB) en présence de son tampon fourni pour phosphoryler les amorces, ce qui est essentiel pour la ligation ultérieure. Le mélange réactionnel est incubé à 37°C pendant 30 min. Ensuite, l'ADN ligase T4 (New England Biolabs) est utilisée pour ligaturer les brins d'ADN pendant 1h à 25°C, ce qui permet la formation d'un plasmide circulaire. Enfin, l'ADN matrice d'origine est dégradé par l'enzyme DpnI (coupure spécifique de l'ADN méthylé) 1h à 37°C pour assurer que seuls les plasmides mutés seront transformés dans les bactéries (traitement KLD) **(Fig. 13)**.

Tableau 8. *Liste des amorces spécifiques utilisées pour la création de mutants ponctuels et de mutants d'échange de domaine pour HK1a et HK1b.*

Mutants	Amorces	Séquences
HK1a-T324A	HK1a-T324A For HK1a-T324A Rev	CGTAGGTGTTgCTACTGCTCT ACGGCCACGATGCTTTTATTG
HK1a-S304A	HK1a-S304A For HK1a-S304A Rev	CCACTGCTTgCAGCAGCATT TGAATCCGTGTACTTGCTTACTGC
HK1a-K296A	HK1a-K296A For HK1a-K296A Rev	GCAGTAAGCgcGTACACGGAT CACATGCCATGAAGCCACA
HK1a-T324A-S304A	HK1a-S304A For HK1a-S304A Rev	CCACTGCTTgCAGCAGCATT TGAATCCGTGTACTTGCTTACTGC
HK1a3M	HK1a-K296A For HK1a-K296A Rev	GCAGTAAGCgcGTACACGGAT CACATGCCATGAAGCCACA
HK1b-T331A	HK1b-T331A For HK1b-T331A Rev	TGTAGGTGTTgCTACTTCCCTCT ACGGCCACGATGCTTTTATTG
HK1b-Q311A	HK1b-Q311A For HK1b-Q311A Rev	CCTCTGCTTgcAGCAGCATTG TGAATCTGTATACTTGCTTACTGCCAC
HK1b-K303A	HK1a-K303A For HK1a-K303A Rev	GCAGTAAGCgcGTATACAGATTC CACATGCCATGAAGCCACA
HK1b-T331A-Q311A	HK1b-Q311A For HK1b-Q311A Rev	CCTCTGCTTgcAGCAGCATTG TGAATCTGTATACTTGCTTACTGCCAC
HK1b3M	HK1b-K303A For HK1b-K303A Rev	GCAGTAAGCgcGTATACAGATTC CACATGCCATGAAGCCACA
HK1a-ECD1b	HK1ECD For HK1ECD Rev	GCTTCTGGCCTTCGATATGAA GGAATGATGATCACCCCCAC
HK1a-F470C	HK1a-F470C For HK1a-F470C Rev	GGATGTGTCTGCATTTTGATTC GATGACTAGGATACATAGAGATGC
HK1a2M	HK1a-F470C For HK1a-F470C Rev	GGATGTGTCTGCATTTTGATTC GATGACTAGGATACATAGAGATGC
HK1b-ECD1a	HK1ECD For HK1ECD Rev	GCTTCTGGCCTTCGATATGAA GGAATGATGATCACCCCCAC
HK1b-C478F	HK1b-C478F For HK1b-C478F Rev	TGGATGTGTCTTCATTTTGATTC TTAGTGAGAATCAAATGCAGAC
HK1b2M	HK1b-C478F For HK1b-C478F Rev	TGGATGTGTCTTCATTTTGATTC TTAGTGAGAATCAAATGCAGAC

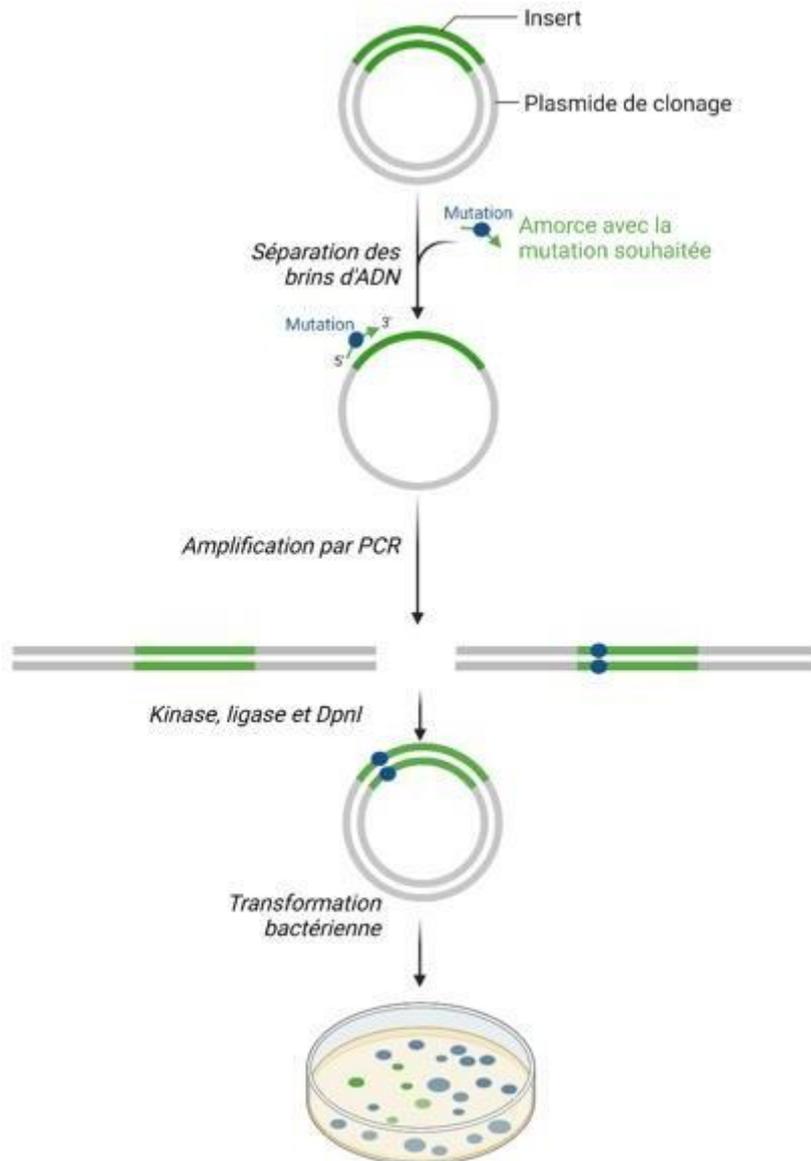


Figure 13. Schéma du principe de la mutagénèse dirigée par PCR.

c. PCR pour réactions de séquençage

Le séquençage a été réalisé par la société Eurofins Genomics selon le principe de terminaison de chaîne par incorporation de didésoxynucléotides marqués par des fluorochromes (d'après Sanger *et al.*, 1977). La concentration des ADN plasmidiques purifiés est ajustée à 50-100 ng/ μ L, tandis que les produits PCR purifiés sont à 10 ng/ μ L, comme requis par le prestataire. Les oligonucléotides utilisés pour le séquençage sont présentés dans le **Tab. 9**.

Tableau 9. *Liste des amorces utilisées pour le séquençage.*

Amorces	Objectif	Séquences
pYXFor	Séquençage des différents mutants des récepteurs HK1a et HK1b	TGTTTGTATTCTTTTCTTGCTT
pYXRev		CATTAATACTAGGAACAAGAGA
HK1bInt5-1		GCTTCATGGCATGTGGCAGT
S5		ACTCCGCCAGAGTTGTTT
pGBKDelseq5	Séquençage de la construction du système rapporteur	CAAAAATGCTAAGAAATAGG
pGBKDelseq3		CACTTTAAAATTTGTATACAC
T7prom	Séquençage des constructions protéiques clonées dans pET28/32a	TAATACGACTCACTATAGGG
T7term		GCTAGTTATTGCTCAGCGG

d. PCR sur colonies

Pour valider la présence des inserts d'intérêt introduits dans les bactéries ou les levures transformées, une amplification de l'ADN à partir des cellules issues de colonies suspectées de contenir l'insert a été réalisée. L'analyse des produits de la PCR par électrophorèse sur gel d'agarose a permis ensuite de confirmer la présence et la taille correcte de l'insert.

1) Bactéries

Lors de l'analyse des colonies bactériennes, une petite fraction de la colonie est prélevée avec une pointe de pipette stérile et placée au fond du microtube de PCR. Le mélange complet de réaction de la PCR est ensuite ajouté. L'ADN est alors libéré grâce à l'étape initiale de dénaturation à 95°C pendant 2 minutes qui lyse les bactéries. Ensuite, les cycles sont effectués comme une PCR classique.

2) Levures

La PCR sur colonies de levure, utilisée dans le cadre de cette étude, nécessite une étape préalable de lyse cellulaire pour extraire l'ADN. Cette lyse est effectuée en resuspendant les

cellules de levure dans 10 µL de NaOH 0,02 M, suivie d'une incubation à 95°C pendant 5 minutes, avant de placer rapidement les tubes dans la glace. Ensuite, 2 µL de la suspension cellulaire lysée servent de matrice pour la PCR, réalisée comme une PCR classique.

4. Purification et analyse des acides nucléiques

a. Purification d'ADN plasmidique de bactérie

La purification d'ADN plasmidique est principalement faite par miniprélèvement « sans kit » qui est une méthode très efficace utilisée pour isoler l'ADN plasmidique à partir de bactéries en grande quantité.

Tout d'abord, les cultures sont ensemencées le soir et mises à agiter (250 rpm) une nuit à 37°C. Les bactéries sont ensuite collectées par centrifugation à 10 000 rpm pendant 2 minutes. L'ADN est libéré des cellules bactériennes par lyse alcaline. Le culot bactérien est resuspendu dans la solution I (25 mM Tris/HCl pH 8, 10 mM EDTA pH 8, 0,1 mg/mL RNase), puis la lyse alcaline est induite par l'ajout de la solution II (0,2 M NaOH, 1% SDS). Après 5 minutes d'incubation à température ambiante, le pH basique est neutralisé par l'addition de solution III (3 M acétate de potassium, 11,5% acide acétique glacial), puis les débris cellulaires sont culottés par centrifugation à 13 000 g pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant contenant l'ADN plasmidique est ensuite récupéré et précipité par addition d'isopropanol 100%, suivie d'une centrifugation à 13 000 g pendant 10 minutes à 4°C. Le culot d'acides nucléiques est ensuite lavé à l'éthanol 70%, séché et repris dans 50 µL d'eau.

b. Purification d'ADN en solution ou à partir d'un gel d'agarose

La purification de l'ADN à partir de solutions ou de gels d'agarose est réalisée en utilisant le kit PCR Clean-up (Macherey-Nagel), conformément aux instructions du fabricant.

Initialement, l'ADN à purifier est obtenu à partir de différentes sources, y compris des réactions de PCR ou des bandes d'ADN découpées de gels d'agarose. Ces ADN sont souvent préalablement analysés par électrophorèse sur gel d'agarose pour identifier la présence potentielle d'amplifications aspécifiques dans le cas des produits de PCR, ou pour distinguer les fragments d'ADN digérés des ADN non digérés ou indésirables pour le clonage ultérieur.

Ensuite, le kit NucleoSpin est utilisé pour éliminer les impuretés, telles que les amorces, les dNTP, les enzymes de PCR, les colorants de gel d'agarose, et les tampons. Ce processus implique l'utilisation d'une colonne de silice qui se lie à l'ADN en présence d'une solution de sel chaotrope, permettant à l'ADN d'être lavé et élué en conditions optimales. Ce processus a permis d'obtenir un ADN purifié de haute qualité, qui est ensuite utilisé pour le clonage de gènes et le séquençage.

c. Analyse des acides nucléiques

1) Digestions enzymatiques

En utilisant des enzymes de restriction fournis par NEB, nous avons procédé à des coupures précises de l'ADN pour la vérification de la taille et de l'orientation des inserts clonés. Nous avons mis en contact de 100 ng à 6 µg d'ADN plasmidique avec 5 à 10 unités d'enzyme et un tampon réactionnel spécifique à une concentration de 10X. Ces réactions sont conduites à 37°C durant une période allant de 30 minutes à une heure, dans un volume final variant de 20 à 100 µL. Par la suite, les produits de la digestion sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose.

2) Electrophorèse en gel d'agarose

L'électrophorèse sur gel d'agarose a été largement utilisée tout au long de ce travail pour la visualisation, la quantification et l'isolement des fragments d'ADN. Les gels d'agarose sont préparés à une concentration de 1,2 %. Le poids moléculaire des fragments d'ADN est déterminé en comparaison avec un marqueur de poids moléculaire, en l'occurrence le 2-Log DNA Ladder (NEB).

Après la préparation des échantillons d'ADN, soit directement à partir des produits PCR en utilisant le tampon coloré de GoTaq® ou par addition d'un tampon de charge 5X pour une concentration finale de 1X, ils sont déposés sur le gel d'agarose et migrés dans un tampon **TAE** 1X (40 mM **Tris-Acétate**, 1 mM **EDTA**) à une tension de 100 V.

La visualisation des fragments d'ADN est réalisée à l'aide d'une caméra dans une cabine UV après incubation du gel dans une solution de **Bromure d'Ethidium (BET)** à une concentration de 0,1 µg/mL pendant 10 minutes. Cette technique a permis de mettre en évidence la

présence des fragments d'ADN, d'estimer leur taille et, dans certains cas, de permettre leur isolement pour des analyses ultérieures.

3) Dosage des acides nucléiques

La concentration et la pureté des acides nucléiques sont déterminées par spectrophotométrie à l'aide d'un spectrophotomètre Nanodrop™. Cette technologie permet d'analyser de petits volumes d'échantillon (1-2 µL) en mesurant l'absorbance des acides nucléiques à 260 nm, la concentration de l'ADN étant estimée en utilisant la loi de Beer-Lambert.

Par ailleurs, la pureté des échantillons est évaluée par le calcul du rapport d'absorbance à 260/280 nm. Un ratio proche de 1,8 indique que l'échantillon est relativement exempt de contamination protéique, qui absorbe la lumière à une longueur d'onde de 280 nm. Un ratio inférieur à 1,8 peut indiquer une contamination potentielle par des protéines ou d'autres composés organiques. Toutes les mesures sont effectuées en triplicata pour assurer la précision et la reproductibilité des résultats.

5. Clonage dans les vecteurs plasmidiques

a. Clonage dans le vecteur pYX212

Dans le cadre de cette étude, la mutagenèse dirigée par PCR, dans le vecteur bactérien **pGEMT**, a permis de générer une collection de huit mutants de HK1a et HK1b comme décrit dans la section **3.b**. Ces mutants englobent une série de mutations par échange de domaines ECD et/ou TM2 entre HK1a et HK1b (HK1a-ECD1b, HK1a-F470C, HK1a2M, HK1bECD-1a, HK1b-C478F, et HK1b2M), et incluent également des versions triples mutants (HK1a/b3M). À noter que les autres mutants simples avaient déjà été créés avant le début de ma thèse.

Après la mutagenèse, ces constructions sont soumises à un traitement KLD, comme précédemment décrit dans la section **3.b**. Une fois clonées dans le plasmide bactérien **pGEMT**, toutes les constructions sont vérifiées par digestion enzymatique avec *EcoRI* puis la position mutée est vérifiée par séquençage.

Par la suite, chaque construction mutante est amplifiée par PCR pour le clonage dans la levure osmodéficiente MH179 en utilisant des amorces spécialement conçues pour générer des

régions homologues au vecteur de levure **pYX212 (Annexe. 1)**, qui était préalablement digéré avec les deux enzymes de restriction *Eco*NI et *Hind*III (**Fig. 14**).

Profitant de la compétence en recombinaison homologue des levures, une co-transformation est réalisée en utilisant 100 ng de vecteur linéarisé et 250 ng d'insert amplifié. Seuls les inserts effectivement intégrés permettent aux levures de croître sur le milieu sélectif pour le vecteur. Enfin, une vérification par PCR sur colonies est effectuée pour confirmer l'intégration correcte de chaque construction mutante.

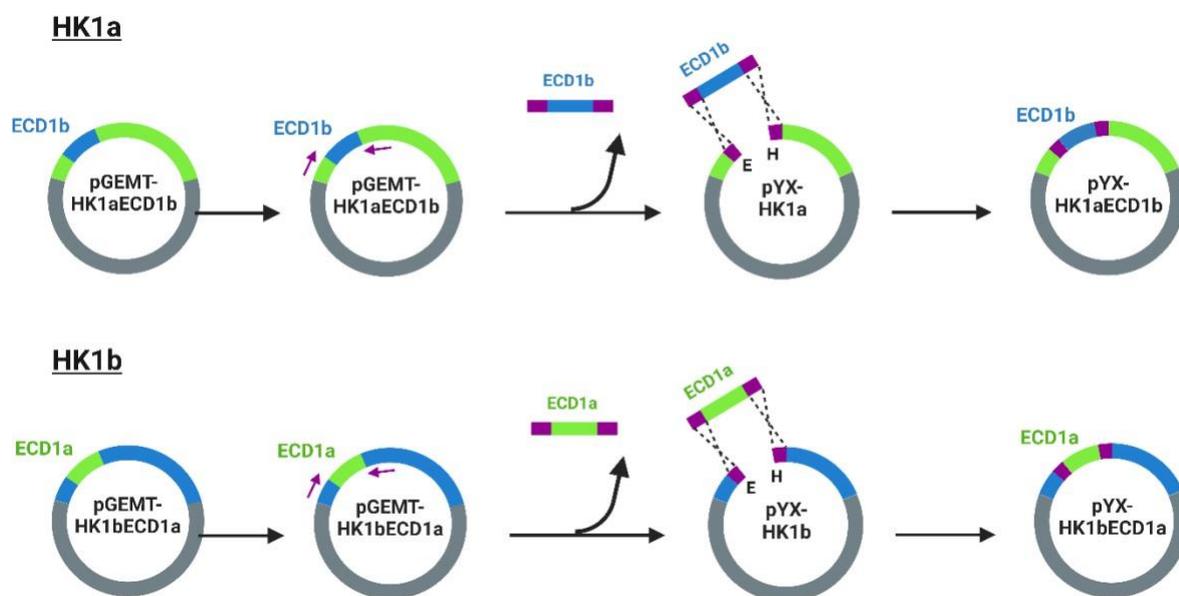


Figure 14. Stratégie de clonage par recombinaison homologue dans le vecteur pYX 212 directement dans la souche de levure MH179 pour des mutants par échange de domaines.

Les vecteurs bactériens pGEMT-HK1aECD1b et pGEMT-HK1bECD1a, servant de matrices pour la PCR, contiennent respectivement les séquences codantes pour les domaines ECD1b et ECD1a. La PCR est réalisée en utilisant des amorces spécialement conçues pour produire des régions homologues au vecteur de levure pYX212, préalablement digéré par les enzymes E pour *Eco*NI et H pour *Hind*III. Cette construction est ensuite transformée dans la souche de levure MH179.

b. Clonage dans le vecteur pGBKΔ

L'obtention du plasmide rapporteur GFP est basée sur l'assemblage par recombinaison homologue de trois fragments clés : le promoteur du gène STL1 de levure, le gène rapporteur GFP_{uv} et le vecteur d'expression levure pGBKΔ portant le marqueur d'auxotrophie TRP1. Ce

système est spécifiquement conçu pour des tests de criblage dans la souche de levure osmo-déficiente MH1354.

Pour réaliser cet assemblage, nous avons utilisé le kit NEBuilder (NEB), selon les instructions fournies par le fabricant. Le NEBuilder a permis un assemblage simultané de ces 3 fragments d'ADN. Une analyse plus détaillée de cette construction et de ses résultats obtenus sera présentée dans la section "Résultats".

c. Clonage dans les vecteurs pET28 et pET32a

Ce clonage nous a permis de préparer des souches bactériennes destinées à l'expression des protéines recombinantes HK1aECD et HK1bECD pour la purification ultérieure de ces protéines. Nous avons entrepris le clonage des séquences codant pour les domaines extracellulaires des protéines HK1a et HK1b (HK1aECD et HK1bECD), présentes sur les constructions pGEMT-HK1a et pGEMT-HK1b. Par le biais d'une amplification PCR spécifique, nous avons obtenu des fragments d'ADN comprenant des sites de restriction *Sall* et *NotI*, grâce à l'utilisation des amorces HK1ECD Not3 et HK1ECD Sal5 (**Fig. 15, Tab.10**).

Au cours de cette étude, nous avons utilisé deux vecteurs d'expression pour la production de notre protéine d'intérêt : le vecteur pET28a et le vecteur pET32a (**Annexe. 1**). Ces vecteurs ont été choisis afin de produire de grandes quantités de protéine dans *E. coli*. Ils permettent également l'expression de la protéine avec un tag en N-terminal de six histidines, ce qui facilite la purification de la protéine par chromatographie d'affinité sur nickel immobilisé. Le vecteur pET32a se distingue du vecteur pET28a par la présence d'une protéine de fusion supplémentaire, la thiorédoxine (Trx), qui est associée à la protéine d'intérêt. Cette protéine de fusion augmente la solubilité de la protéine d'intérêt, ce qui justifie le choix de ce vecteur.

Les clonages des ECD dans le vecteur pET28a avaient déjà été réalisés. Pour les clonages dans pET32a, les produits d'amplification sont purifiés puis insérés dans ce vecteur, préalablement digéré par *Sall* et *NotI* (**Fig. 15**) dans un volume final de 100 µL en présence du tampon approprié. Pour garantir l'efficacité de la ligation, nous avons respecté un ratio insert:vecteur de 3:1, en effectuant la réaction à 37°C pendant 15 minutes en présence du tampon de ligase. Les clones obtenus ont été vérifiés par séquençage en utilisant les amorces T7prom et T7term

(**Tab. 9**). Par la suite, les constructions obtenues ont été transformées dans les souches bactériennes *E. coli* BL21 et Rosetta.

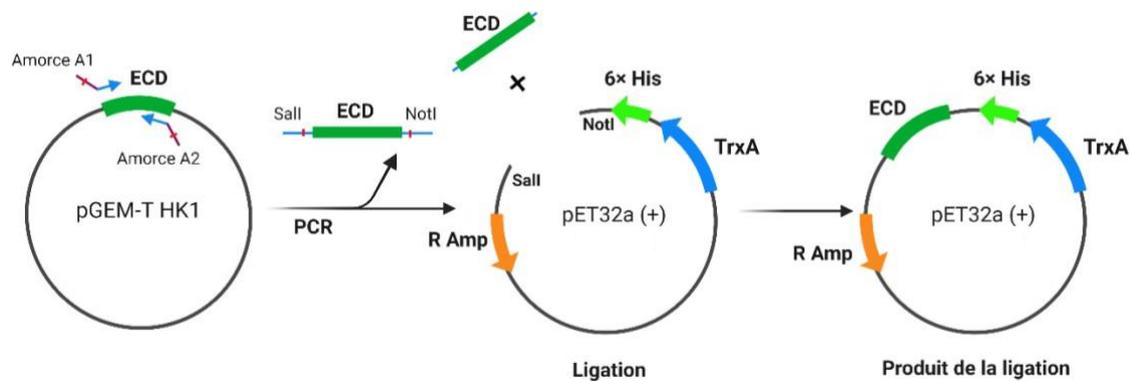


Figure 15. Stratégie de clonage du domaine ECD dans le vecteur d'expression bactérienne pET32a.

Le vecteur pGEM-T-HK1, servant de matrice pour la PCR, contient la séquence codante du domaine ECD. La PCR est mise en œuvre en utilisant les amorces flanquantes A1 pour HK1ECD SalI (amorce sens) et A2 pour HK1ECD NotI (amorce antisens), qui englobent respectivement les sites de restriction SalI et NotI. Le produit PCR obtenu est encadré par ces sites de restriction, permettant son clonage dans le vecteur pET32a, préalablement digéré par les mêmes enzymes. Ce vecteur d'expression porte deux tags, His et Trx, en plus d'un gène conférant la résistance à l'ampicilline.

Tableau 10. Amorces utilisées pour le clonage du domaine ECD dans le vecteur pET32a.

Amorces	ID	Orientation	Séquences
HK1ECD Sal5	A1	5'-3'	CGCGTCGACTGACAAGAAGCTATACAAA
HK1ECD Not3	A2	3'-5'	ATGCGGCCGCTATTTGAATGCTCTCTC

6. Expérience de complémentation fonctionnelle chez la levure

Afin d'évaluer la fonctionnalité des divers mutants créés, des essais de complémentation fonctionnelle sont systématiquement menés au sein de la souche de levure MH179. Le plasmide pPD2133, qui exprime l'osmosenseur de levure SLN1, sert de témoin positif (pPD-SLN1), tandis que le vecteur vide pYX212 fait office de témoin négatif.

Les cellules de levure cultivées en présence de galactose sans uracile (SG-Ura) sont utilisées pour sélectionner la transformation. Ces cellules sont ensuite striées ou déposées en goutte sur un milieu sélectif avec glucose (SD-Ura) dépourvu de NaCl ou supplémenté avec 0,3 M, 0,6

M, ou 0,9 M NaCl. Ces cultures sont maintenues à 30°C pendant 3-4 jours afin de réaliser les tests de complémentation en osmosensing. Lorsque les concentrations de NaCl atteignent 1,2 M ou 1,5 M, une période de culture de 5 à 7 jours est nécessaire. Des expériences complémentaires ont été effectuées sur un milieu SD-Ura infusé de PolyEthylene Glycol 6000 à 50% (**PEG**50 p/v), mannitol 1 M et sorbitol 1 M pendant une nuit. Pour chacune de ces conditions, trois séries de dilutions décimales sont préparées à partir d'une densité optique à 600 nm (DO_{600}) de 0,2, et 5 µL de chaque dilution sont déposés sur le milieu.

L'osmolarité des solutions liquides est mesurée à l'aide d'un micro-osmomètre de type Roebbling 13DR. Avant la mesure, le milieu en gel PEG est fondu. Les valeurs obtenues représentent la moyenne de trois répétitions.

7. Production et purification des protéines recombinantes

a. Expression des protéines recombinantes

1) Culture bactérienne

Tout d'abord, les cultures sont mises à incuber dans le milieu LB contenant l'antibiotique approprié (ampicilline pour pET32a et kanamycine pour pET28 dans BL21, + chloramphénicol dans Rosetta) pendant une durée de 2 à 3 heures jusqu'à obtention d'une absorbance à 600 nm comprise entre 0,6 et 0,8. Ensuite, 0,25 mM d'IsoPropyl β-D-1-ThioGalactopyranoside (**IPTG**) sont ajoutés pour induire l'expression des protéines. Suite à cette addition, une incubation supplémentaire de 4 heures est réalisée dans les mêmes conditions.

2) Lyse bactérienne

Les bactéries sont récoltées par centrifugation à 4000 g pendant 30 minutes à 4°C. Le culot cellulaire est resuspendu dans un tampon de lyse composé de Tris-HCl à 20 mM pH8, NaCl à 300 mM, lysozymes à 5 µg/mL, DNase 2U et PMSF 1X. Cette étape est suivie d'une incubation de 30 minutes à 37°C pour assurer une lyse cellulaire efficace. Les protéines sont ensuite récupérées dans le surnageant après une centrifugation de 30 minutes à 25000 g et à 4°C.

L'expression des protéines est validée par une analyse par SDS-PAGE, offrant un aperçu visuel de l'expression protéique.

b. Analyse de la production et de la solubilisation par SDS-PAGE

Cette analyse comprend le chauffage des échantillons dans le tampon Laemmli 1X contenant Tris-HCl 60 mM pH 6,8, DTT 100 mM, SDS 2%, glycérol 10% et le bleu de bromophénol 0,5 g/L pendant 5 minutes à 100°C. Les échantillons sont ensuite refroidis dans la glace et centrifugés brièvement pour récupérer la condensation dans le bouchon.

Pour la migration, une solution tampon Tris-Glycine 1X avec SDS 10% est utilisée. Les échantillons sont chargés sur un gel de polyacrylamide à 10% et la migration est effectuée pendant 50 minutes à un courant constant de 25 mA. Chaque puits du gel reçoit 20 µL d'échantillon de protéines et 7,5 µL d'un marqueur de poids moléculaire multicolore à plage étendue (Multicolor Broad Range Protein Ladder, Euromedex). Ce marqueur précoloré offre une échelle de taille de protéine allant de 10 à 260 kDa, permettant une identification immédiate de la taille des protéines.

Suite à la migration, les protéines séparées sont visualisées par coloration au bleu de Coomassie dans une solution de fixation à l'éthanol pendant une à deux heures puis le gel est décoloré dans de l'eau toute une nuit à température ambiante.

c. Détermination de la concentration en protéines

Pour compléter l'analyse de l'expression et de la solubilisation des protéines recombinantes, une évaluation quantitative est effectuée en utilisant la méthode de Bradford. Cette méthode colorimétrique, basée sur la liaison du bleu de Coomassie aux acides aminés basiques et aromatiques, a permis une détermination précise de la concentration protéique. Les échantillons de protéines sont préparés et le dosage est effectué selon le protocole standard de Bradford (*Bradford, 1976*).

d. Purification des protéines recombinantes : Chromatographie d'affinité sur nickel immobilisé

Suite à la lyse cellulaire, le surnageant, contenant les protéines recombinantes, est recueilli pour l'étape de purification. Ce processus est réalisé par chromatographie d'affinité sur colonne de Ni-NTA, exploitant l'interaction entre les ions de nickel Ni²⁺ fixés à la résine de la colonne et le tag d'histidine (His-Tag) situé sur le côté N-terminal de la protéine. Ces interactions sont attribuées aux propriétés des histidines dont le noyau imidazole possède une

paire d'électrons libres, portée par un atome d'azote, qui peut former des complexes avec des ions métalliques divalents tels que Ni^{2+} , Cu^{2+} ou Co^{2+} .

Le surnageant contenant la protéine solubilisée est alors dilué 10 à 25 fois dans le tampon contenant du Tris 50 mM à pH 8, NaCl 200 mM, urée 2 M et imidazole 10 mM, et est injecté à un débit de 1 mL/min sur une colonne HisTrap couplée à un système de purification Äkta (Cytiva), préalablement équilibrée avec le tampon A d'équilibration contenant du Tris-HCl 50 mM à pH 8, NaCl 200 mM et imidazole 10 mM. Ce qui est recueilli lors de l'injection correspond au "flow-through".

Après l'injection de l'échantillon, un lavage est réalisé avec la solution d'équilibration. La conductimétrie et l'absorbance à 280 nm sont suivies en continu. L'élution est ensuite effectuée avec le tampon B d'élution contenant du Tris-HCl 50 mM à pH 8, NaCl 200 mM et imidazole 500 mM. Un pic d'élution est observé, indiquant la présence de la protéine d'intérêt.

8. Site expérimental et conditions de récolte des feuilles de peuplier

a. Site expérimental de la plantation du peuplier

Quatre géotypes de peuplier distincts ont été sélectionnés pour cette étude : Skado, Koster, Dellinois et Jean Pourtet (**Tab. 2**). Ces différentes variétés ont été cultivées dans une pépinière expérimentale de la station de recherche INRAE d'Orléans située à Ardon qui a été installée au printemps 2015 (**Fig. 16**).

Le dispositif expérimental en pépinière est subdivisé en quatre parcelles. Chaque parcelle représente une modalité de culture différente. Cependant, seulement deux de ces parcelles sont retenues pour notre collecte. La première parcelle, qualifiée de "parcelle irriguée", est équipée d'un système d'irrigation de goutte-à-goutte, tandis que la deuxième parcelle, identifiée comme la "parcelle non irriguée", ne bénéficie pas de ce système et possède en plus un système d'exclusion de pluie qui réduit d'environ 25% la quantité d'eau de pluie reçue. Ces deux parcelles présentent donc deux conditions hydriques distinctes pour l'étude des mêmes géotypes.

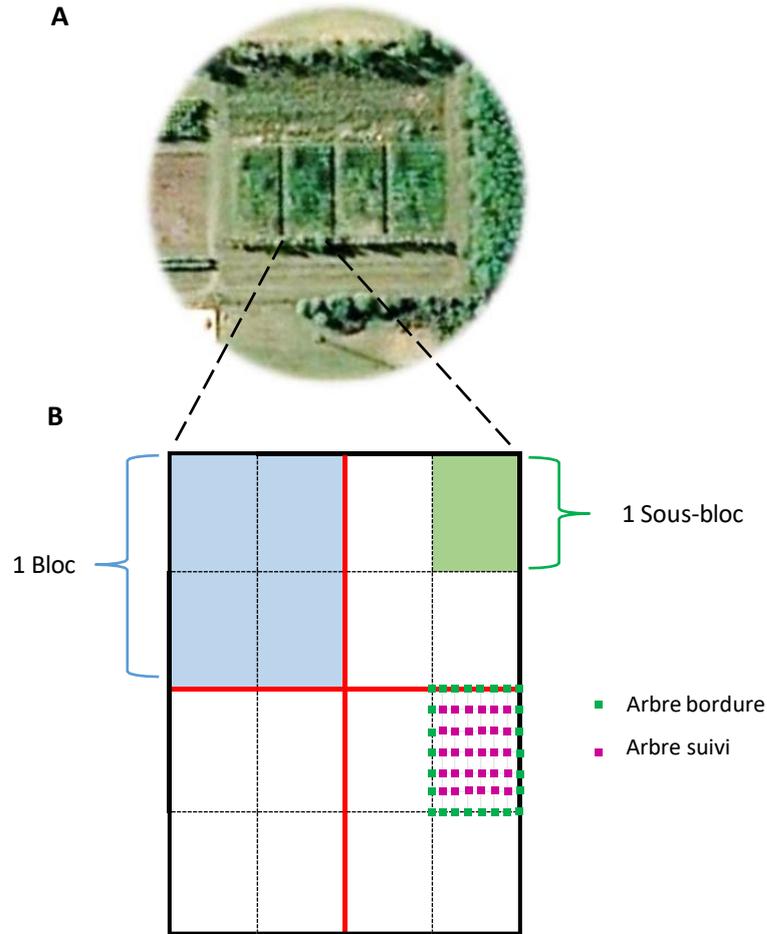


Figure 16. *Dispositif expérimental en pépinière.*

A) *Vue satellite de la plantation expérimentale composée de 4 parcelles avec 4 conditions de culture différentes (47° 82' N et 1° 91' E, 106m a.s.l.). © 2017 HERE-© 2017 Microsoft Corporation © 2017 DigitalGlobe © CNES (2017) Distribution Airbus DS. B)* *Représentation schématique d'une parcelle expérimentale divisée en 4 blocs randomisés eux même subdivisés en 4 sous-blocs monoclonaux.*

b. Conditions d'échantillonnage

La récolte des feuilles de ces arbres est effectuée à trois moments distincts au cours de la saison de croissance, afin d'obtenir des échantillons représentatifs de diverses phases de développement de la feuille. Le premier prélèvement a eu lieu en début de saison (Juillet), lorsque les plants étaient encore exempts de stress hydrique. Un deuxième prélèvement est réalisé en milieu de saison (Septembre), période à laquelle les arbres peuvent commencer à montrer des signes de stress hydrique. Enfin, un troisième et dernier prélèvement est effectué en fin de saison (Octobre), moment où les feuilles de peuplier sont en phase pré-sénescence.

Immédiatement après la récolte, les feuilles sont congelées sur place dans de l'azote liquide pour préserver au mieux leurs caractéristiques biochimiques. Elles sont ensuite stockées à une température de -80°C en attendant d'être extraites pour analyse ultérieure.

9. Production des phytoextraits de peuplier

La préparation des phytoextraits de feuilles de peuplier a été réalisée à l'Institut de Chimie Organique et Analytique (ICOA). Elle commence par la lyophilisation des feuilles récoltées pendant une nuit pour garantir un séchage complet. Les feuilles lyophilisées sont ensuite finement broyées pour obtenir une poudre homogène. Pour chaque gramme de cette poudre de feuilles, 20 mL d'éthanol à 70 % sont utilisés pour l'extraction. Afin d'optimiser l'extraction des composés phytochimiques, un traitement par ultrasons est appliqué pendant une heure à température ambiante. Cette méthode d'extraction assistée par ultrasons a permis de maximiser le rendement en composés actifs. Les extraits sont ensuite centrifugés, permettant la séparation et la récupération du surnageant qui contient les composés d'intérêt. Le surnageant récupéré est séché sous un flux d'azote pendant plusieurs jours jusqu'à l'évaporation complète de l'éthanol.

Enfin, les extraits séchés sont resuspendus à une concentration finale de 10 mg/mL. Pour les échantillons provenant de St-Cyr-en-Val, deux techniques d'extraction ont été employées en utilisant deux solvants distincts : l'éthanol à 70% et l'acétate d'éthyle pur. Lors de la première extraction, le résidu sec a été dissous dans de l'éthanol à 50%. En parallèle, le résidu obtenu de l'extraction à l'acétate d'éthyle a été solubilisé dans une combinaison d'acétonitrile et d'isopropanol à 50 %. Concernant les échantillons d'Ardon, ils ont été extraits uniquement avec de l'éthanol à 70%, et le résidu sec a ensuite été solubilisé dans de l'éthanol à 50%.

10. Chromatographie liquide à ultra haute performance couplée à la spectrométrie de masse (UHPLC-MS)

L'étude des phytoextraits issus de divers génotypes de peuplier a été réalisée au moyen de la technique UHPLC-MS au sein de l'ICOA. La phase mobile utilisée était un mélange de l'eau enrichie de 0,1% d'acide formique et d'un mélange méthanol/isopropanol avec 0,1% d'acide formique. Le gradient d'élution était établi comme suit : 0 min à 100% A, 20 min à 50% A et

50% B, puis progressivement modifié à 10% A et 90% B à 21 min, maintenu jusqu'à 26 min, et revenu à 100% A jusqu'à 36 min. La séparation a été effectuée sur une colonne Hypersil Gold aQ (Thermoscientific dimensions : 100 x 2,1 mm) à un débit de 0,4 mL/min et une température de 40°C, avec un volume d'injection de 2 µL. Cette méthode chromatographique a offert une résolution optimale pour une analyse détaillée des profils chimiques des extraits foliaires de peuplier étudiés.

Quatre détecteurs ont été mis en œuvre pour l'analyse des composés. Le premier, opérant à une longueur d'onde de 280 nm dans le domaine UV, est spécifiquement conçu pour repérer les molécules ayant des groupements chromophores, à l'instar des polyphénols ou des flavonoïdes. Le second, un détecteur DEDL, identifie les composés présentant une volatilité moindre par rapport à la phase mobile, ce qui inclut des molécules telles que les sucres et les terpènes, moins visibles en UV. Le troisième détecteur, fonctionnant à 366 nm, cible les composés dotés de groupements chromophores, et permet de différencier les flavonoïdes des composés phénoliques que l'on ne voit pas à cette longueur d'onde. Enfin, le quatrième détecteur, opérant à 440 nm, est dédié à la détection des molécules ayant des groupements chromophores et permet de différencier les pigments tels que les caroténoïdes et les chlorophylles, des autres composés présents dans l'échantillon.

11. Protocole de criblage

Initialement, des colonies de la souche de levure MH1354 sont inoculées dans 1,5 mL de milieu –UW + Gal. Cette culture est mise en incubation toute la nuit à une température de 29°C, avec une agitation constante à 250 rpm. Le lendemain, la densité optique de chaque culture est mesurée à une longueur d'onde de 600 nm afin d'obtenir une DO_{600} de 0,25 en la diluant dans le même milieu. Ensuite, la culture est incubée à 29°C sous agitation jusqu'à obtenir une DO_{600} de 1, ce qui a généralement nécessité une période d'environ 7-8 heures.

Ensuite, les plaques de microtitration stériles (96 puits) sont préparées en ajoutant la culture (216 µL) et les conditions de stress correspondant à chaque osmosenseur sont appliquées (54 µL pour NaCl 0,9 M). Par la suite, les ligands à tester, tels que les phytoextraits, les acides aminés et les exsudats racinaires sont ajoutés à chaque puits de la plaque (30 µL). Ces plaques sont ensuite incubées toute la nuit à 29°C, avec une agitation constante à 225 rpm.

Le lendemain, l'absorbance de chaque puits est mesurée pour quantifier les levures et ainsi normaliser les résultats de fluorescence. Pour terminer, la fluorescence de chaque puits est mesurée en triplicata à l'aide d'un spectrofluorimètre (BMG Labtech), permettant ainsi d'obtenir une mesure de l'activité de l'osmosenseur en réponse aux ligands testés.

12. Spectrométrie de masse à haute résolution (HRMS)

La Spectrométrie de Masse à Haute Résolution (HRMS) est utilisée pour l'identification des composés chimiques qui pourraient être responsables des effets observés sur les plantes testées. Ces analyses sont réalisées en utilisant un spectromètre de masse UHPLC-HRMS (Bruker maXis) de l'ICOA.

Les échantillons sont analysés en utilisant une source d'ionisation **ElectroEpray (ESI)** et un analyseur de type quadropôle-temps de vol (Q-TOF). La phase mobile est constituée de deux solvants A : H₂O + 0,1 % d'acide formique et B : ACN + 0,1 % d'acide formique suivant un gradient qui permet de bien séparer les différents composés présents dans nos échantillons en fonction de leur solubilité relative dans les solvants A et B. Le gradient utilisé est : 0 min (97 % A + 3 % B) ; 0,4 mn (97% A + 3% B) ; 15,1 min (15 % A + 85 % B) ; 16,1 min (0 % A + 100 % B) ; 18,1 min (0 % A + 100 % B) ; 18,3 mn (97% A+ 3 % B) ; 21,1 min (97 % A + 3 % B).

L'analyse est réalisée avec une colonne Phenomenex Luna Omega 1,6 µm 150*2,1 mm, un volume d'injection de 2 µL, un débit de 0,5 mL/min, une température de 40°C et un temps d'analyse de 21 minutes.

Les données obtenues sont traitées avec le logiciel Data Analysis (Bruker). Les masses moléculaires précises des pics observés dans les spectres sont déterminées et les formules correspondantes sont identifiées grâce à une recherche dans la base de données Lotus et dans la littérature existante.

RESULTATS

PARTIE I

CARACTERISATION DES DOMAINES IMPLIQUES DANS LA FONCTIONNALITE D'OSMOSEUSEUR DES RECEPTEURS HK1 CHEZ LE PEUPLIER

Au sein de notre équipe de recherche, nous nous sommes concentrés sur l'étude de la voie de signalisation de type MSP, qui semble être impliquée dans la réponse du peuplier à la contrainte hydrique. L'ensemble des partenaires impliqués dans cette voie pour les deux types de récepteurs HK1 du peuplier ont été déjà identifiés (*Bertheau et al., 2012 ; 2013; 2015 ; Héricourt et al., 2013; 2016 ; Chefdor et al., 2018 ; Djeghdir et al., 2021*). Ces récepteurs présentent un large domaine extracellulaire (ECD) exposé à l'extérieur de la cellule dans l'apoplasme et encadré par deux domaines transmembranaires (TM1 et TM2). Au niveau cellulaire, le stress sécheresse est perçu comme un stress osmotique, mais le mécanisme précis de cette perception, appelée osmosensing, demeure encore mal compris. Cette partie du mémoire est dédiée à l'étude approfondie des deux récepteurs HK1 chez le peuplier, avec l'objectif de caractériser les domaines responsables de leur fonctionnalité d'osmosenseurs. Deux axes méthodologiques majeurs ont été privilégiés pour parvenir à cet objectif :

Approche Génétique : La première méthode consiste en une approche génétique pour identifier les déterminants de l'osmosensing de ces récepteurs. Le chapitre I détaille les résultats de ces investigations et présente l'article publié intitulé "*Searching for Osmosensing Determinants in Poplar Histidine Aspartate Kinases*".

- ✓ **Approche Biochimique :** La seconde méthode est une approche biochimique axée sur l'étude de l'ECD. En effet, celui-ci revêt une importance particulière non seulement pour la recherche de ligands spécifiques, dont l'identification constituerait une avancée scientifique majeure en apportant une réponse à une question en suspens au sein de la communauté scientifique depuis de nombreuses années, mais aussi pour des études structurales futures, par cristallographie, dont la caractérisation de la structure 3D constituerait une première dans le domaine végétal. Les résultats correspondants sont exposés dans le chapitre II.

CHAPITRE I

Caractérisation fonctionnelle des déterminants
osmosenseurs des HK1 chez le peuplier

A. Présentation de l'article

Dans le cadre de ce premier article, notre recherche s'est centrée sur la caractérisation fine des éléments clés qui confèrent aux deux HK1 leur fonction d'osmosenseur observée chez la levure.

Deux questions principales ont guidé notre étude :

1. Le domaine CACHE : domaine senseur des récepteurs HK1 ?

Chez la levure, il a été démontré que l'intégrité de l'ECD de l'osmosenseur SLN1 est crucial pour sa fonction de détection des changements de pression de turgescence (Reiser et al., 2003). Une analyse computationnelle approfondie sur les récepteurs senseurs a mis en évidence que le domaine dit "extracellulaire PAS" (Per/Arnt/Sim) correspond à un domaine CACHE (Upadhyay et al., 2016). Ce domaine compose la plus grande superfamille de senseurs extracellulaires chez les procaryotes, et il a été identifié comme un domaine de signalisation capable de se lier à de petites molécules (Anantharaman & Aravind, 2000). Ce domaine CACHE a également été trouvé dans l'osmosenseur de levure SLN1, ainsi que dans les osmosenseurs putatifs d'Arabidopsis (AHK1) et du peuplier (HK1a). L'analyse des séquences protéiques de l'ECD de protéines homologues à AHK1 chez diverses espèces végétales, a mis en évidence une nette conservation de cet ECD. En conséquence, nous nous sommes fixés comme objectif d'examiner plus en détail le rôle spécifique de ce domaine dans la fonction d'osmosensing des récepteurs HK1 chez le peuplier. Pour explorer cette question, nous avons testé, par complémentation fonctionnelle dans la souche de levure doublement mutée *sln1Δ Sho1Δ*, des mutants ponctuels obtenus après modélisation de séquence de l'ECD des protéines HK1a et HK1b.

2. Quel élément détermine la différence d'efficacité de réponse au stress osmotique entre HK1a et HK1b ?

De multiples recherches ont souligné le rôle essentiel des domaines transmembranaires TM dans la fonction des récepteurs HK. Par exemple, l'importance des domaines TM pour la fonction de SLN1 a été démontrée par une analyse d'échange de domaines entre SLN1 et le récepteur à cytokinine AHK4 d'Arabidopsis (Reiser et al., 2003). De plus, des mutants de AHK4, présentant une activité constitutive (gain de fonction), ont été identifiés avec une mutation

au niveau du second domaine TM (*Miwa et al., 2007*). Une autre étude sur *Arabidopsis* a révélé des mutants à gain de fonction mutés sur le 4^{ème} domaine TM d'AHK2 (*Bartrina et al., 2017*). Ces découvertes soulèvent des questions fondamentales sur le rôle des domaines TM en plus du domaine ECD dans la perception et la signalisation des récepteurs HK.

De plus, des études antérieures ont montré que les récepteurs HK1a et HK1b ont une fonctionnalité divergente en réponse au stress osmotique, HK1b permettant une meilleure réponse que HK1a (*Héricourt et al., 2016*). Dans ce contexte, nous avons cherché à déterminer si le domaine CACHE dans l'ECD, voire le domaine TM2, étaient impliqués dans cette différence.

Pour ce faire, des tests de complémentation fonctionnelle dans la levure ont également été menés sur des mutants de HK1a et HK1b, dont les domaines ECD et/ou TM2 ont été échangés entre les deux récepteurs. L'ensemble de ces mutants a été généré par mutagenèse dirigée par PCR et les tests ont été réalisés dans la souche de levure MH179 osmodéficiente pour les deux protéines clés de la levure impliquées dans l'osmosensing (*sln1Δ sho1Δ*).

B. Principaux résultats

Premièrement, l'analyse de l'alignement des ECD des protéines homologues du récepteur d'*Arabidopsis* AHK1 a révélé que le domaine CACHE était bien conservé chez de nombreuses espèces végétales. Cette conservation souligne l'importance de ce domaine et a conduit à l'hypothèse que le domaine CACHE pourrait être responsable de la capacité d'osmosensing des récepteurs HK1. Pour tester cette hypothèse, des mutants des récepteurs HK1a et HK1b ciblant des positions potentiellement en interaction avec le ligand dans le domaine CACHE ont été créés. En effet, pour identifier ces positions potentielles, les structures 3D des ECD de HK1a et HK1b ont été modélisées et superposées à celles d'un domaine CACHE bactérien du récepteur à l'histamine TlpQ de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 lié à son ligand, l'histamine (PDB 6FU4) (*Baek et al., 2021*). Trois zones dans les modèles HK1a et HK1b ont été identifiées comme pouvant être impliquées dans la liaison au ligand. Par conséquent, des positions identiques dans les deux protéines ont été choisies dans chacune des zones et ont été mutées en alanine. Les résidus ciblés étaient T324A, S304A, K296A pour HK1a et T331A, Q311A,

K303A pour HK1b. Ces mutants, simple ou triple, ont été testés par la suite par complémentation fonctionnelle dans la levure osmodéficente.

Deuxièmement, nos résultats montrent que les mutations spécifiques apportées aux récepteurs HK1a (T324A, S304A, K296A) et HK1b (T331A, Q311A, K303A) semblent légèrement améliorer la réponse au stress osmotique par rapport à HK1a WT et HK1b WT respectivement, ce qui suggère l'implication de ces acides aminés dans la fonction d'osmosensing, potentiellement en interaction avec un ligand. Cet effet a été observée en présence de stress induit par le NaCl (0,9 M) ou par le PEG₆₀₀₀ (50%).

Enfin, pour identifier les facteurs responsables de la réponse différentielle au stress osmotique entre HK1a et HK1b, des mutants par échange de domaines ECD et/ou TM2 ont été testés. Nos résultats ont montré que HK1a avec les domaines ECD ou TM2 de HK1b présentait une meilleure tolérance au stress osmotique que HK1a WT. Par ailleurs, la diminution de la réponse au stress osmotique attendue de HK1b n'a pas été observée. Cependant, des tests à des concentrations plus élevées de NaCl (1,2 M et 1,5 M) ont montré une diminution de la réponse pour HK1b lorsque le domaine TM2 est échangé, confirmant que les domaines ECD et surtout TM2 sont impliqués dans la fonction d'osmosensing de ces récepteurs.

C. Conclusion et perspectives

Cette étude met en évidence l'importance fonctionnelle des domaines CACHE et TM2 dans les récepteurs HK1a et HK1b du peuplier. Étant donné que le domaine CACHE est conservé dans une grande variété de protéines homologues à HK1 chez les plantes, il est raisonnable de postuler que ce domaine joue un rôle dans l'osmosensing chez les plantes. De plus, nous avons pu identifier des acides aminés potentiellement impliqués dans la fixation d'un ligand. La détermination structurale du domaine CACHE pourrait offrir des informations intéressantes pour confirmer ces résultats, et fournirait pour la première fois des données structurales chez les plantes pour ce type de HK (cette partie sera abordée dans le chapitre suivant). De même, l'identification d'un ligand spécifique au domaine CACHE pourrait apporter des éléments clés pour comprendre les mécanismes de l'osmosensing (abordé dans

le chapitre IV). Par ailleurs, le domaine TM2 semble contribuer à la différence observée dans la réponse au stress osmotique entre HK1a et HK1b. Cependant, d'autres parties de ces protéines semblent impliquées et des études pourraient explorer le rôle de la partie cytoplasmique du récepteur HK1b en totalité (CP) ou en partie (Domaine His Kinase ou Rec).

L'ensemble de ce travail est présenté dans l'article ci-dessous.

Article

Searching for Osmosensing Determinants in Poplar Histidine-Aspartate Kinases

<https://www.mdpi.com/1422-0067/24/7/6318>

En ligne dans International Journal of Molecular Sciences : Hanae Makhokh, Pierre Lafite, Mélanie Larcher, Frédéric Lamblin, Françoise Cheddor, Christiane Depierreux, Mirai Tanigawa, Tatsuya Maeda, Sabine Carpin and François Héricourt (2023)



Article

Searching for Osmosensing Determinants in Poplar Histidine-Aspartate Kinases

Hanae Makhokh ¹, Pierre Lafite ², Mélanie Larcher ¹, Frédéric Lamblin ¹, Françoise Chefedor ¹,
Christiane Depierreux ¹, Mirai Tanigawa ³, Tatsuya Maeda ³, Sabine Carpin ^{1,*} and François Héricourt ^{1,*}

- ¹ Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures (LBLGC), Université d'Orléans, INRAE USC1328, 45067 Orléans Cedex 2, France
² Institut de Chimie Organique et Analytique (ICOA), UMR CNRS-Université d'Orléans 7311, Université d'Orléans, BP 6759, 45067 Orléans Cedex 2, France
³ Department of Biology, Hamamatsu University School of Medicine, 1-20-1 Handayama, Higashi-ku, Shizuoka 431-3192, Japan
* Correspondence: authors: sabine.carpin@univ-orleans.fr (S.C.); francois.hericrourt@univ-orleans.fr (F.H.); Tel.: +33-2-3849-4804 (S.C.); +33-2-38-49-4806 (F.H.)

Abstract: Previous works have shown the existence of protein partnership, belonging to a MultiStep Phosphorelay (MSP), potentially involved in osmosensing in *Populus*. The first actor of this signalling pathway belongs to the histidine-aspartate kinase (HK) family, which also includes the yeast osmosensor Sln1, as well as the Arabidopsis putative osmosensor AHK1. In poplar, the homologous AHK1 protein corresponds to a pair of paralogous proteins, HK1a and HK1b, exhibiting an extracellular domain (ECD), as in Sln1 and AHK1. An ECD alignment of AHK1-like proteins, from different plant species, showed a particularly well conserved ECD and revealed the presence of a cache domain. This level of conservation suggested a functional role of this domain in osmosensing. Thus, we tested this possibility by modelling assisted mutational analysis of the cache domain of the *Populus* HK1 proteins. The mutants were assessed for their ability to respond to different osmotic stress and the results point to an involvement of this domain in HK1 functionality. Furthermore, since HK1b was shown to respond better to stress than HK1a, these two receptors constituted a good system to search for osmosensing determinants responsible for this difference in efficiency. With domain swapping experiments, we finally demonstrated that the cache domain, as well as the second transmembrane domain, are involved in the osmosensing efficiency of these receptors.

Keywords: histidine-aspartate kinase (HK); cache domain; extracellular domain (ECD); transmembrane (TM) domain; MultiStep Phosphorelay (MSP); Osmosensing; *Populus*; drought signaling



Citation: Makhokh, H.; Lafite, P.; Larcher, M.; Lamblin, F.; Chefedor, F.; Depierreux, C.; Tanigawa, M.; Maeda, T.; Carpin, S.; Héricourt, F. Searching for Osmosensing Determinants in Poplar Histidine-Aspartate Kinases. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 6318. <https://doi.org/10.3390/ijms24076318>

Academic Editor: Yong-Hwan Moon

Received: 13 February 2023
Revised: 20 March 2023
Accepted: 23 March 2023
Published: 28 March 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Water deficit is one of the most important environmental stresses affecting plant growth. Therefore, understanding the mechanism of drought stress perception is a major challenge to select new drought-tolerant plants. At the cellular level, this abiotic stress is perceived as an osmotic stress, and the plant mechanism of osmosensing is still unresolved, thus constituting an ongoing research field of particular interest [1,2]. So far, the best-known eukaryote osmosensing pathway corresponds to the one of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* [3]. This pathway involves a MultiStep Phosphorelay (MSP) composed of (i) Sln1, a hybrid-type histidine-aspartate kinase (HK) osmosensor, (ii) Ypd1, a histidine-containing phosphotransfer (HPt) protein and (iii) Ssk1, the response regulator (RR). Under isotonic conditions, Sln1 is active and autophosphorylates on histidine-conserved residue in its own transmitter domain (TD), then transfers the phosphate group to its own C-terminal receiver domain (RD) [4,5]. This phosphate group is then transferred to Ypd1 and, finally, to Ssk1, leading to the inactivation of the HOG pathway. On the other hand, under hyper-osmotic stress conditions, Sln1 phosphorylation is repressed, leading to the activation of the HOG Mitogen-Activated Protein (MAP) kinase cascade [6].

In yeast, Sln1 is integrated into the membrane by two transmembrane domains, flanking an extracellular domain (ECD) in the N-terminal part [4]. It has been shown that the integrity of this ECD is essential for its sensor function, in response to change in turgor pressure [7]. Furthermore, another HK protein, AHK1, has been proposed to be involved in osmosensing in Arabidopsis since this HK is able to perceive osmotic stress in yeast, triggering HOG pathway activation [8,9], and is located at the plant plasma membrane [10]. *In planta* analysis of *ahk1* mutants gave evidence that AHK1 (i) acts as a positive regulator of osmotic stress signalling, (ii) is involved in drought tolerance [9,11] and (iii) controls plant water status, probably by determining stomatal density [12].

In *Populus*, two proteins homologous to AHK1 have been identified, namely HK1a and HK1b [13,14]. Unlike Arabidopsis, the full MSP for both poplar HK1s has been determined with HPT and RR partners [15–20]. These HK1s' partners have been shown to be shared with the cytokinin (CK) MSP, showing interconnection between these two signalling pathways [21].

Recently, a large computational analysis on sensor receptors was performed and revealed that the so-called “extracellular PAS” (Per/Arnt/Sim) domain is indeed a cache domain [22]. This study revealed that cache domains are widely present in all kinds of living organisms and comprise the largest superfamily of extracellular sensors in prokaryotes. A cache domain was initially identified as a signalling domain able to bind small molecules, common to animal Ca²⁺ (Ca) channel subunits and prokaryotic chemotaxis (che) receptors [23]. This domain was identified in a wide range of extracellular domains of ligand-binding proteins. A secondary structure consensus has been characterized with three $\beta\beta$ sheets, followed by an α helix and two more β sheets. In 2016, Upadhyay and colleagues refined the existing models and established eight new classes of cache domain models: four single and four double. This new design allowed the identification of more than 50,000 new proteins bearing a cache domain. Among them, the yeast osmosensor Sln1, as well as the putative plant osmosensors from Arabidopsis (AHK1) and poplar (HK1a), were identified (HK1b was not available in the database at this time). All these data questions on the possible involvement of the cache domain in these plant receptors, and a deeper insight into this domain function, seem to be of particular interest.

Based on these findings, we performed an alignment of the ECD of AHK1 homologous proteins from different plant species, revealing a well-conserved cache domain in sequence and structure. Since AHK1 and HK1a/b were characterized as osmosensors in yeast, this alignment result allowed us to hypothesize that this cache domain may be responsible for the osmosensing capacity of these receptors. We tested this possibility by a genetic approach with a mutational analysis of poplar HK1a and HK1b cache domains. A rational mutation design, assisted by modelling, was used to direct point mutations, and mutants were tested in a complementation assay, with an osmodeficient yeast strain challenged on different osmotic stress and strength. These assays allowed us to identify positions that could be involved in protein functionality. Moreover, according to previous results demonstrating that HK1b is able to respond to osmotic stress more efficiently than HK1a [14], we performed domain swapping experiments between the two HK1s to identify the determinant of osmosensing efficiency in these two HK receptors. Furthermore, according to literature, a convergent bundle of evidence pinpoints the importance of the last transmembrane (TM) domain in HK functionality for yeast Sln1 [7], as well as plant CK receptors AHK4 (also named CRE1) [24] or AHK2 [25]. These data lead us to test the impact of such a domain in the efficiency of our poplar HK1 receptors. Thus, we determined that cache domain in the ECD, as well as in second TM domain, play a role in osmosensing functionality. Finally, the involvement of these osmosensing determinants is discussed.

2. Results

2.1. HK1a/b Contain a Conserved Cache Domain in Their ECD

According to Upadhyay and colleagues (2016), a cache domain is present in the osmosensor Sln1 and the putative plant osmosensors AHK1 and HK1a (Figure 1A). This

cache domain corresponds to the model type dcache_1 (first type of double cache domain) and presents two cache sub-domains (residues 154–364 in HK1a and 161–371 in HK1b) [22]. If this domain constitutes a specific motif involved in the functionality of the receptor, one may expect that it should be present and conserved among different plant species. Consequently, we retrieved the sequence of 27 AHK1 homologous proteins from 21 plant species and performed an alignment of their respective ECD sequence, based on the sequence between the two transmembrane domains of HK1a/b. Figure 1B presents a zoom of this alignment (full ECD alignment in Figure S1), corresponding to the second cache sub-domain, and shows that ECD sequences are well-conserved across a wide range of plant species. Moreover, the conserved sequences are well superimposed with the specific secondary structures of a cache domain ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\alpha 1$, $\beta 4$, $\beta 5$) [23], indicating that a cache domain is indeed present in the ECD of numerous HK1-like proteins. This level of conservation pinpoints the possible importance of this domain in the functionality of these receptors and could correspond to a functional osmosensing domain in plants.

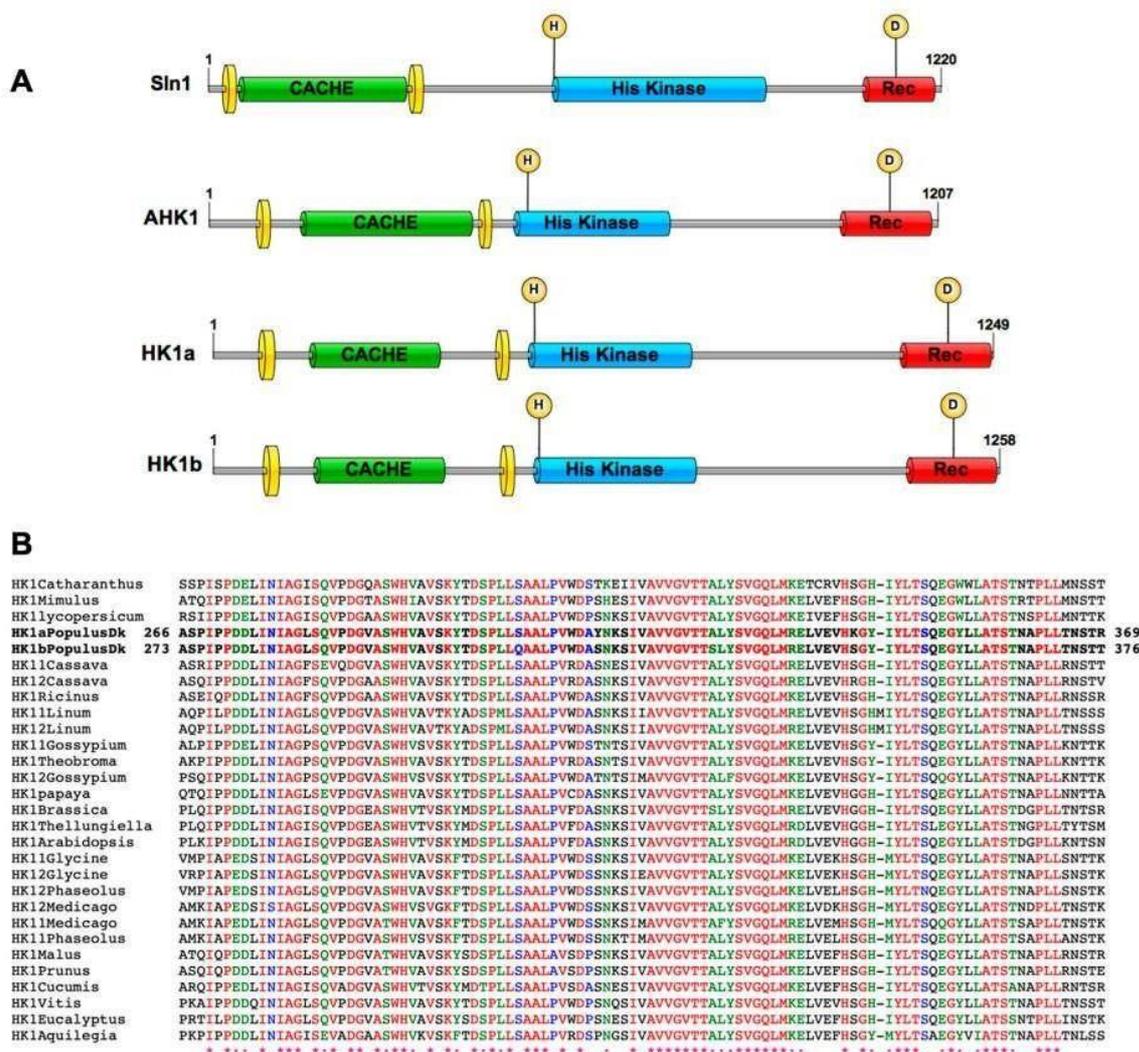


Figure 1. A cache domain is present in plant AHK1-like proteins. (A) Protein organization of Sln1 (Uniprot ID P39928), AHK1 (Uniprot ID Q9SXL4), HK1a (Uniprot ID Q571R6) and HK1b (Uniprot ID A0A1M4NDG0) is shown. All domain lengths were identified on the InterProScan analysis, except for cache domains which are based on Upadhyay et al. (2016). Transmembrane domains are represented by yellow discs; CACHE: cache domain; His Kinase: histidine kinase domain; Rec: Receiver domain. Phosphorylation sites are shown with an H (histidine) and D (Aspartate) in a yellow circle.

(B) Alignment of HK1a/b ECD with homologous receptors in different plant species. Sequences from poplar are indicated in bold and amino acids positions of this ECD sequence segment are indicated on the left and right of these poplar sequences. Species names and sequence references are presented in the Section 4. * indicate identical amino acids, : indicate strongly similar amino acids and . indicate weakly similar amino acids. Letters in colour correspond to conserved amino acids and black letters to non-conserved amino acids.

2.2. Modelling-Assisted Rational Design of Cache Domain Mutants

Since a cache domain corresponds to small ligand-binding domain, we were interested to know whether the cache domain of our poplar HK1a/b could also bind small molecules, unknown so far, to trigger their osmosensing activity. As a first step, we tried to model the 3D structure of the full HK1a and HK1b ECD in order to define potential positions in interaction with a ligand within the cache domain. These 3D models were built using a method based on deep learning neural networks [26].

These models were then submitted to the DALI server to identify structural homologues among a subset of representative Protein Data Bank (PDB) structures (database PDB25) [27]. The closest structure to both HK1a and HK1b was the cache domain of the histamine receptor TlpQ, from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, with a bound histamine (PDB 6FU4) [28]. Both models were superimposed to this structure and three zones in HK1a and HK1b models in close proximity of the ligand were defined (Figure 2). Thus, we selected identical positions in both proteins, corresponding to polar or charged amino acids, that could interact with a bound ligand through electrostatic or H-bond interactions, and mutated them to alanine to suppress these. The targeted residues were K296, S304 and T324 (resp. K303, Q311, T331) in HK1a (resp. HK1b) sequences.

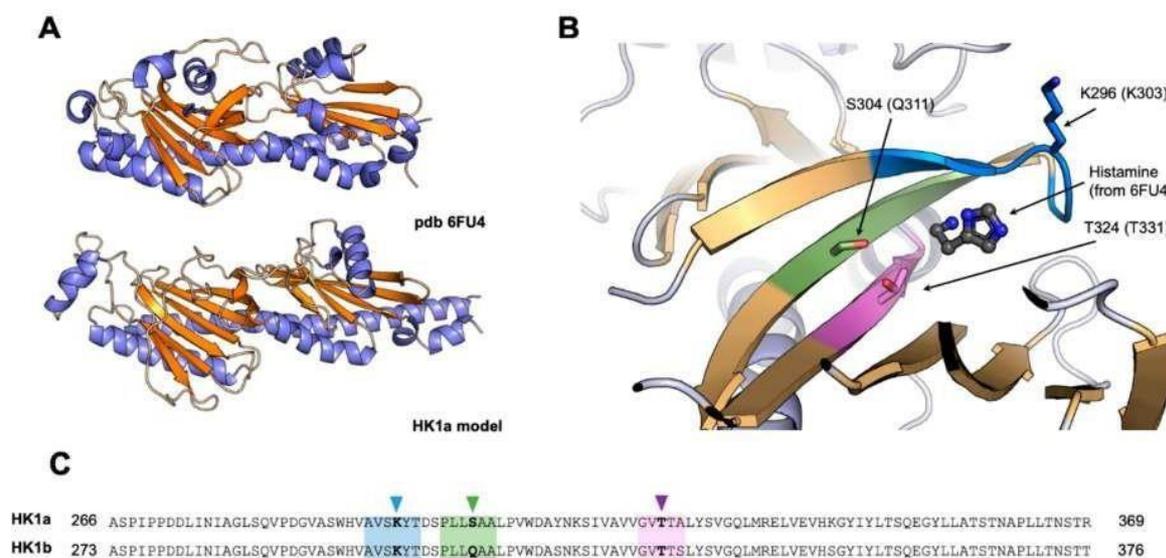


Figure 2. Selection of mutants involved in ligand binding in HK1a and HK1b. (A) Structural comparison between HK1a model and *P. aeruginosa* histamine receptor (PDB 6FU4). Helices and sheets are respectively coloured in blue and orange. (B) Close view of the putative binding site of HK1a, with the histamine bound from 6FU4, after the structural alignment of HK1a model and 6FU4 structure. The closest zones in contact with histamine are respectively coloured in blue, green and pink. The selected residues for mutagenesis are depicted in ball and sticks and labelled with the HK1a sequence numbering (HK1b). (C) Sequence alignment of HK1a and HK1b. The zones highlighted in panel (B) are identically coloured, and mutated residues are highlighted with arrows.

2.3. Functional Test of Cache Domain Mutants

In order to test these mutants, we performed a complementation assay in a *S. cerevisiae* deletion mutant strain (MH179) where the two proteins involved in osmosensing

were deleted (*sln1Δ sho1Δ*). These deletions are lethal due to constitutive HOG pathway activation, but viability can be restored by expression of the phosphatase Ptp2, induced by galactose, which dephosphorylates Hog1 in the nucleus, thus inhibiting its transactivation of response genes.

This strain was transformed with plasmids carrying the wild type (WT) or mutated cDNAs of HK1a (T324A/S304A/K296A and triple mutant TSK) and HK1b (T331A/Q311A/K303A and triple mutant TQK), along with plasmids corresponding to positive (SLN1) and negative (pYX212) control. The complemented mutant yeasts were tested for their capacity to grow on normal or high-osmolarity mediums. The survival of all transformants is allowed on galactose medium (–U + Gal). On glucose medium (–U + Glu), inhibition of HOG response by Ptp2 is released and lethal phenotype can be observed, unless the expressed osmosensor restores the yeast osmodeficiency. We applied osmotic stress with increasing concentration of NaCl, as well as polyethylene glycol 6000 (PEG₆₀₀₀) infused into the medium (Figure 3).

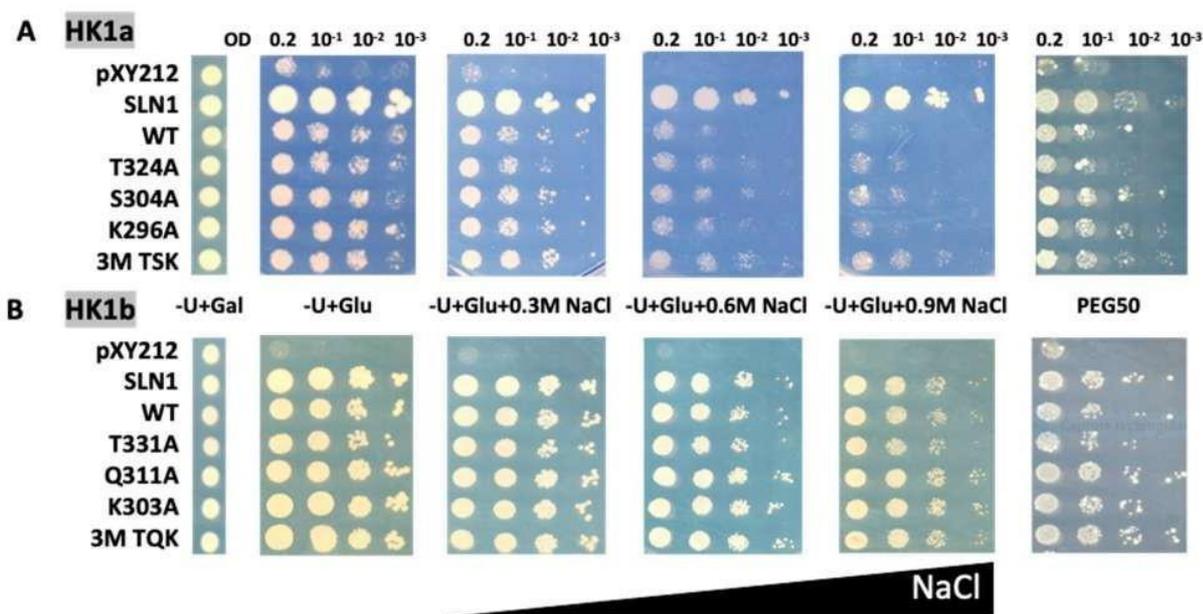


Figure 3. Functional complementation test for cache mutants of HK1a (A) and HK1b (B) in presence of NaCl or PEG₆₀₀₀ stresses. The osmodeficient strain (MH179) was transformed with the negative (pYX212 empty vector) and positive (SLN1) controls, as well as with wild type constructs (WT) and single point mutation constructs of HK1a (T324A, S304A, K296A) and HK1b (T331A, Q311A, K303A), or triple point mutation constructs of HK1a (3M TSK) and HK1b (3M TQK). Transformants were spotted onto galactose containing medium (–U + Gal) for growth control and onto glucose containing medium, without (–U + Glu) or with increasing NaCl concentrations (0.3, 0.6 and 0.9 M), or infused PEG₆₀₀₀ 50% *w/v* (PEG50), for osmotic tolerance test. Growth tests are representative of four independent replicates as serial 10-fold dilutions from an OD₆₀₀ = 0.2, as indicated.

Under NaCl stress conditions, the transformed yeast cells expressing single point mutants of the HK1a cache domain grew better than WT HK1a yeast cells, as observed at 0.6 and 0.9 M NaCl (Figure 3A). This positive effect is more obvious for triple point mutants (3M TSK). However, in the case of HK1b, the improved growth observed for HK1a mutants was not seen, even on 0.9 M NaCl medium with the triple mutant (3M TQK, Figure 3B).

To consolidate these results, we tested the response of these HK1a/b mutants with another type of osmotic stress, PEG₆₀₀₀ at 50% (*m/v*), infused into the medium (PEG50). This osmotic agent, as a non-permeant molecule, allows osmotic stress without the ionic component of salt stress. The osmotic strength of each medium was measured to compare the PEG stress medium to the NaCl stress medium (Table S1). This measurement showed

that the PEG50 medium osmolarity is between the NaCl 0.3 M and 0.6 M medium osmolarity. As shown in Figure 3, in the presence of PEG50, the mutations also appeared to improve osmosensing for HK1a, and a positive effect was observed even for HK1b, more notably for triple mutants. These results indicated that these ECD mutants improved the osmosensing response of HK1a and HK1b. Altogether, our results supported the involvement of the mutated positions in the response to osmotic stress.

As previously observed [14], HK1a and HK1b have divergent functionality in response to osmotic stress, with HK1b allowing a better response than HK1a. In order to determine whether the cache domain could be responsible for this difference, we tested these two receptors with exchanged cache domains by domain swapping. Therefore, HK1a with HK1b cache domain, and vice versa, were constructed and tested in our osmodeficient yeast strain (Figure 4).

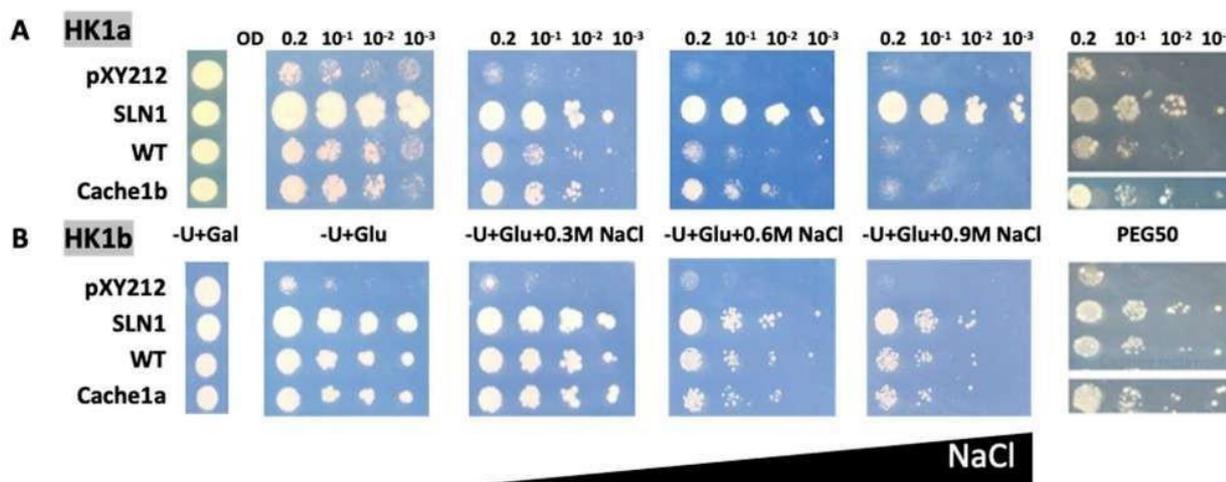


Figure 4. Functional complementation test for cache domain exchange mutants of HK1a (A) and HK1b (B) in presence of NaCl or PEG₆₀₀₀ stresses. The osmodeficient strain (MH179) was transformed with the negative (pXY212 empty vector) and positive (SLN1) controls, as well as with wild type constructs (WT) and cache domain exchange constructs (HK1a: cache1b residues 121–437 and HK1b: cache1a residues 121–445). Transformants were spotted onto galactose containing medium (–U + Gal) for growth control and onto glucose containing medium (–U + Glu), without or with increasing NaCl concentrations (0.3, 0.6 and 0.9 M) or infused PEG₆₀₀₀ 50% *w/v* (PEG50), for osmotic tolerance test. Growth tests are representative of four independent replicates as serial 10-fold dilutions from an OD₆₀₀ = 0.2, as indicated.

Considering HK1a cache domain exchange mutant under salt stress, the growth was improved compared to WT HK1a, as observed at 0.6 M NaCl, which corresponds to the highest concentration allowing HK1a growth. The same positive effect of cache domain exchange was observed in the PEG stressed condition (Figure 4A). For the HK1b exchange mutant, the expected opposite effect was not observed, since there was no difference in growth between WT and ECD exchange mutant, even on the PEG stressed medium (Figure 4B). This could be due to the strong response of HK1b to stress, even on 0.9 M NaCl medium, which impaired the observation of any differences. Nevertheless, these results indicated that the cache domain contains important elements for the osmosensing function of HK1a/b.

2.4. Functional Test of TM Mutants

In order to test the impact of the TM domain in the functionality of our poplar HK1 receptors, we performed exchange domain experiments. In both HK1s, TM2 domain sequences (HK1a residues 453–475 and HK1b residues 461–483) differed from only one amino acid. Consequently, we performed the exchange of TM2 domain between HK1a

and HK1b by a single point mutation (F470C mutation in HK1a and C478F mutation in HK1b). This domain swapping was also tested in combination with cache domain exchange (Figure 5).

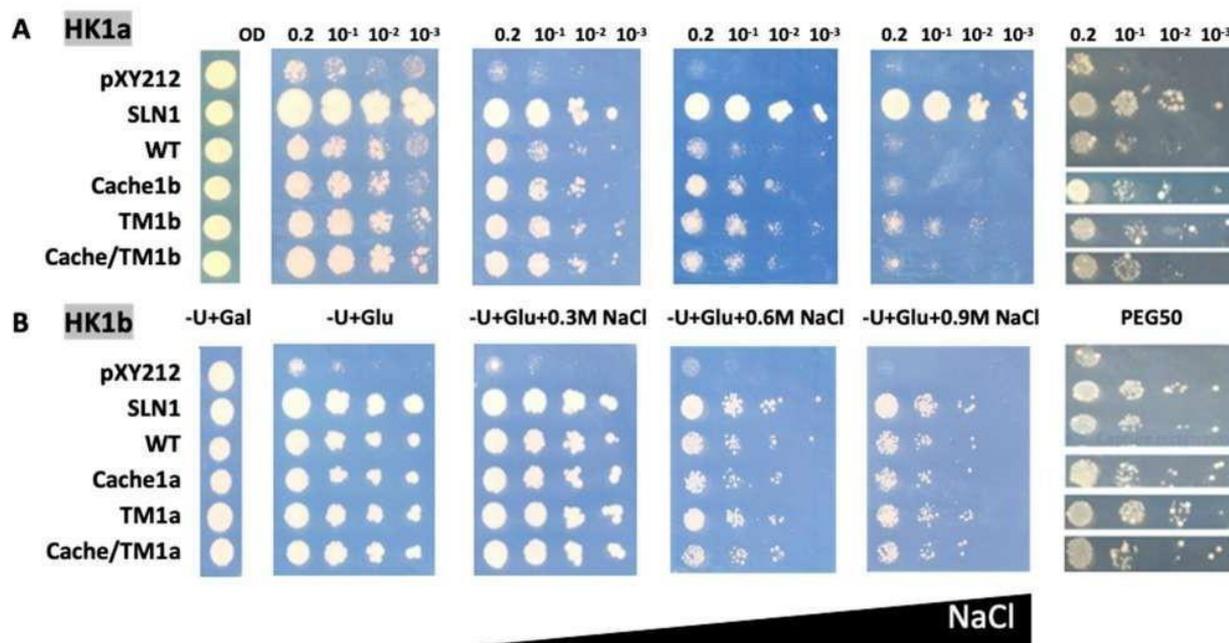


Figure 5. Functional complementation test for TM mutants of HK1a (A) and HK1b (B) in presence of NaCl or PEG₆₀₀₀ stresses. The osmodeficient strain (MH179) was transformed with the negative (pXY212 empty vector) and positive (SLN1) controls, as well as with wild type constructs (WT) and single cache domain exchange constructs (HK1a: cache1b residues 121–437 and HK1b: cache1a residues 121–445), TM2 exchange constructs (HK1a: TM1b with F470C mutation and HK1b: TM1a with C478F mutation) or double exchange constructs of HK1a cache/TM1b) and HK1b (cache/TM1a). Transformants were spotted onto galactose containing medium (–U + Gal) for growth control and onto glucose containing medium (–U + Glu), without or with increasing NaCl concentrations (0.3, 0.6 and 0.9 M) or infused PEG₆₀₀₀ 50% *w/v* (PEG50), for osmotic tolerance test. Growth tests are representative of four independent replicates as serial 10-fold dilutions from an OD₆₀₀ = 0.2, as indicated.

In the case of HK1a, the TM domain exchange mutant (TM1b) exhibited better growth compared to WT, even on 0.9 M NaCl medium, overpassing cache domain exchange mutant (cache1b), which allowed a better growth on 0.6 NaCl medium only. Furthermore, this positive effect was still present on PEG50 medium (Figure 5A). However, no additive effect was observed for the double exchange mutant (cache/TM1b) on all stressed media. For HK1b, the exchange of the TM domain did not appear to decrease osmosensing, either in the presence of NaCl or PEG stresses (Figure 5B). The same reason as the one mentioned in the paragraph above could explain this fact. Thus, all these observations point to the implication that the TM2 domain has better efficiency of HK1b in response to osmotic stress.

Since no effect of the cache and TM domain exchanges are observed for HK1b, we assume that this discrepancy with HK1a exchange mutants may be due to the strong growth of HK1b, even in a stress condition as high as 0.9 M NaCl medium. Thus, in order to observe a possible effect, we challenged these HK1b mutants with stronger stress conditions (Figure 6).

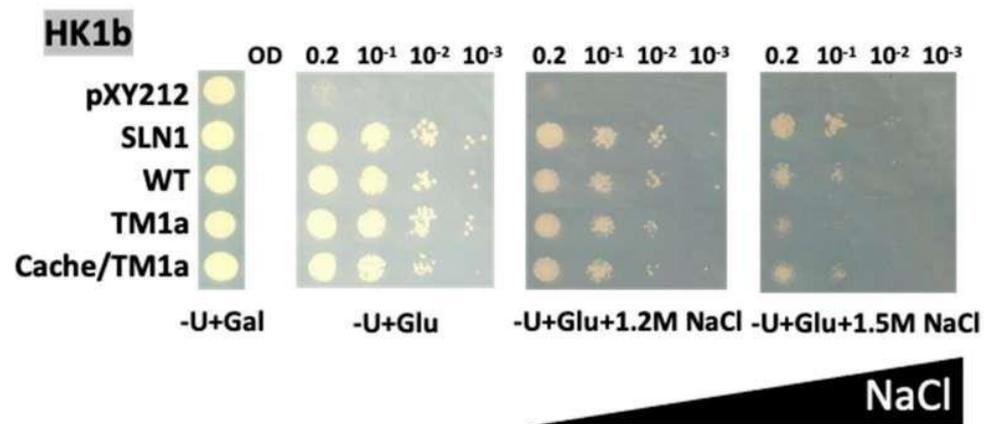


Figure 6. Functional complementation test for domain exchange mutants of HK1b on strong NaCl stress medium. The osmodeficient strain (MH179) was transformed with the negative (pXY212 empty vector) and positive (SLN1) controls, as well as with wild type constructs (WT) and single cache domain exchange constructs (cache1a residues 121–445), TM2 exchange constructs (TM1a with C478F mutation) or double exchange constructs of HK1b (cache/TM1a). Transformants were spotted onto galactose containing medium (–U + Gal) for growth control and onto glucose containing medium (–U + Glu), with increasing NaCl concentrations (1.2 and 1.5 M), for osmotic tolerance test. Growth tests are representative of three independent replicates as serial 10-fold dilutions from an $OD_{600} = 0.2$, as indicated.

With these high NaCl concentrations, we were able to observe a decreasing effect of TM domain exchange (TM1a) on HK1b. The negative effect was slightly visible on 1.2M NaCl but became more noticeable on 1.5 M NaCl medium (Figure 6). The double domain exchange mutant (cache/TM1a) did not show any difference in growth compared to WT HK1b, suggesting that the major effect observed is due to the TM2 domain, as observed in Figure 5 with HK1a. These results confirmed our assumption about the absence of effect for HK1b mutants on low NaCl concentration and strengthened our conclusion that the cache domain, and most of the TM2 domain, is involved in the osmosensing function of both HK1s.

3. Discussion

As sessile organisms, plants must cope with abiotic stress, such as soil salinity, drought and extreme temperatures. Drought stress is one of the most serious abiotic stresses that have profound effects on plant growth and survival. Understanding the biochemical and molecular mechanisms for drought stress perception, transduction and tolerance is still a major challenge in sustaining crop yield [2]. Faced with the osmotic stress generated by a water deficit, plants have several osmoprotection systems at their disposal, which include avoidance and tolerance to adapt to adverse conditions [29,30]. The HK1 MSP pathway could be one of the signalling pathways involved in osmotic stress perception, leading to these osmoprotection systems.

In the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, the osmosensing pathway employs Sln1 as an osmosensor HK that monitors changes in turgor pressures [7]. Furthermore, it has been reported that cache domain, which corresponds to a small ligand-binding domain [23], is present in the extracellular region of this yeast osmosensor, as well as in plant HKs AHK1 and HK1a/b [22]. On the other hand, several studies have demonstrated the importance of TM domains in the function of HK receptors. It has been shown, by domain swapping analysis between Sln1 and the Arabidopsis CK receptor AHK4, that TM domains are essential for Sln1 function [7]. After using a bacterial expression system, as well as a yeast system, constitutively active mutants (gain-of-function) of AHK4 were isolated with mutation in the second TM domain [24]. In the same way, a forward genetic approach in Arabidopsis plants revealed novel gain-of-function mutants mutated in the last TM domain

(TM4) in AHK2 [25]. Indeed, the last TM domain has a strategic position since it bridges the extracellular part to the intracellular part of the receptor, acting as a transmitter segment of the signal from the outside to the inside of the cell. In prokaryotes, the chemotaxis receptor Tlp3 from *Campylobacter jejuni* possesses a cache domain, and structural studies have revealed a downward displacement of the TM helix 2 towards the cytoplasm upon ligand binding to its cache domain [31]. This movement suggests a piston mechanism to transmit the signal through the TM domain, emphasizing the peculiar role of this domain.

By referring to these bibliographic data, in this present study, we demonstrated, experimentally, the importance of cache and TM domains in HK1 receptors of *Populus* and identified determinants that could be involved in HK1s response to osmotic stress. Through a genetic analysis, we tested point mutations in the cache domain of both HK1s and domain exchange mutants by cache and/or TM2 domains swapping. These mutants were tested in our osmodeficient yeast strain in order to carry out functional complementation assays in the presence of NaCl and PEG₆₀₀₀ stresses.

Our results showed that, in the presence of stress NaCl or PEG₆₀₀₀, the three mutated positions in HK1a and HK1b conferred an improved osmotic stress response compared to WT, supporting the implication of these amino acids in osmosensing function. These three positions correspond to homologous positions of three amino acids involved in ligand binding of the histamine chemoreceptor of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Therefore, our results suggest that the amino acids in both HK1s may also be involved in the binding of a ligand, though this remains to be determined. Consistently, it has been demonstrated in *S. cerevisiae* that the cell wall protein Cw12 can affect the activation of Sln1, allowing the authors to postulate that physical contact between Sln1 and some cell wall or periplasmic component may occur [32]. Thus, it is tempting to speculate that poplar HK1s may contact small molecules from the plant cell wall, or the apoplasm compartment, through the three amino acids identified in this study. Whether this contact is triggered or lost by stress remains to be determined. Nonetheless, whatever the perception mechanism is, our results show that elements in the cache domain, within the ECD, play a role in HK1s osmosensing function. It is noteworthy that, in *S. cerevisiae*, it has been shown that the integrity of the ECD is essential for Sln1 function [7]. Interestingly, a functional similarity between this yeast osmosensor and the Arabidopsis AHK4, upon CK presence, was shown. The plant HK is a CK receptor with global structural similarities, showing all HK proteins, but contains a CK-binding (CHASE) domain in its ECD [33,34]. Since AHK4 is mainly located at the endoplasmic reticulum in plants [10,35], and is mainly active in this sole subcellular compartment [36,37], the ability of this protein to act functionally as the yeast osmosensor is more likely due to structural resemblance, rather than true osmosensor function. However, CK HK receptors do have a role in response to osmotic stress. With gain-of-function and loss-of-function mutants of *AHK1*, *AHK2*, *AHK3* and *AHK4*, it was shown in Arabidopsis that *AHK1* acts as a positive regulator in osmotic stress response and *AHK2-3-4* act as negative regulators [9]. These antagonistic actions led to the hypothesis of a Yin-Yang balance between CK homeostasis and plant drought adaptation [38]. For our poplar HK1s, as a first step in the *in planta* involvement in drought response, it would be interesting to test these receptors in an Arabidopsis *ahk1* mutant line by complementation assay in stress conditions. In such *in planta* assays, the use of the cache domain mutants characterized in this study would allow us to confirm the contribution of these domains to the osmotic stress response in a plant background. Furthermore, the study of these two receptors, directly into *Populus* lines, would definitely bring information in the genuine homologous background. Such analyses with poplar mutant lines (overexpressed or knock-out) are currently under investigation.

In order to identify the determining factors in the differential response to osmotic stress between HK1a and HK1b, we tested mutants by cache and/or TM2 domain swapping. We showed that HK1a, with cache or TM2 domains of HK1b, exhibited a better tolerance to osmotic stress than WT HK1a. This result implies that these domains are responsible, at least in part, for the better osmosensing efficiency of HK1b. These results were in agreement

with those observed for Sln1 [7], AHK4 [24] and AHK2 [25], where the last TM domain is important for HKs function. In the case of HK1b, as we assumed, the decreasing effect was observed only on higher concentrations of NaCl (1.2 or 1.5 M), revealing the importance of these two domains in HK1b function too. Finally, yeasts expressing HK1a with HK1b cache, and TM2 domains, showed a better tolerance to osmotic stresses, but still less than that observed for yeasts expressing WT HK1b. This suggests that some other elements in HK1b must be involved in its response. This observation fully supports previous results about HK1b efficiency compared to HK1a [14]. Indeed, it was demonstrated that HK1b was more permissive towards canonical phosphorylation sites than HK1a, and that other amino acids could provide alternative phosphorylation sites. Therefore, better efficiency determinants of HK1b may lie in the cytoplasmic part of this receptor.

In summary, this study provided clues about the involvement of cache domain in the functionality of HK1 receptors. We found three amino acids in this domain that may play a role in osmotic stress response. This result shows the functional importance of this domain in poplar HK1s and, given that a cache domain is present in a wide range of plant HK1-like proteins, we can hypothesize that the involvement of this domain may be a general feature in plant osmosensing. Furthermore, the TM2 domain appears to be one of the factors responsible for the differential response observed between both HK1s. These new results shed some light on the functionality of HK1 receptors in osmosensing.

As a next step, it could be interesting to explore the role of the cytoplasmic part of the HK1b receptor in the differential response, alone or in combination with other domains (cache or TM2), so we can precisely define all the determining elements in its efficiency. Moreover, further experiments at the structural level could bring valuable information on cache domain function. Structural determination of such a domain in plants would definitively provide precious insights since no structural data exist for a plant cache domain in the PDB. This approach is currently under progress. Finally, since this cache domain is involved in osmosensing and corresponds to a small ligand-binding domain, the identification of such a ligand would provide unprecedented clues to understanding the osmosensing mechanism. We are currently exploring this question with the use of an original reporter system to screen for molecules able to bind poplar HK1s. The determination of the true ligand responsible for osmotic stress response will definitely lead to valuable applications in developing drought tolerant plants for sustainable agriculture.

4. Materials and Methods

4.1. Identification of Cache Domain in Plant AHK1-like Proteins

According to Upadhyay et al. (2016), a cache domain is present in poplar HK1a from aa 154 to aa 364. Therefore, we aligned sequences of HK1a/b ECD (starting from the end of the first TM domain to the beginning of the second TM domain) with ECD sequences from 27 plant AHK1-like proteins. Amino acid sequences of HK1a (accession No AJ937747) and HK1b (accession No LT622839) were aligned by Clustal Omega (www.ebi.ac.uk/Tools/services/rest/clustalo, accessed on 13 February 2023) or Clustal W (<https://npsa-prabi.ibcp.fr>, accessed on 13 February 2023) with Arabidopsis (*A. thaliana*, AT2G17820), saltwater cress (*T. halophila*, XM_006409179), papaya (*C. papaya*, evm.TU.supercontig_6.277), cocoa (*T. cacao*, Thecc1EG000177), cotton (*G. raimondii*, Gorai.007G049200 and Gorai.003G008400), peach (*P. persica*, Prupe.7G170700), apple (*M. domestica*, MDP0000276711), rose gum (*E. grandis*, Eucgr.I02335), grape vine (*V. vinifera*, GSVIVG01018749001), tomato (*S. lycopersicum*, Solyc02g083680), Madagascar periwinkle (*C. roseus*, AF534893), yellow monkeyflower (*M. guttatus*, Migut.L00691), purple willow (*S. purpurea*, SapurV1A.0698s0020 and SapurV1A.0130s0330), castor bean (*R. communis*, 29656.t000014), cassava (*M. esculenta*, Manes.02G106100 and Manes.01G147600), flax (*L. usitatissimum*, Lus10041891.g and Lus10028438.g), barrel clover (*M. truncatula*, Medtr5g022470 and Medtr8g075340), common bean (*P. vulgaris*, Phvul.002G107100 and Phvul.003G264600) and soybean (*G. max*, Glyma01g36950, Glyma11g08310 and Glyma02g05220). A portion of this alignment is shown in Figure 1.

The determination of secondary structures was performed with the “Secondary structure consensus prediction” program of NPS@ web server from the Pôle Rhône-Alpes de BioInformatique (<https://npsa-prabi.ibcp.fr>, accessed on 13 February 2023).

4.2. Modelling-Assisted Rational Design of Mutants

The ECD peptide sequences of HK1a (residues 100–451) and HK1b (residues 107–458) (uniprot accession codes Q571R6 and A0A1M4NDG0, respectively) were submitted to the ROBETTA server (<http://robetta.bakerlab.org>), and the 3D structure prediction was based on RoseTTAFold deep learning methodology [24]. The best models, according to the Robetta score, out of the 5 generated for each protein, were selected for analysis. Briefly, Pymol software (<https://www.pymol.org/pymol>, accessed on 13 February 2023) was used to superimpose the HK1a and HK1b ECD models to the *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 cache domain bound with histamine. Selection of the residues, located 5 Å from the histamine in HK1a and HK1b models, enabled the identification of the putative ligand binding regions that were targeted for site-directed mutagenesis.

4.3. Construction of HK1a/b Mutants

Point mutations in HK1a and HK1b full-length CDS sequences were introduced by PCR with specific mutated primers (Table S2) to create single mutants into pGEM-T (Promega, Madison, WI, USA) plasmid. The point mutations for HK1a mutants (resp. HK1b mutants) were as follows: K296A = AA886-887GC, S304A = T910G and T324A = A970G (resp. K303A = AA907-908GC, Q311A = CA931-932GC and T331A = A991G). Then, triple mutants were obtained after 3 rounds of mutations by site-directed mutagenesis, using primers carrying the mutation of interest. The resulting mutated HK1a/b constructs were subcloned into the yeast plasmid pYX212 (*EcoRI-HindIII*) by homologous recombination in yeast. DNA sequencing confirmed the presence of the desired mutations and that no undesired mutations were present.

Domain exchange mutations in HK1a and HK1b sequences were introduced by PCR, with specific primers (Table S2), to create mutants by cache/TM2 domain exchange. TM mutants for HK1a: F470C = T1409G. TM mutants for HK1b: C478F = G1433T. Cache domain mutants for HK1a: cache domain HK1b residues 121–437. Cache domain mutants for HK1b: cache domain HK1a residues 121–445. To create the double mutant by domain exchange HK1b, the mutated sequence was recovered from yeast by PCR, then cloned into pJET1.2/blunt vector (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) by simple ligation to obtain the simple mutant by domain exchange HK1b, on which was performed a site-directed mutagenesis to create the double mutant. For HK1a double mutant, mutation was introduced on the simple mutant by PCR, with specific mutated primers. The resulting mutated sequences were cloned into the yeast plasmid pYX212 (*EcoRI-HindIII*) by homologous recombination. The correct mutated sequences were confirmed by sequencing.

4.4. Complementation Analysis of the *sln1Δ sho1Δ* Deletion Mutant MH179

The pPD2133 plasmid, expressing the Sln1 osmosensor, was used as a positive control (pPD-Sln1) and the empty pYX212 vector was used as a negative control. The yeast strain MH179 (*ura3 leu2 his3 sln1::LEU2 sho1::TRP1* + pGP22, with pGP22: *GALp-PTP2/pRS413 (HIS3, CEN)*) was used for transformation, according to [39], with all the constructs expressing WT or mutated HK1a/1b. Yeast cells were grown on galactose-containing medium lacking uracil (–U + Gal), for transformation control, and spotted onto –U + Glu medium in the absence or presence of 0.3 M, 0.6 M, 0.9 M NaCl for 4 days at 30 °C, for osmosensing complementation tests. When 1.2 or 1.5 M NaCl was applied, 5 to 7 days of culture were necessary. Tests with PEG50 medium were performed on –U + Glu medium infused with Polyethylene glycol 6000 (50% *w/v*) overnight. Three 10-fold dilution series, starting from an OD₆₀₀ 0.2, was realized and 5 µL of each were spotted onto medium.

The osmolarity measurement was performed with a micro-osmometer (Roebbling type 13DR) on liquid solutions. The PEG gel medium was melted before measurement. Results are the mean of 3 repeats.

Supplementary Materials: The supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms24076318/s1>.

Author Contributions: S.C. and F.H. conceived and designed the experiments; H.M. and M.L. performed the experiments; P.L. performed the 3D modelling and amino acids targeting for mutagenesis analysis; F.C., F.L., C.D., M.T. and T.M. contributed to reagents/materials/analysis tools; H.M., F.H. and S.C. wrote the paper. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research and the APC were funded by Region Centre Val-de-Loire grant number ProBioSec 20019LBL0000LBL.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: No new data were created or analyzed in this study. Data sharing is not applicable to this article.

Acknowledgments: We thank Bouchra El Bouzidi and Océane Quin for technical assistance. This work was supported by the Conseil Régional du Centre-Val de Loire (ProBioSec project, 20019LBL0000LBL). Hanae Makhokh was supported by Ph.D. grants from the Conseil Régional du Centre-Val de Loire (France).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funding sponsors had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, and in the decision to publish the results.

References

1. Haswell, E.S.; Verslues, P.E. The ongoing search for the molecular basis of plant osmosensing. *J. Gen. Physiol.* **2015**, *145*, 389–394. [CrossRef]
2. Nongpiur, R.C.; Singla-Pareek, S.L.; Pareek, A. The quest for osmosensors in plants. *J. Exp. Bot.* **2020**, *71*, 595–607. [CrossRef] [PubMed]
3. Miermont, A.; Uhlendorf, J.; McClean, M.; Hersen, P. The Dynamical Systems Properties of the HOG Signaling Cascade. *J. Signal. Transduct.* **2011**, *2011*, 930940. [CrossRef]
4. Maeda, T.; Wurgler-Murphy, S.M.; Saito, H. A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature* **1994**, *369*, 242–245. [CrossRef]
5. Posas, F.; Wurgler-Murphy, S.M.; Maeda, T.; Witten, E.A.; Thai, T.C.; Saito, H. Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 “two-component” osmosensor. *Cell* **1996**, *86*, 865–875. [CrossRef] [PubMed]
6. Lu, J.M.Y.; Deschenes, R.J.; Fassler, J.S. Saccharomyces cerevisiae histidine phosphotransferase Ypd1p shuttles between the nucleus and cytoplasm for SLN1-dependent phosphorylation of Ssk1p and Skn7p. *Eukaryot. Cell* **2003**, *2*, 1304–1314. [CrossRef]
7. Reiser, V.; Raitt, D.C.; Saito, H. Yeast osmosensor Sln1 and plant cytokinin receptor Cre1 respond to changes in turgor pressure. *J. Cell Biol.* **2003**, *161*, 1035–1040. [CrossRef] [PubMed]
8. Urao, T.; Yakubov, B.; Satoh, R.; Yamaguchi-Shinozaki, K.; Seki, M.; Hirayama, T.; Shinozaki, K. A transmembrane hybrid-type histidine kinase in Arabidopsis functions as an osmosensor. *Plant Cell* **1999**, *11*, 1743–1754. [CrossRef] [PubMed]
9. Tran, L.-S.P.; Urao, T.; Qin, F.; Maruyama, K.; Kakimoto, T.; Shinozaki, K.; Yamaguchi-Shinozaki, K. Functional analysis of AHK1/ATHK1 and cytokinin receptor histidine kinases in response to abscisic acid, drought, and salt stress in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 20623–20628. [CrossRef]
10. Caesar, K.; Thamm, A.M.K.; Witthöft, J.; Elgass, K.; Huppenberger, P.; Grefen, C.; Horak, J.; Harter, K. Evidence for the localization of the Arabidopsis cytokinin receptors AHK3 and AHK4 in the endoplasmic reticulum. *J. Exp. Bot.* **2011**, *62*, 5571–5580. [CrossRef]
11. Wohlbach, D.J.; Quirino, B.F.; Sussman, M.R. Analysis of the Arabidopsis histidine kinase ATHK1 reveals a connection between vegetative osmotic stress sensing and seed maturation. *Plant Cell* **2008**, *20*, 1101–1117. [CrossRef]
12. Kumar, M.N.; Jane, W.N.; Verslues, P.E. Role of the putative osmosensor Arabidopsis histidine kinase1 in zdehydration avoidance and low-water-potential response. *Plant Physiol.* **2013**, *161*, 942–953. [CrossRef]
13. Chefdor, F.; Bénédetti, H.; Depierreux, C.; Delmotte, F.; Morabito, D.; Carpin, S. Osmotic stress sensing in Populus: Components identification of a phosphorelay system. *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 77–81. [CrossRef] [PubMed]

14. Héricourt, F.; Chefdor, F.; Djeghdir, I.; Larcher, M.; Lafontaine, F.; Courdavault, V.; Auguin, D.; Coste, F.; Depierreux, C.; Tanigawa, M.; et al. Functional Divergence of Poplar Histidine-Aspartate Kinase HK1 Paralogs in Response to Osmotic Stress. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 2061. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Héricourt, F.; Chefdor, F.; Bertheau, L.; Tanigawa, M.; Maeda, T.; Guirimand, G.; Courdavault, V.; Larcher, M.; Depierreux, C.; Bénédicti, H. Characterization of histidine-aspartate kinase HK1 and identification of histidine phosphotransfer proteins as potential partners in a Populus multistep phosphorelay. *Physiol. Plant.* **2013**, *149*, 188–199. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Bertheau, L.; Chefdor, F.; Guirimand, G.; Courdavault, V.; Depierreux, C.; Morabito, D.; Brignolas, F.; Héricourt, F.; Carpin, S. Identification of five B-type response regulators as members of a multistep phosphorelay system interacting with histidine-containing phosphotransfer partners of Populus osmosensor. *BMC Plant Biol.* **2012**, *12*, 241. [[CrossRef](#)]
17. Bertheau, L.; Miranda, M.; Foureau, E.; Rojas Hoyos, L.F.; Chefdor, F.; Héricourt, F.; Depierreux, C.; Morabito, D.; Papon, N.; Clastre, M.; et al. In planta validation of HK1 homodimerization and recruitment of preferential HPt downstream partners involved in poplar multistep phosphorelay systems. *Plant Biosyst.—Int. J. Deal. Asp. Plant Biol.* **2013**, *147*, 991–995.
18. Bertheau, L.; Djeghdir, I.; Foureau, E.; Chefdor, F.; Glevarec, G.; Oudin, A.; Depierreux, C.; Morabito, D.; Brignolas, F.; Courdavault, V.; et al. Insights into B-type RR members as signaling partners acting downstream of HPt partners of HK1 in the osmotic stress response in Populus. *Plant. Physiol. Biochem.* **2015**, *94*, 244–252. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Chefdor, F.; Héricourt, F.; Koudounas, K.; Carqueijeiro, I.; Courdavault, V.; Mascagni, F.; Bertheau, L.; Larcher, M.; Depierreux, C.; Lamblin, F.; et al. Highlighting type A RRs as potential regulators of the dkHK1 multi-step phosphorelay pathway in Populus. *Plant Sci.* **2018**, *277*, 68–78. [[CrossRef](#)]
20. Djeghdir, I.; Chefdor, F.; Bertheau, L.; Koudounas, K.; Carqueijeiro, I.; Lemos Cruz, P.; Courdavault, V.; Depierreux, C.; Larcher, M.; Lamblin, F.; et al. Evaluation of type-B RR dimerization in poplar: A mechanism to preserve signaling specificity? *Plant Sci.* **2021**, *313*, 111068. [[CrossRef](#)]
21. Héricourt, F.; Larcher, M.; Chefdor, F.; Koudounas, K.; Carqueijeiro, I.; Lemos Cruz, P.; Courdavault, V.; Tanigawa, M.; Maeda, T.; Depierreux, C.; et al. New Insight into HPts as Hubs in Poplar Cytokinin and Osmosensing Multistep Phosphorelays: Cytokinin Pathway Uses Specific HPts. *Plants* **2019**, *8*, 591. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Upadhyay, A.A.; Fleetwood, A.D.; Adebali, O.; Finn, R.D.; Zhulin, I.B. Cache Domains That are Homologous to, but Different from PAS Domains Comprise the Largest Superfamily of Extracellular Sensors in Prokaryotes. *PLoS Comput. Biol.* **2016**, *12*, e1004862. [[CrossRef](#)]
23. Anantharaman, V.; Aravind, L. Cache—A signaling domain common to animal Ca²⁺-channel subunits and a class of prokaryotic chemotaxis receptors. *Trends Biochem. Sci.* **2000**, *25*, 535–537. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Miwa, K.; Ishikawa, K.; Terada, K.; Yamada, H.; Suzuki, T.; Yamashino, T.; Mizuno, T. Identification of amino acid substitutions that render the Arabidopsis cytokinin receptor histidine kinase AHK4 constitutively active. *Plant Cell Physiol.* **2007**, *48*, 1809–1814. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Bartrina, I.; Jensen, H.; Novák, O.; Strnad, M.; Werner, T.; Schmülling, T. Gain-of-Function Mutants of the Cytokinin Receptors AHK2 and AHK3 Regulate Plant Organ Size, Flowering Time and Plant Longevity. *Plant. Physiol.* **2017**, *173*, 1783–1797. [[CrossRef](#)]
26. Baek, M.; DiMaio, F.; Anishchenko, I.; Dauparas, J.; Ovchinnikov, S.; Lee, G.R.; Wang, J.; Cong, Q.; Kinch, L.N.; Schaeffer, R.D.; et al. Accurate prediction of protein structures and interactions using a three-track neural network. *Science* **2021**, *373*, 871–876. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Holm, L. Dali server: Structural unification of protein families. *Nucleic Acids Res.* **2022**, *50*, W2015–W2215. [[CrossRef](#)]
28. Corral-Lugo, A.; Matilla, M.A.; Martín-Mora, D.; Silva Jiménez, H.; Mesa Torres, N.; Kato, J.; Hida, A.; Oku, S.; Conejero-Muriel, M.; Gavira, J.A.; et al. High-affinity chemotaxis to histamine mediated by the TlpQ chemoreceptor of the human pathogen. *Pseudomonas aeruginosa. mBio* **2018**, *9*, e01894-18. [[CrossRef](#)]
29. Kooyers, N.J.; Greenlee, A.B.; Colicchio, J.M.; Oh, M.; Blackman, B.K. Replicate altitudinal clines reveal that evolutionary flexibility underlies adaptation to drought stress in annual *Mimulus guttatus*. *New Phytol.* **2015**, *206*, 152–165. [[CrossRef](#)]
30. Khan, A.; Sovero, V.; Gemenet, D. Genome-assisted Breeding For Drought Resistance. *Curr. Genom.* **2016**, *17*, 330–342. [[CrossRef](#)]
31. Liu, Y.C.; Machuca, M.A.; Beckham, S.A.; Gunzburg, M.; Roujeinikova, A. Structural basis for amino-acid recognition and transmembrane signalling by tandem Per-Arnt-Sim (tandem PAS) chemoreceptor sensory domains. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **2015**, *71*, 2127–2136. [[CrossRef](#)]
32. Shankarnarayan, S.; Malone, C.L.; Deschenes, R.J.; Fassler, J.S. Modulation of yeast Sln1 kinase activity by the CCW12 cell wall protein. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 1962–1973. [[PubMed](#)]
33. Inoue, T.; Higuchi, M.; Hashimoto, Y.; Seki, M.; Kobayashi, M.; Kato, T.; Tabata, S.; Shinozaki, K.; Kakimoto, T. Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from Arabidopsis. *Nature* **2001**, *409*, 1060–1063. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Suzuki, T.; Miwa, K.; Ishikawa, K.; Yamada, H.; Aiba, H.; Mizuno, T. The Arabidopsis Sensor His-kinase, AHK4, Can Respond to Cytokinins. *Plant Cell Physiol.* **2001**, *42*, 107–113. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Wulfetange, K.; Lomin, S.N.; Romanov, G.A.; Stolz, A.; Heyl, A.; Schmülling, T. The cytokinin receptors of Arabidopsis are located mainly to the endoplasmic reticulum. *Plant. Physiol.* **2011**, *156*, 1808–1818. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Lomin, S.N.; Myakushina, Y.A.; Arkhipov, D.V.; Leonova, O.G.; Popenko, V.I.; Schmülling, T.; Romanov, G.A. Studies of cytokinin receptor-phosphotransmitter interaction provide evidences for the initiation of cytokinin signalling in the endoplasmic reticulum. *Funct. Plant Biol. FPB* **2018**, *45*, 192–202. [[CrossRef](#)]

37. Arkhipov, D.V.; Lomin, S.N.; Myakushina, Y.A.; Savelieva, E.M.; Osolodkin, D.I.; Romanov, G.A. Modeling of Protein–Protein Interactions in Cytokinin Signal Transduction. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 2096. [[CrossRef](#)]
38. Li, W.; Herrera-Estrella, L.; Tran, L.-S.P. The Yin-Yang of cytokinin homeostasis and drought acclimation/adaptation. *Trends Plant Sci.* **2016**, *21*, 548–550. [[CrossRef](#)]
39. Gietz, R.D.; Schiestl, R.H. Transforming yeast with DNA. *Method Mol. Cell Biol.* **1995**, *5*, 255–269.

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

CHAPITRE II

Production et solubilisation des ECD des récepteurs
membranaires HK1 de peuplier

A. Contexte de l'étude et objectifs

Les récepteurs HK sont au cœur de nombreux processus cellulaires et signalétiques. Une étude approfondie de leurs domaines spécifiques, tels que le domaine senseur au sein de l'ECD, est essentielle pour comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents. Chez les plantes, les domaines senseurs de ces récepteurs sont impliqués dans la perception de phytohormones telles que l'éthylène et les CK (*Binder, 2008 ; Heyl et al., 2012*). Chez les bactéries, ces domaines senseurs sont généralement des domaines extracellulaires ou périsplasmiques qui peuvent détecter un large éventail de signaux (*Stock et al., 2000*). Parmi ceux-ci, on trouve les domaines de liaison aux petits ligands comme les acides aminés et les acides organiques (*Upadhyay et al., 2016*), les domaines sensibles aux ions métalliques (*Hoch, 2000 ; Borkovich et al., 2004*) et les domaines sensibles à la lumière des phytochromes. Ces domaines peuvent également être classés en fonction de leur structure, comme les domaines PAS et GAF, qui sont des domaines de liaison alpha-hélicoïdaux (*Zoraghi et al., 2004*).

Les recherches sur les domaines senseurs ECD des récepteurs HK chez les plantes sont limitées. Par exemple, les informations structurelles actuellement disponibles sur le domaine senseurs des HK des plantes se concentrent principalement sur le domaine CHASE, domaine de liaison des CK, de AHK4 d'*Arabidopsis* en complexe avec différentes CK (*Hothorn et al., 2011*). Ce domaine a été cristallisé en tant qu'homodimère, les hélices $\alpha 1$ et $\alpha 2$ formant l'interface de dimérisation. Il est composé d'une longue tige hélicoïdale N-terminale et de deux domaines similaires à PAS, reliés par un segment hélicoïdal. Un pont disulfure contribue à la compacité structurelle du domaine (*Pekárová et al., 2016*).

Bien que les données structurelles sur ces domaines senseurs chez les plantes soient limitées, l'analyse de ces domaines dans d'autres organismes comme les bactéries offre des pistes intéressantes pour leur caractérisation chez les plantes. Chez les bactéries, certains domaines CACHE semblables à ceux de HK1a/b (dCache_1) ont déjà été structurellement décrits. Par exemple, la protéine Tlp3, un chémorécepteur bactérien, présente une architecture spécifique (*Liu et al., 2015*). Cette protéine se caractérise par deux sous-domaines CACHE distincts : le sous-domaine distal, plus éloigné de la membrane, est structuré autour d'un feuillet bêta à six brins antiparallèles, tandis que le sous-domaine proximal présente un feuillet bêta à cinq brins antiparallèles, les deux étant associés à une longue hélice alpha 1 (**Fig. 17**).

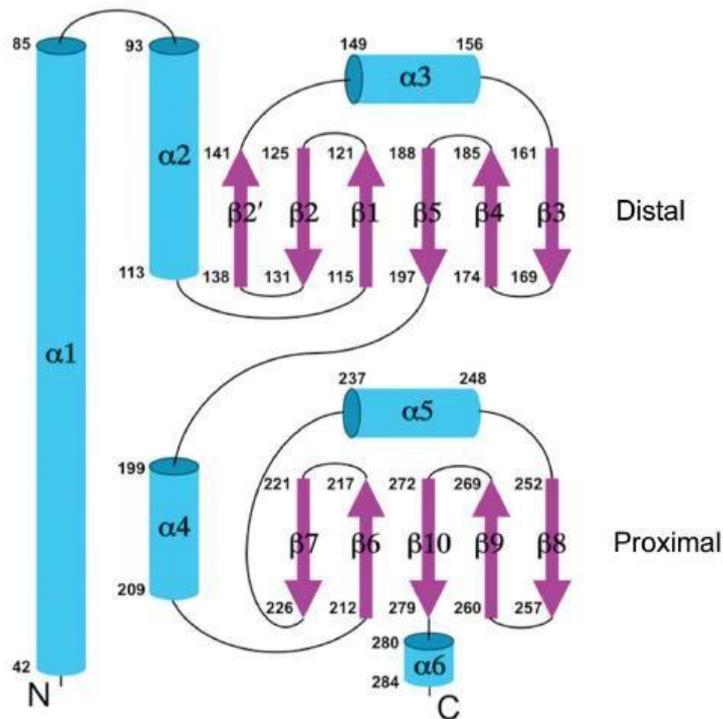


Figure 17. Topologie des éléments de structure du domaine périplasmique de la protéine Tlp3 de *Campylobacter jejuni*. D'après (Liu et al., 2015).

Dans l'état de l'art actuel, l'étude de l'ECD chez le peuplier revêt un caractère important pour la compréhension des mécanismes de détection du stress osmotique par les récepteurs HK dans les plantes.

Dans ce contexte, le présent chapitre vise à combler ces lacunes par la caractérisation biochimique de ce domaine chez les HK de peuplier. Cette étape est importante car elle permettra non seulement de déchiffrer les interactions moléculaires et les configurations structurales clés pour la fonction des récepteurs HK1, mais aussi d'aider à l'identification des ligands potentiels des récepteurs HK1.

Cette étude, initiée par la production de l'ECD des deux HK1, poursuit deux objectifs (**Fig. 18**):

- **Analyse structurale** : La résolution de la structure 3D des ECD par cristallographie permettra de comprendre les mécanismes de reconnaissance et de sélectivité des récepteurs vis-à-vis de différents ligands. Il est à noter que, bien que la structure 3D de HK1a et HK1b soit déjà disponible dans la banque de données AlphaFold Protein Structure Database, il ne s'agit que d'une prédiction dont la partie correspondant à

l'ECD présente de nombreuses zones avec un faible indice de confiance (<70% voire <50%).

- **Analyse fonctionnelle** : En utilisant les domaines purifiés, un criblage ciblé de molécules candidates présélectionnées, d'après la littérature scientifique, pourra être effectué. En effet, des ligands déjà identifiés de récepteurs procaryotes possédant le même type de domaine senseur qui pourront être testés.

Pour atteindre ces objectifs, nous suivons un plan en trois étapes (**Fig. 18**) :

- **Production** : La première étape consiste en la production des domaines senseurs ECD des deux récepteurs HK1a et HK1b dans la bactérie *E. coli*.
- **Solubilisation des domaines** : En raison des problèmes rencontrés pour la solubilisation de ces domaines, cette étape a nécessité de nombreux efforts.
- **Purification par chromatographie d'affinité** : Enfin, les domaines solubilisés seront purifiés en utilisant une chromatographie d'affinité sur nickel immobilisé.

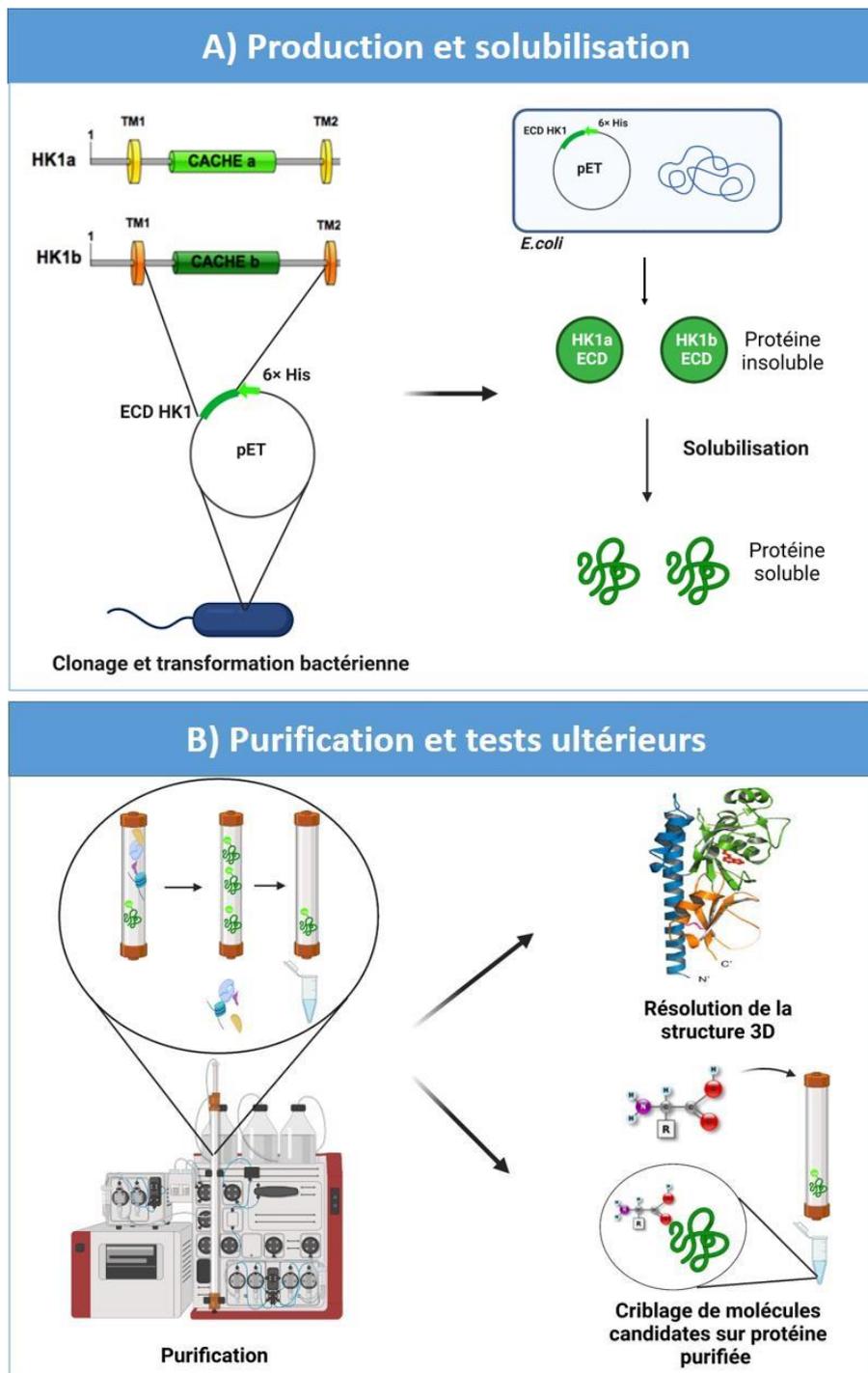


Figure 18. *Vue d'ensemble des étapes de la caractérisation biochimique des ECD des récepteurs HK1a et HK1b.*

A) Production et solubilisation : Clonage des séquences codant pour les domaines ECD de HK1a et HK1b dans un vecteur d'expression bactérien. Ceci est suivi par la production des protéines recombinantes dans la bactérie *E. coli*. **B) Purification et tests ultérieurs :** Les protéines recombinantes sont purifiées par chromatographie d'affinité sur nickel immobilisé. Les domaines purifiés serviront ensuite à résoudre leur structure tridimensionnelle et à identifier des ligands par criblage ciblé de molécules candidates, en utilisant la protéine purifiée fixée à la colonne chromatographique.

B. Résultats

1. Production bactérienne des domaines HK1a ECD et HK1b ECD dans *E. coli*

Pour progresser dans la caractérisation biochimique des ECD des récepteurs HK1a et HK1b, une expression protéique efficace et une purification réussie sont essentielles. Dans ce but, nous avons choisi d'utiliser la bactérie *E. coli* comme système hôte pour la production de ces protéines recombinantes. Nous présenterons et discuterons des résultats obtenus avec différentes méthodes d'expression.

a. Expression à partir du plasmide pET28a

Nous avons choisi le vecteur d'expression bactérienne pET28a réputé pour son efficacité dans l'expression de nombreuses protéines. Des travaux préliminaires réalisés avant mon arrivée au laboratoire ont permis de tester plusieurs conditions pour la production des ECD de HK1a et HK1b. Ces tests menés dans la souche Rosetta en utilisant le plasmide pET28a, permettent l'expression de la protéine avec un tag en N-terminal de six histidines, ce qui facilite la purification de la protéine par chromatographie d'affinité sur nickel. La souche Rosetta a été choisie en raison de ses propriétés spécifiques pour l'expression de protéines eucaryotes, notamment sa capacité à augmenter la traduction des ARNm contenant des codons rares (Rosano & Ceccarelli, 2014). Les tests réalisés préalablement ont défini une induction avec une concentration de 0,25 mM d'IPTG et 4 heures d'incubation à 37°C.

Quant aux techniques de lyse cellulaire, trois méthodes ont été testées : une lyse enzymatique (lysozyme), une lyse physique (sonication) et une lyse par choc thermique (azote liquide). Les études préalables ont permis de retenir une lyse enzymatique. Ces conditions de production ont permis d'obtenir une grande quantité de protéine mais sous forme non soluble. L'utilisation de détergents tels que le Tween 20 n'a pas conduit à une meilleure solubilité des ECD.

Au vu des résultats obtenus avec ces différents paramètres, nous avons choisi de conserver les mêmes conditions de production et de lyse cellulaire pour les tests d'expression subséquents. En complément de la souche bactérienne Rosetta, utilisée précédemment, nous avons également testé la souche BL21 comme hôte bactérien pour l'expression de ces

domaines protéiques (**Fig. 19**). Cette souche est également couramment utilisée pour la production de protéines recombinantes en grande quantité (*Rosano & Ceccarelli, 2014*) et sa simplicité par rapport à Rosetta pourrait permettre une production différente et peut-être plus soluble.

Pour les tests d'expression à partir du vecteur pET28a, la taille attendue de la protéine est d'environ 42 kDa. L'analyse du gel SDS-PAGE a montré une bande d'environ 42 kDa après induction (I), ce qui indique que les ECD sont effectivement exprimés (**Fig. 19**). Toutefois, après la centrifugation visant à séparer les débris cellulaires, seul un signal minime est visible dans la fraction soluble (SN). La majorité de la protéine d'intérêt se trouve en fait dans la fraction insoluble (CL). La correspondance entre cette bande et notre protéine d'intérêt a été confirmée par spectrométrie de masse à haute résolution (HRMS). En effet, la bande correspondante sur le gel a été soigneusement découpée, puis traitée chimiquement, suivie d'une digestion par la trypsine. Cette étape permet de fragmenter la protéine en peptides qui ont ensuite été analysés par HRMS. Enfin, les données obtenues ont été comparées avec des bases de données protéiques qui ont révélé la présence d'une séquence comparable à AHK1 d'*Arabidopsis*, HK1 de peuplier n'étant pas dans les banques de données (résultat non montré).

En comparant les niveaux d'expression entre les deux souches BL21 et Rosetta, il est notable que la souche Rosetta présente une légère augmentation du rendement pour HK1a représenté par une bande un peu plus intense par rapport à celle produite par la souche BL21 (**Fig. 19**).

Ces résultats indiquent qu'en utilisant le vecteur pET28a, nous n'avons pas réussi à obtenir une protéine soluble. Nous avons alors décidé d'utiliser un autre vecteur d'expression, le pET32a, dans l'espoir d'améliorer la solubilité des domaines ECD de HK1a et HK1b.

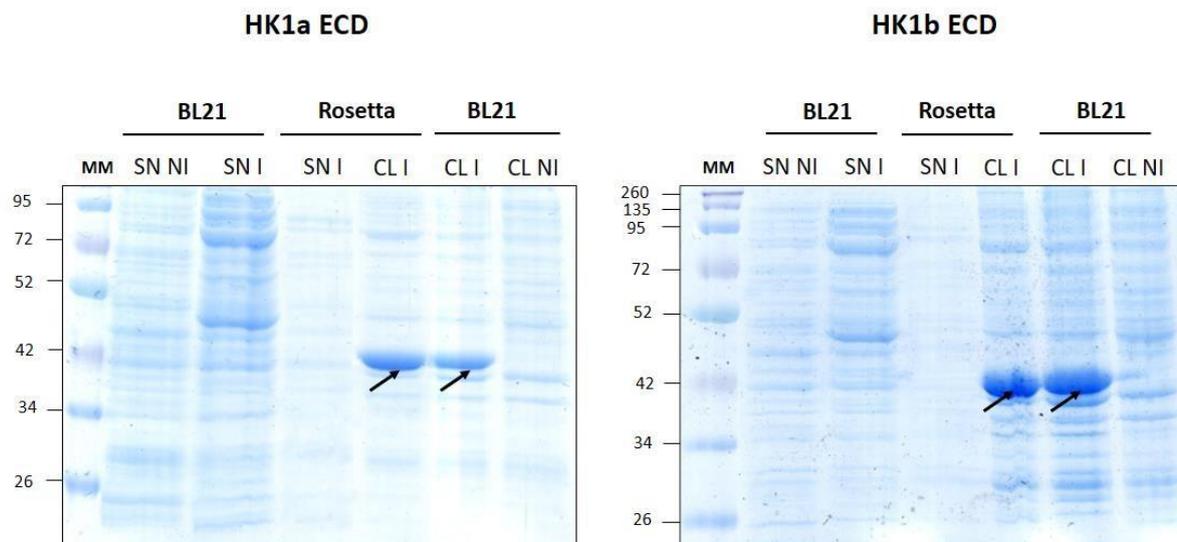


Figure 19. Production des ECD de HK1a et HK1b dans *E. coli* à partir du plasmide pET28a.

Comparaison de l'expression des ECD de HK1a et HK1b à partir du vecteur pET28a dans les souches d'*E. coli* BL21 et Rosetta. Des échantillons de culots cellulaires (CL) et de surnageants (SN) ont été analysés après lyse bactérienne dans le tampon de lyse contenant du Tris 20 mM, pH=8, NaCl 300 mM, lysozyme à 5 µg/mL, DNase à 2U et PMSF 1X, puis centrifugation pour évaluer la solubilité des protéines recombinantes. NI représente les extraits cellulaires d'*E. coli* BL21 et Rosetta avant induction à l'IPTG. I indique les extraits cellulaires après 4 heures d'induction à 37°C avec 0,25 mM d'IPTG lorsque la DO à 600 nm est comprise entre 0,6 et 0,8. Les flèches noires signalent les bandes correspondant aux tailles attendues pour les domaines ECD. MM est un marqueur de masse moléculaire exprimé en kDa.

b. Expression à partir du plasmide pET32a

Le vecteur pET32a, tout en intégrant le tag 6xHis, est conçu pour produire une protéine de fusion avec la Thioredoxine (Trx), une protéine qui peut faciliter le repliement des protéines recombinantes et potentiellement augmenter leur solubilité (Tsunoda *et al.*, 2005).

Les conditions d'expression testées pour le plasmide pET32a étaient similaires à celles utilisées pour le pET28a pour maintenir une continuité dans les variables expérimentales. La principale différence résidait dans la taille attendue de la protéine recombinante : avec l'ajout de la Trx, la taille moléculaire attendue de la protéine était d'environ 57 kDa.

Malheureusement, l'expression à partir du plasmide pET32a n'a pas entraîné d'amélioration de la solubilité de la protéine. Comme pour le pET28a, la majorité de la protéine se trouvait dans la fraction insoluble après centrifugation (Fig. 20) et ce quel que soit la souche hôte utilisée, BL21 ou Rosetta, comme précédemment avec le vecteur pET28a.

Les résultats montrent donc que l'ajout de la Trx comme protéine de fusion n'a pas amélioré la solubilité des ECD de HK1a et HK1b, malgré plusieurs tentatives différentes comme l'ajustement de pH à une valeur basique de 8-9 ou l'application d'un choc thermique lors de la lyse cellulaire (résultats non montrés). De plus, la comparaison des niveaux d'expression entre les souches BL21 et Rosetta reste similaire à celle observée avec le vecteur pET28a. Ces constatations suggèrent la nécessité d'explorer d'autres stratégies pour améliorer la solubilité de ces domaines protéiques.

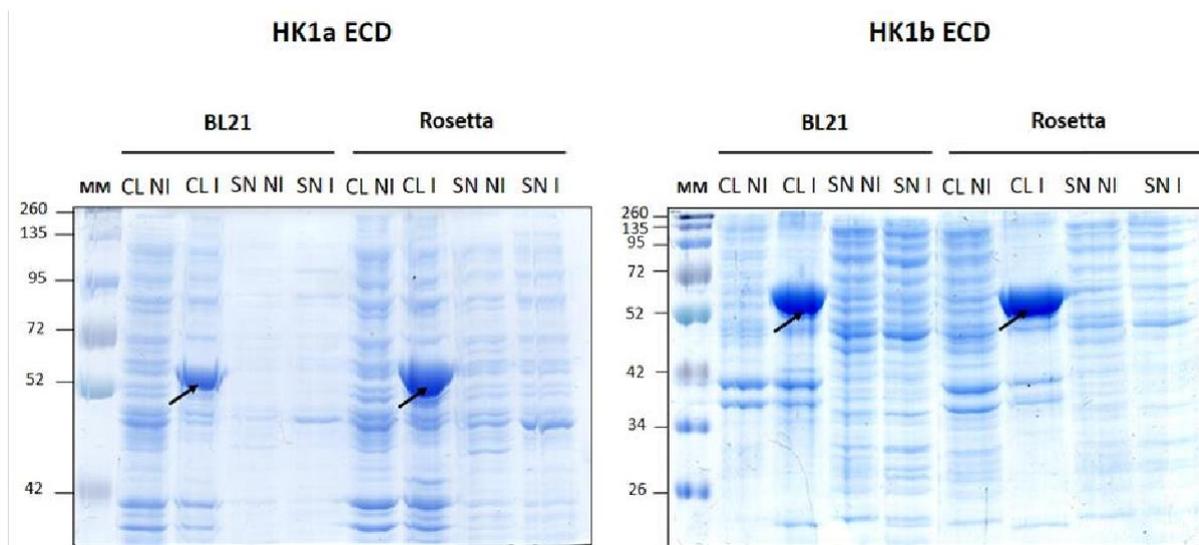


Figure 20. Production des ECD de HK1a et HK1b dans *E. coli* à partir du plasmide pET32a.

Comparaison de l'expression des ECD de HK1a et HK1b à partir du vecteur pET32a dans les souches d'*E. coli* BL21 et Rosetta. Des échantillons de culots cellulaires (CL) et de surnageants (SN) ont été analysés après lyse bactérienne dans le tampon de lyse contenant du Tris 20 mM, pH=8, NaCl 300 mM, lysozyme à 5 µg/mL, DNase à 2U et PMSF 1X, puis centrifugation pour évaluer la solubilité des protéines recombinantes. NI représente les extraits cellulaires d'*E. coli* BL21 et Rosetta avant induction à l'IPTG. I indique les extraits cellulaires après 4 heures d'induction à 37°C avec 0,25 mM d'IPTG lorsque la DO à 600 nm est comprise entre 0,6 et 0,8. Les flèches noires signalent les bandes correspondant aux tailles attendues pour les domaines ECD. MM est un marqueur de masse moléculaire exprimé en kDa.

2. Essais de solubilisation des ECD de HK1a et HK1b

Cette difficulté à obtenir de la protéine soluble constitue une entrave significative aux étapes suivantes de purification et de caractérisation biochimique de ces domaines. Afin de passer cette barrière, nous avons exploré différentes stratégies de solubilisation.

a. Utilisation d'un milieu auto-inductible

Les difficultés rencontrées lors de la solubilisation des deux ECD nous a conduit à tester un **Milieu Auto-Inductible (AIM)** pour essayer d'améliorer la solubilité de ces domaines. L'utilisation de ce milieu s'avère particulièrement innovante et pratique. En effet, contrairement aux approches traditionnelles où l'induction de l'expression protéique est manuellement contrôlée par l'ajout d'IPTG, l'AIM élimine le besoin de surveillance continue de la densité cellulaire et d'ajout ultérieur d'inducteurs. Ce milieu est formulé avec un rapport optimisé de glucose et d'alpha-lactose, qui régulent automatiquement l'induction. Le glucose agit comme un répresseur initial de l'opéron Lac (Lac O), permettant ainsi une croissance cellulaire élevée sans induction prématurée de l'expression protéique. Une fois que le glucose est consommé, généralement entre le milieu et la fin de la phase log, l'alpha-lactose est métabolisé en allolactose par l'action de la β -galactosidase. Cet allolactose sert alors d'inducteur naturel, déclenchant l'expression de la protéine cible (**Fig. 21**) (*Studier, 2005*).

L'AIM intègre également d'autres composants clés comme la tryptone et des extraits de levure pour fournir les acides aminés et les vitamines nécessaires à une croissance cellulaire optimale. Les ions et les sels, tels que le NaCl et le MgSO₄, sont également inclus pour stabiliser l'environnement intracellulaire, ce qui peut être bénéfique pour le repliement des protéines. Aussi, la température d'induction basse de 22°C et une durée d'induction de 24h participent à la mise en place de conditions optimales pour que les protéines s'expriment et se replient correctement. Cette approche automatisée simplifie non seulement le processus d'induction, mais pourrait aussi offrir des conditions plus favorables pour obtenir des protéines solubles.

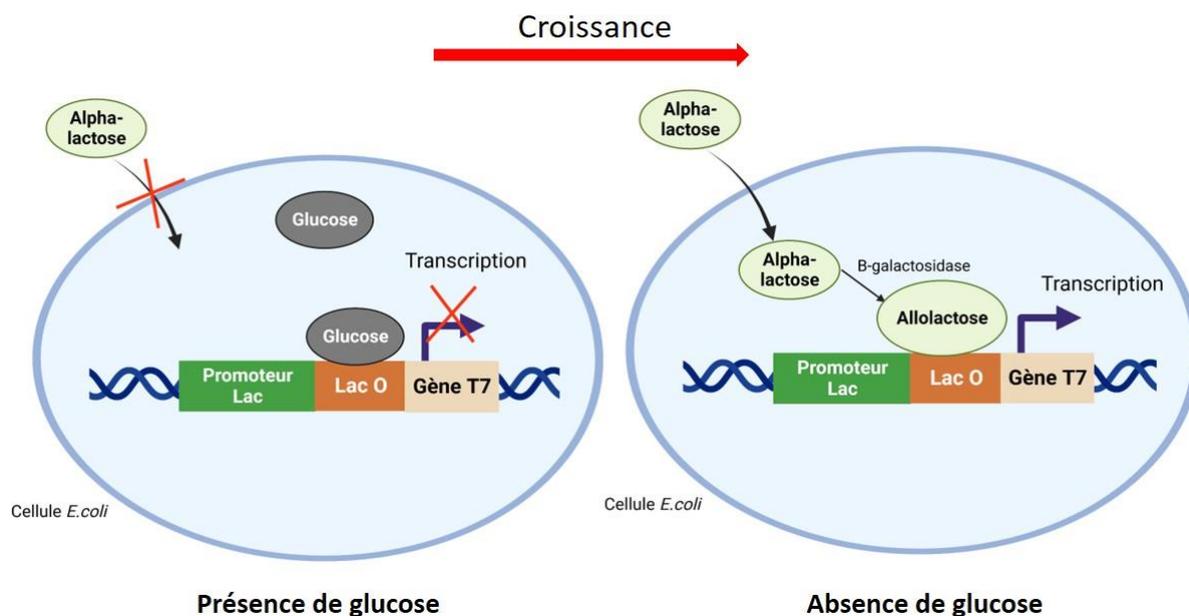


Figure 21. Mécanisme d'auto-induction pour l'expression protéique dans un milieu auto-inductible.

L'analyse par gel SDS-PAGE des protéines obtenues *via* l'approche de production utilisant l'AIM effectué avec le vecteur pET32a dans la souche BL21 a révélé la présence d'une bande à environ 57 kDa, correspondant à la taille moléculaire attendue pour l'ECD fusionné. Cependant, cette bande était présente uniquement dans la fraction insoluble (CL), indiquant que bien que les protéines soient exprimées, elles ne sont pas solubles dans les conditions testées (**Fig. 22A**).

Pour éliminer la possibilité que ces résultats soient spécifiques à la souche ou au vecteur utilisé, des tests supplémentaires ont été effectués en utilisant la souche Rosetta et le vecteur pET28a. De manière comparable, les mêmes observations ont été faites, renforçant l'idée que les problèmes de solubilisation ne soient pas uniquement dus à la souche ou au vecteur, mais seraient plutôt liés à la nature des ECD de HK1a et HK1b.

Parmi les facteurs pouvant influencer cette insolubilité figurent les conditions physico-chimiques du milieu. Même si ces conditions, telles que le pH, la concentration ionique et la température, ont été soigneusement contrôlées, elles pourraient ne pas être idéales pour la solubilisation de ces protéines. Ce constat met en évidence la nécessité d'explorer des stratégies alternatives pour améliorer la solubilité des ECD des protéines HK1a et HK1b.

b. Utilisation d'un pH acide

Dans la plante, l'ECD se trouve exposé dans l'apoplasme, dont le pH est compris entre 4,5 et 6,5 (Felle, 2005). Il est donc plausible que les propriétés de solubilisation de ce domaine soient optimales dans un environnement mimant ces conditions. Dans ce contexte, nous avons décidé de tester un pH acide de 5,5 pour la solubilisation des ECD de HK1a et HK1b.

Quel que soit le pH testé (5,5 ou 8) sur l'expression du domaine ECD de HK1b à partir de pET28a dans BL21, une bande d'environ 42 kDa conforme à la taille moléculaire attendue a été observée en SDS-PAGE dans le culot cellulaire après lyse bactérienne (**Fig. 22B**), suggérant une fois de plus que la protéine demeure principalement insoluble. De même, en utilisant la souche Rosetta avec le même vecteur (résultats non montrés), nous n'avons pu apporter aucune amélioration quant à la solubilité de la protéine.

c. Test de solubilisation en présence du glycérol

Un des paramètres qui peut également avoir un impact significatif sur la solubilité et la stabilité des protéines est la présence de certains agents chimiques dans le milieu de lyse. Parmi ces agents, le glycérol a été choisi pour plusieurs raisons. Premièrement, le glycérol est un polyol qui peut stabiliser les protéines en formant des liaisons hydrogène avec l'eau, réduisant ainsi la quantité d'eau disponible pour l'hydratation des protéines. Cette propriété peut aider à empêcher les protéines d'interagir et de s'agréger avec d'autres molécules (Scopes, 1994). Deuxièmement, il agit comme un agent protecteur contre la dénaturation en stabilisant les structures secondaires et tertiaires des protéines. Plus spécifiquement, le glycérol peut interférer avec les interactions hydrophobes, souvent responsables de l'agrégation des protéines, et peut donc prévenir leur précipitation (Demetzos, 2016).

Malgré ces propriétés de stabilisation connues du glycérol, l'analyse par SDS-PAGE a démontré que la protéine d'intérêt reste principalement insoluble représentée par une bande dans le culot et non dans le surnageant (**Fig. 22C**). Cette observation a également été faite pour les différentes conditions expérimentales employées, y compris les tests en utilisant pET28a et la souche Rosetta (résultats non montrés).

A la suite de tous ces essais pour obtenir une protéine soluble, nous avons décidé de changer de stratégie et avons opté pour une technique de type dénaturation / renaturation à partir

des corps d'inclusion pour resolubiliser notre protéine toujours en continuant d'utiliser le système d'expression bactérien actuel.

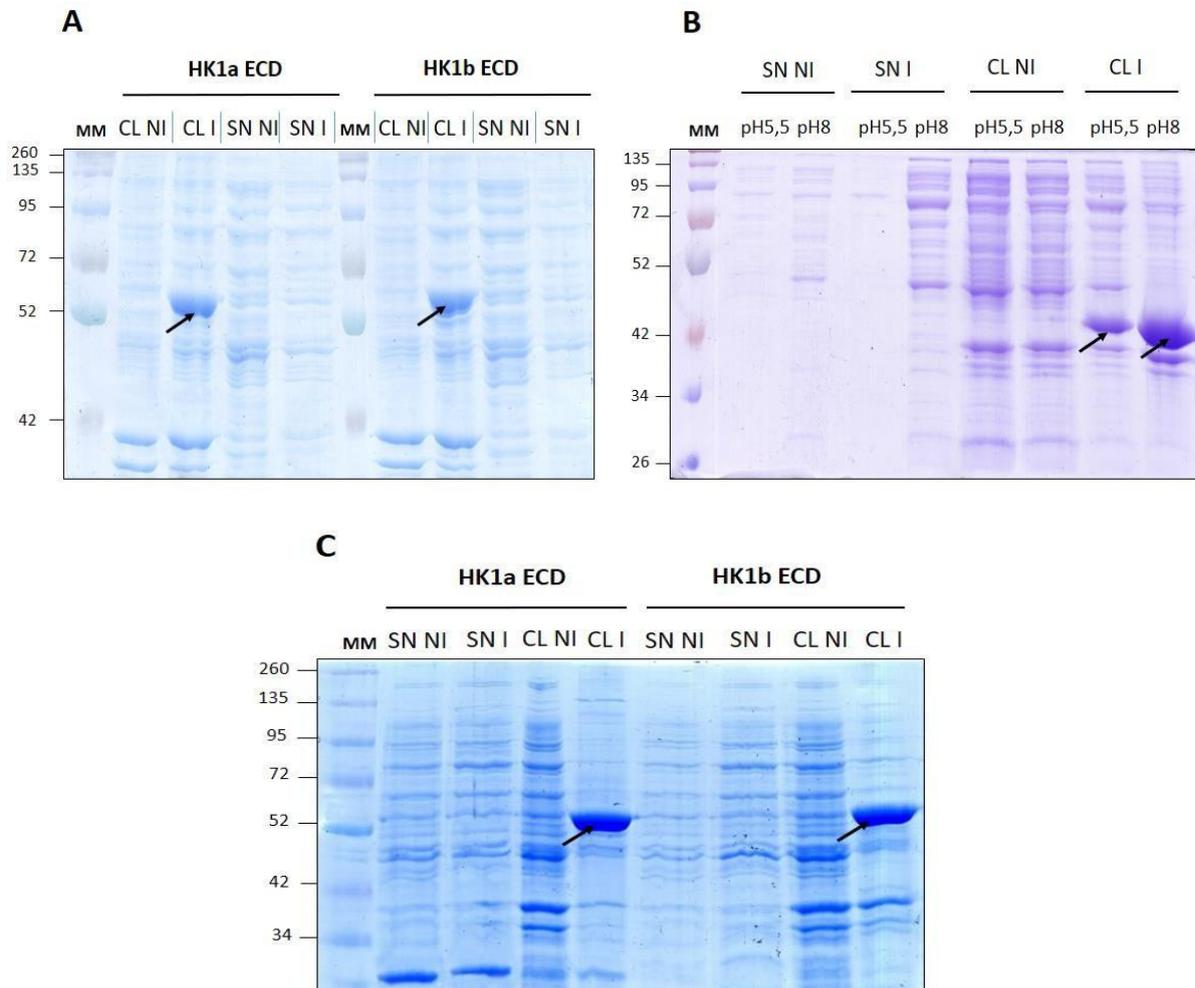


Figure 22. *Essais de solubilisation des ECD de HK1a et HK1b dans la souche BL21.*

A) Utilisation du milieu auto-inductible dans la souche BL21 avec le vecteur pET32a. Les cultures ont été diluées à 1/100 dans le milieu auto-inductible et induites pendant 24h à 22°C. **B)** Test d'un pH acide et d'un pH basique dans la souche BL21 en utilisant le vecteur pET28a. Des tampons de lyse bactérienne, MES à 50 mM à pH 5,5 et Tris à 50 mM à pH 8, ont été employés. **C)** Évaluation de l'effet du glycérol à 5% dans la souche BL21 en utilisant le vecteur pET32a. Le tampon de lyse était composé de Tris à 50 mM à pH 8, de 0,1% de Triton et de 5% de glycérol. Les échantillons de culots cellulaires (CL) et de surnageants (SN) ont été examinés après la lyse bactérienne, réalisée avec des lysozymes à 5µg/mL, de la DNase à 2U, et du PMSF à 1X, et centrifugation pour évaluer la solubilité des protéines recombinantes. NI correspond aux extraits cellulaires non induits, tandis que I signifie les extraits après induction (auto-induction en A et induction à l'IPTG en B et C). Les flèches noires marquent les bandes de taille moléculaire attendues des ECD. MM représente un marqueur de masse moléculaire en kDa.

3. Dénaturation et renaturation à partir des corps d'inclusion

La dénaturation et la renaturation sont des stratégies couramment utilisées pour traiter les protéines présentes dans des corps d'inclusion, qui sont souvent formés lors de l'expression de protéines recombinantes dans les bactéries. La dénaturation utilise généralement des agents tels que le chlorure de guanidinium ou l'urée pour dissoudre les corps d'inclusion. Après la dénaturation, la protéine doit être soigneusement renaturée, souvent en éliminant lentement l'agent dénaturant, pour obtenir la structure et la fonction biologiques correctes (*Lilie et al., 1998*).

a. Mise au point des conditions de solubilisation par dénaturation

Nous avons focalisé nos efforts sur les tests impliquant le vecteur pET28a au sein des deux souches bactériennes, BL21 et Rosetta. Cette décision s'appuie sur les résultats précédents, qui ont montré que l'utilisation du vecteur pET32a n'apportait pas d'amélioration significative en matière de solubilisation. Sur la base de recherches bibliographiques, plusieurs conditions de dénaturation ont été testées.

1) Utilisation d'urée 8 M et d'un pH 8

Initialement, nous avons adopté un protocole classique de dénaturation en utilisant de l'urée 8 M et un pH 8. L'urée est un agent dénaturant qui interfère avec les forces non covalentes qui stabilisent la structure de la protéine, ce qui permet à la protéine de se déplier et de se dissoudre dans l'eau (*Burgess, 2009*). Concernant le pH, il est connu que le pH à proximité de la neutralité (~ pH 7-8) est généralement propice à la dénaturation de la plupart des protéines, bien qu'il puisse être nécessaire de l'ajuster en fonction des propriétés spécifiques de la protéine d'intérêt (*Amorim et al., 2010*).

Le protocole suivi pour la lyse cellulaire, la récupération des corps d'inclusion, et leur traitement ultérieur s'inspire de plusieurs publications scientifiques (*Singh & Panda, 2005 ; Yang et al., 2011*). Après la lyse cellulaire, les culots contenant les corps d'inclusion ont été lavés deux fois pour éliminer les contaminants. Les culots ont ensuite été dénaturés avec 8 M d'urée à pH 8 pour faciliter l'extraction des protéines. Après une période d'agitation, les échantillons ont été centrifugés et analysés par SDS-PAGE (**Fig. 23**).

Il est à noter que ces conditions ont permis, pour la première fois dans le cadre de nos essais, la visualisation d'une bande dans la fraction soluble pour HK1a et HK1b dans la souche BL21 (**Fig. 23A**). Cependant, la majorité de la protéine demeure dans la fraction insoluble (**Fig. 23A**). Des temps d'agitation de 2 et 3 heures, pour prolonger la dénaturation, ont été également essayés mais sans amélioration notable (résultat non montré). Ce résultat, bien qu'encourageant, indique qu'une optimisation supplémentaire est nécessaire pour augmenter le rendement de protéines solubles.

2) Utilisation d'urée 2 M et d'un pH 12

Dans un second temps, une approche alternative a été tentée en utilisant un pH élevé de 12 et une concentration plus faible d'urée à 2 M, en se basant sur une méthode publiée par *Singh et al. (2008)*. De plus, il a été largement rapporté que les protéines des corps d'inclusion exprimées dans *E. coli* peuvent être solubilisées par un pH élevé (*Wang et al., 2008*). En effet, l'utilisation d'un pH de 12 conduit à l'exposition des résidus hydrophobes enfouis au sein de la structure protéique, contribuant à la déstabilisation de la protéine. Par ailleurs, les protéines possèdent des résidus acides qui, dans des conditions de pH neutre à alcalin, portent généralement une charge négative. En augmentant le pH, cette charge négative peut être accentuée, perturbant ainsi les interactions électrostatiques internes et conduisant à une déstabilisation supplémentaire de la protéine. L'avantage de cette méthode réside dans l'utilisation d'une faible concentration d'urée (2 M), ce qui simplifie le processus de renaturation ultérieure en protégeant la structure secondaire native de la protéine. Malgré cet avantage théorique, les résultats obtenus étaient similaires à ceux de la dénaturation à 8 M d'urée, avec la majeure partie de la protéine restant insoluble que ce soit pour HK1a ou HK1b dans les deux souches BL21 et Rosetta (**Fig. 23B**). L'absence totale d'une bande correspondante à HK1a ECD dans le surnageant dans la souche Rosetta est dû à un souci technique.

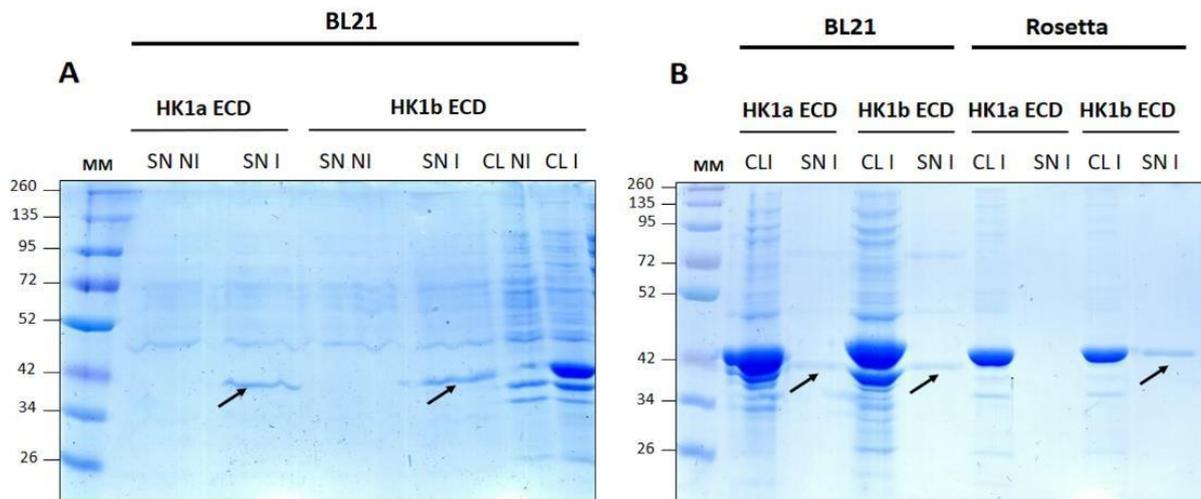


Figure 23. Solubilisation des ECD de HK1a et HK1b par dénaturation des corps d'inclusion.

A) Test de dénaturation en utilisant 8 M d'urée et pH 8 sur pET28a dans la souche BL21. Les corps d'inclusion ont été resuspendus dans le tampon de dénaturation constitué de 20 mM Tris-HCl à pH 8 et 8 M d'urée. **B)** Test de dénaturation en utilisant 2 M d'urée et pH 12 sur pET28a dans les souches BL21 et Rosetta. Les corps d'inclusion ont été resuspendus dans le tampon de dénaturation constitué de 20 mM Tris à pH 12 et 2 M d'urée. Les suspensions ont été mises en agitation pendant 1 heure à température ambiante. Les échantillons de culots cellulaires (CL) et de surnageants (SN) ont été examinés après centrifugation pour évaluer la solubilité des protéines recombinantes. NI correspond aux extraits cellulaires non induits, tandis que I signifie les extraits après induction à l'IPTG. Les flèches noires marquent les bandes de taille moléculaire attendues des ECD. MM représente un marqueur de masse moléculaire en kDa.

3) Effet de la congélation des culots sur la solubilisation

Dans le cadre de l'optimisation du protocole de solubilisation, une phase de congélation des culots à -20 °C pendant une nuit dans le tampon de solubilisation a été intégrée. Cette modification a été inspirée par une étude qui souligne l'efficacité et la simplicité de cette approche pour solubiliser des protéines à partir de corps d'inclusion (Qi et al., 2015).

L'ajout de cette étape a engendré des résultats clairement améliorés. Pour les conditions impliquant de l'urée 8 M à pH 8, une augmentation notable de l'intensité de la bande correspondant à la fraction soluble a été observée sur le gel SDS-PAGE (Fig. 24A), en comparaison avec les résultats obtenus sans inclure cette étape de congélation (Fig. 24A). Bien qu'une portion de la protéine reste insoluble, la fraction soluble représente désormais la majorité de la protéine, et ce dans les deux souches de bactéries examinées, BL21 et Rosetta (Fig. 24A). Pour les conditions impliquant 2 M d'urée à pH 12, l'introduction de cette étape de congélation a également entraîné une amélioration de la solubilité (Fig. 24B et C). Cet

effet est particulièrement notable pour la souche Rosetta où approximativement 90% de la protéine est apparue soluble (**Fig. 24C**). Ces observations indiquent que l'intégration d'un cycle de congélation au protocole de solubilisation constitue une stratégie efficace pour accroître la solubilité des ECD de HK1a et HK1b.

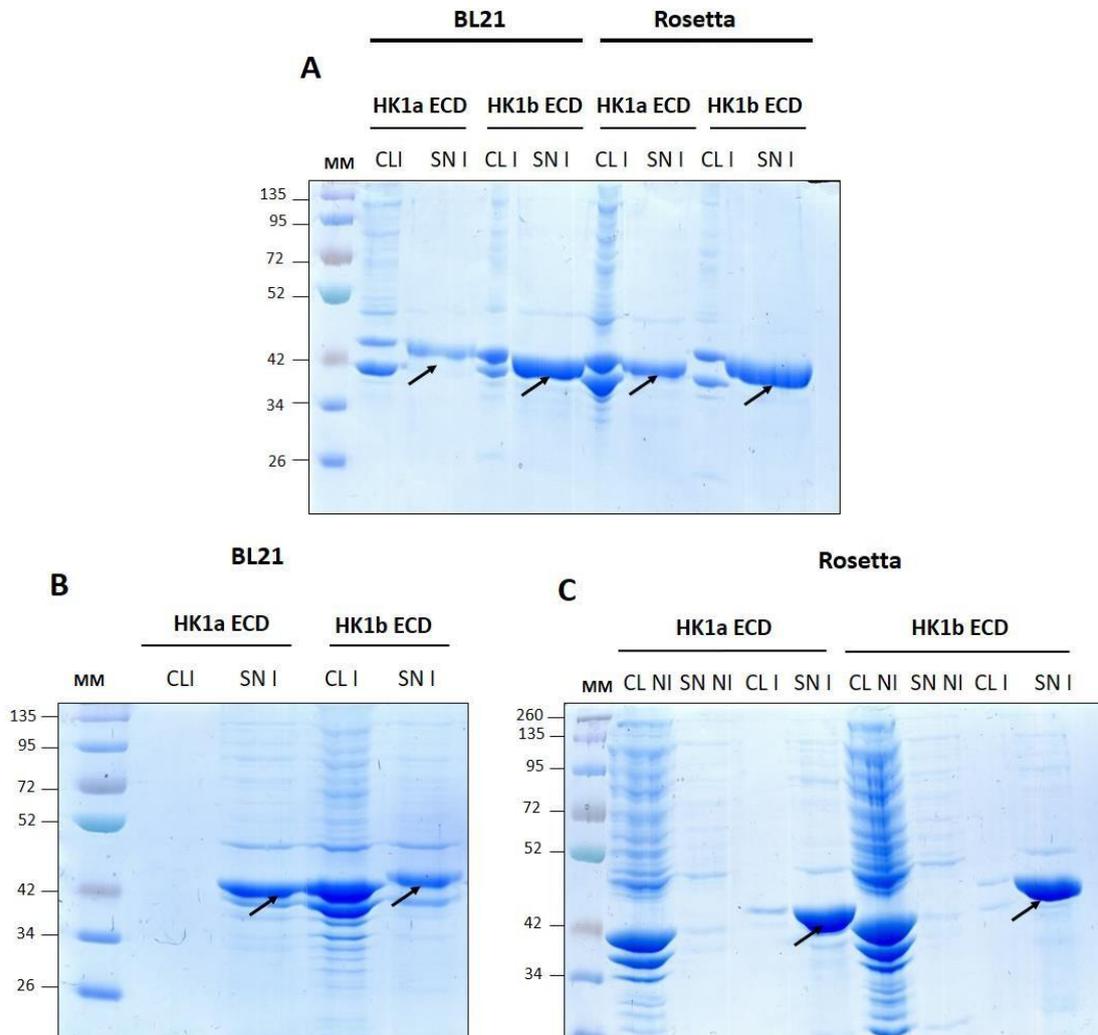


Figure 24. Effet de la congélation sur la solubilisation des corps d'inclusion de HK1a ECD et HK1b ECD dans les souches BL21 et Rosetta.

A) Effet de la congélation en utilisant 8 M d'urée et un pH de 8 dans les deux souches. **B)** Effet de la congélation en utilisant 2 M d'urée et un pH de 12 dans la souche BL21. **C)** Effet de la congélation en utilisant 2 M d'urée et un pH de 12 dans la souche Rosetta. Les corps d'inclusion ont été resuspendus dans le tampon de dénaturation, congelés à -20°C pendant la nuit O/N puis décongelés à température ambiante. Après centrifugation, les échantillons de culots cellulaires (CL) et de surnageants (SN) ont été analysés pour évaluer la solubilité des protéines recombinantes. NI : extraits cellulaires non induits, et I : extraits après induction par l'IPTG. Les flèches noires indiquent les bandes de taille moléculaire attendues pour les ECD. MM signifie un marqueur de masse moléculaire, exprimé en kDa.

En synthèse, l'optimisation des conditions de dénaturation a mis en évidence l'efficacité d'un pH 12 couplé à de l'urée 2 M pour solubiliser des protéines à partir de corps d'inclusion. L'introduction d'une étape de congélation a nettement amélioré cette solubilité, particulièrement dans la souche Rosetta. Ces modifications, favorisant un dépliement efficace grâce au pH élevé et facilitant la renaturation subséquente avec une concentration plus faible d'urée, ont conduit à un protocole précis pour la récupération de protéines solubles à partir de corps d'inclusion (**Fig. 25**).

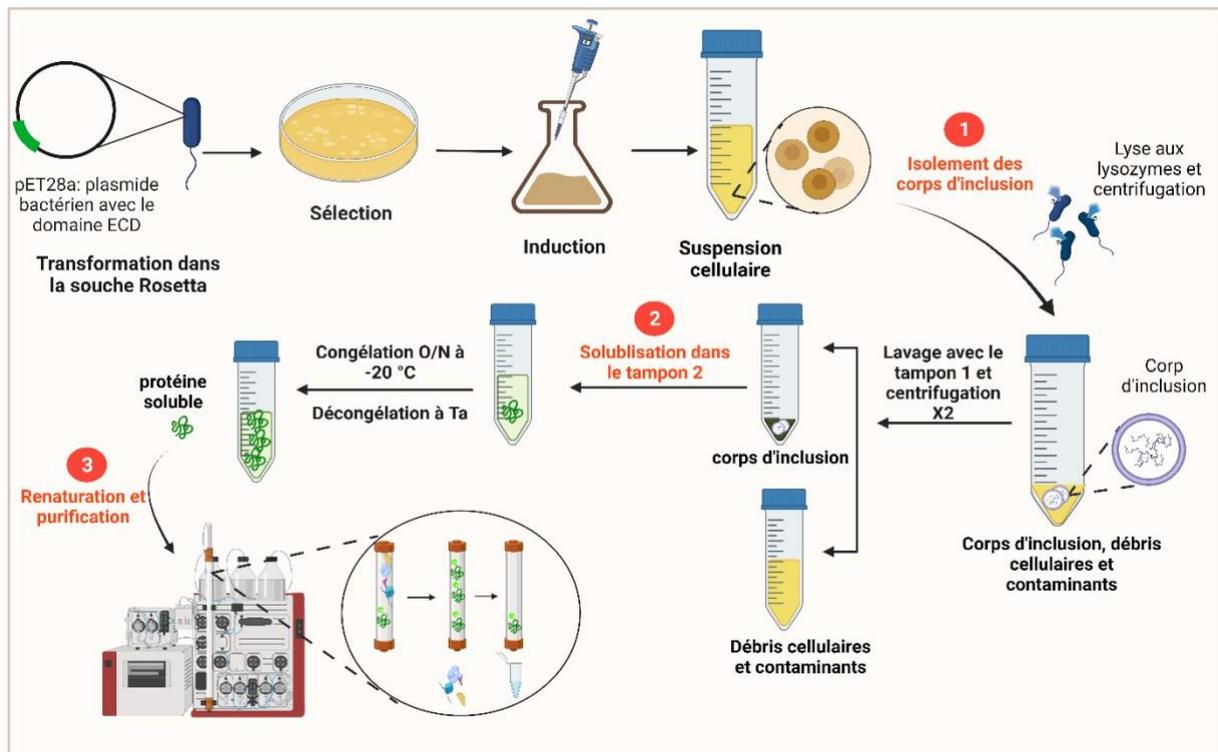


Figure 25. Schéma du protocole de solubilisation des corps d'inclusion bactériens.

Après la culture, l'induction à l'IPTG et la récolte des cellules, les corps d'inclusion sont isolés (1) en resuspendant le culot cellulaire dans le tampon de lyse composé de 20 mM Tris-HCl à pH 8, 300 mM NaCl, 5 µg/mL de lysozymes, DNase 2U, et PMSF 1X. Après centrifugation, les corps d'inclusion insolubles sont resuspendus 2 fois dans 30 mL de tampon de lavage 1 contenant 20 mM Tris-HCl pH 8, 200 mM NaCl, 2% Triton X-100 et 1 M urée, puis solubilisés par dénaturation (2) dans 40 mL de tampon 2 composé de 20 mM Tris pH12, 2 M urée. Les culots suspendus sont congelés O/N à 20 °C et décongelés à température ambiante (Ta). La protéine soluble est renaturée par la suite et purifiée par chromatographie d'affinité sur colonne de NI-NTA (3).

b. Renaturation de la protéine

Après avoir mis au point les conditions optimales de solubilisation des protéines à partir de corps d'inclusion, l'étape suivante cruciale dans notre étude est la renaturation des protéines. Cette étape est indispensable pour restaurer la structure tridimensionnelle et, par conséquent, la fonctionnalité des protéines d'intérêt. La réussite de la renaturation est souvent un défi majeur en raison de la propension des protéines à former des agrégats ou à demeurer dans des conformations non fonctionnelles. Deux approches principales seront explorées dans cette partie : la renaturation par dialyse et la renaturation sur colonne.

1) Renaturation par dialyse

Les protéines extraites des corps d'inclusion sont généralement renaturées par élimination de l'agent de solubilisation/dénaturation. Dans le cadre de notre étude, la méthode de renaturation par dialyse a été spécifiquement choisie pour plusieurs raisons. Tout d'abord, la dialyse est une technique bien établie et largement employée pour éliminer les agents dénaturants, comme l'urée dans notre cas, et autres petits solutés du milieu, ce qui permet aux protéines de se replier graduellement dans un environnement plus naturel (*Tsumoto et al., 2003*). Ce processus plus lent de retrait des agents dénaturants peut aider à minimiser la formation d'agrégats, souvent associée aux méthodes plus rapides de renaturation.

Suite à l'étape de dénaturation, les échantillons contenant les protéines dénaturées HK1a ECD et HK1b ECD ont été soumis à une dialyse contre un tampon natif sans urée pendant 48 heures à 4°C. Des échantillons ont été prélevés au départ (T0) puis après 24h (T24h) et enfin 48h (T48h) de dialyse (**Fig. 26A**). Ensuite, une évaluation des échantillons a révélé qu'après 48 h de dialyse, seule une faible proportion de la protéine initialement dénaturée est récupérée à l'état soluble (**Fig. 26A**). Il est à noter que le rendement était nettement meilleur pour HK1b ECD par rapport à HK1a ECD, comme illustré dans la **Fig. 26A**. Ce faible rendement en protéines solubles est dû à la précipitation importante de la protéine, observée au cours du processus de dialyse.

2) Renaturation sur colonne

La renaturation sur colonne de la protéine solubilisée est parmi les méthodes utilisées pour récupérer des protéines fonctionnelles (*Singh et al., 2015*). Pour cette expérimentation, après

la dénaturation et la centrifugation des protéines, les surnageants ont été dilués 10 fois dans un tampon contenant 50 mM de Tris-HCl pH8, 200 mM de NaCl, 2 M d'urée et 10 mM d'imidazole, puis introduits directement dans une colonne HisTrap associée à un système de purification automatique Äkta (Cytiva), préalablement équilibré avec le tampon d'équilibration adéquat. La première fraction après l'injection produit le "flow-through" (FT). Une fois l'échantillon introduit, un cycle de lavage est effectué avec le tampon d'équilibration. Enfin, l'élution des protéines d'intérêt est réalisée en utilisant le tampon d'élution enrichi en imidazole (voir matériels et méthodes).

La première élution a révélé une majorité de la protéine dans la fraction non retenue (FT1), avec seulement une minime présence dans l'éluat (E1) (**Fig. 26B**). Ce résultat a été attribué à la précipitation de la protéine, se manifestant par une solution trouble qui a même entraîné un colmatage de la colonne de nickel. Afin de remédier à cela, une deuxième élution a été effectuée après une nouvelle centrifugation et une filtration sur filtre de 0,45 µm. Malheureusement, cette étape a entraîné la perte d'une fraction de la protéine soluble (Filtrat). De plus, les résultats montrent que la protéine demeure dans la fraction non retenue (FT2), avec des niveaux presque similaires dans les éluats (E2a et E2b). Ces observations suggèrent qu'une faible quantité de protéine est capable de se lier à la colonne de nickel, probablement en raison de sa précipitation lors des étapes de purification.

Afin de remédier à ce problème de précipitation de la protéine, plusieurs ajustements ont été apportés à notre protocole. Tout d'abord, le facteur de dilution a été augmenté à 25 fois dans le même tampon de renaturation pour réduire la précipitation de la protéine. De plus, l'équilibration de la colonne de nickel a été modifiée pour inclure de l'urée (2 M), dans le but de maintenir la solubilité de la protéine pendant la phase d'équilibration. Lors de l'étape d'élution, un gradient "doux" a été appliqué pour permettre l'élimination progressive de l'urée, favorisant ainsi la renaturation de la protéine au cours de la purification. Les résultats ont été partiellement encourageants (**Fig. 26C**) : la protéine était présente dans l'éluat (E8), indiquant une certaine efficacité de la méthode. Cependant, elle était également retrouvée dans la fraction non retenue (FT), et l'analyse par SDS-PAGE a révélé la présence de bandes supplémentaires, suggérant que la purification était incomplète et que des contaminants étaient présents.

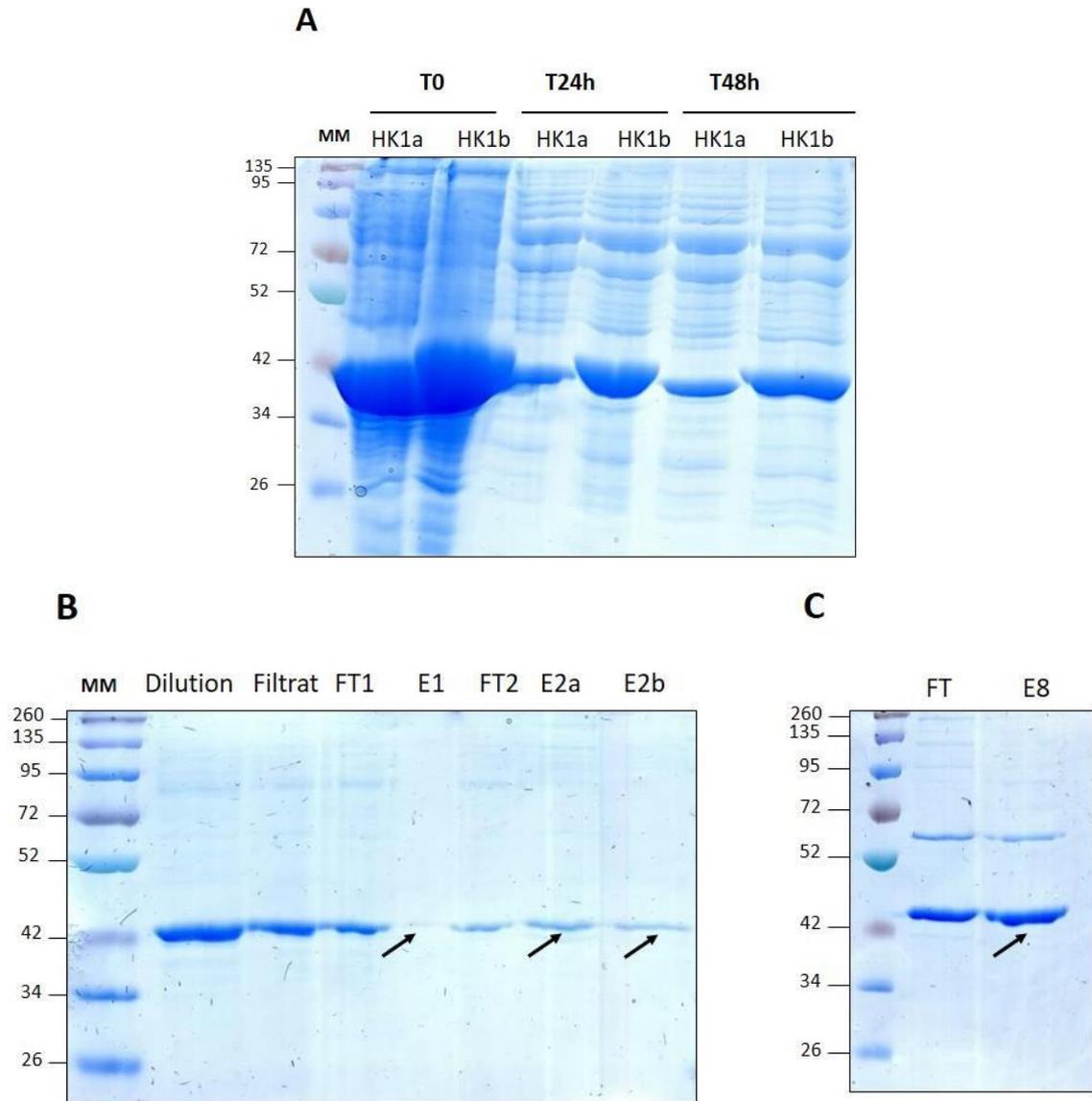


Figure 26. Analyse de la renaturation des ECD de HK1a et HK1b à partir des corps d'inclusion.

A) Renaturation par dialyse : 40 mL de protéine solubilisée sont dialysés contre 1 L de tampon de renaturation (50 mM Tris, 200 mM NaCl, pH 8) pendant 48 heures à 4°C. Les échantillons sont évalués à différents temps (T0, T24h, T48h), avec T0 : avant la dialyse. **B)** Purification post-renaturation par dilution x10. **C)** Purification post-renaturation par dilution x25 : les protéines solubilisées sont diluées dans un tampon composé de 50 mM Tris-HCl pH 8, 200 mM NaCl, 2 M d'urée et 10 mM d'imidazole. FT indique Flow-Through, la fraction non retenue ; E indique Éluât. Deux types d'élution ont été réalisés : E1 avant la filtration et E2 après, subdivisée en E2a (200 mL) et E2b (50 mL). MM est un marqueur de masse moléculaire en kDa.

Ces tests de renaturation par dialyse et sur colonne ont montré des limites, notamment en termes de précipitation de la protéine. Malgré les ajustements pour minimiser ce problème, aucune des deux méthodes n'a produit des résultats optimaux, indiquant la nécessité d'une

optimisation plus poussée pour améliorer le rendement et la qualité de la protéine purifiée. Ces travaux ayant été réalisés en fin de thèse, le temps a manqué pour aller plus loin.

C. Discussion et perspectives

Les deux objectifs majeurs du travail de thèse visaient, en premier lieu de déterminer la structure tridimensionnelle des ECD de HK1a et HK1b chez le peuplier et en second lieu, d'identifier les ligands de ces récepteurs en employant un criblage ciblé de molécules capables de se lier de manière sélective au niveau des ECD de HK1a et HK1b.

Dans ce but, la première étape critique était la production, solubilisation et purification de ces ECD. Pour ce faire, la bactérie *E. coli* a été le système hôte choisi pour cette étude en raison de ses nombreux avantages, tels que sa facilité de manipulation, sa croissance sur des sources de carbone peu coûteuses et sa capacité à produire rapidement des protéines recombinantes (Swartz, 2001). Lors des essais préliminaires pour l'expression des domaines ECD des protéines HK1a et HK1b, la souche Rosetta a été choisie en raison de son expertise à gérer efficacement les codons rares, typiquement présents dans les protéines eucaryotes (Rosano & Ceccarelli, 2014). Cependant, ces essais se sont heurtés à des problèmes de solubilisation. En réponse à ces défis, nous avons exploré d'autres conditions couramment citées dans la littérature scientifique dans le but de solubiliser la protéine d'intérêt. Notamment, un autre vecteur d'expression bactérienne pET32a qui inclut la protéine de fusion Trx.

L'ajout de la protéine Trx n'a pas amélioré la solubilité des deux ECD. Cette observation peut s'expliquer de deux manières possibles : soit l'effet chaperon de la Trx est insuffisant en raison de la complexité structurelle des domaines ou des particularités de leur séquence amino-acidique, soit la fusion avec Trx a perturbé leur repliement naturel, entraînant leur agrégation. Bien que l'utilisation de protéines de fusion soit courante pour faciliter l'expression et la purification des protéines en *E. coli*, elle peut parfois altérer la structure de la protéine cible, affectant ainsi sa solubilité (Köppl et al., 2022).

L'incapacité à solubiliser les ECD de HK1a et HK1b nous a poussé à envisager d'autres approches. Nous avons par la suite utilisé un milieu auto-inductible, un pH à 5,5 et le glycérol dans nos tentatives pour améliorer la solubilité, mais sans succès. Le pH acide, bien que

représentatif de l'apoplasme, pourrait changer le caractère hydrophile ou hydrophobe de certains résidus pouvant altérer la façon dont la protéine se replie et interagit avec l'eau, ce qui pourrait contribuer à une faible solubilité (*Münch & Bertolotti, 2010*).

Suite aux difficultés rencontrées lors des tests de solubilisation, nous avons opté pour une méthode de dénaturation et de renaturation à partir des corps d'inclusion pour récupérer nos protéines en forme soluble.

Le recours à des tests de 8 M d'urée avec un pH de 8 (*Burgess, 2009*), et 2 M d'urée avec un pH de 12 (*Singh et al., 2008*), a pour la première fois réussi à améliorer la solubilité de la protéine. Dans le but d'optimiser les conditions de dénaturation, une étape de congélation des culots O/N à -20°C dans le tampon de solubilisation a été introduite. Cette modification a permis d'augmenter sensiblement la solubilité de la protéine. Des essais parallèles en utilisant 2 M d'urée à pH 8 ont montré une solubilité protéique limitée (résultat non montré). Ce résultat suggère qu'une faible concentration d'urée combinée à un pH alcalin s'avère être des éléments clés pour une solubilisation efficace des corps d'inclusion *via* la méthode de congélation-décongélation. L'amélioration de la solubilité des ECD pourrait être attribuée à l'effet conjugué de l'urée et du pH (*Patra et al., 2000 ; Qi et al., 2015*). Ces observations indiquent la présence d'interactions à la fois ioniques et hydrophobes au sein des corps d'inclusion. Cela suggère que puisque les protéines ne peuvent pas être dénaturées à une si faible concentration d'urée et à un pH légèrement alcalin (8), l'urée sert probablement uniquement à séparer physiquement les molécules en perturbant les interactions hydrophobes entre elles (*Clark, 1998 ; De Bernardez et al., 1999 ; Qi et al., 2015*).

Après ces résultats prometteurs, nous avons expérimenté une des méthodes courantes de renaturation, à savoir la dialyse (*Fischer et al., 1992*). La dialyse a provoqué une précipitation de la protéine, suggérant que l'élimination de l'urée a peut-être été trop rapide pour permettre un repliement adéquat ou que les conditions de dialyse n'étaient pas idéales.

Diverses techniques chromatographiques ont été utilisées dans des recherches précédentes pour la renaturation sur colonne de protéines dénaturées, y compris la chromatographie d'exclusion (*Werner et al., 1994*), l'échange d'ions (*Kweon et al., 2004*) et la chromatographie d'affinité (*Glynow et al., 2003*). Ce type de renaturation offre plusieurs avantages par rapport à la dialyse (*Singh et al., 2015*). Par conséquent, nous avons testé une renaturation sur colonne

par chromatographie d'affinité sur NI-NTA de notre protéine solubilisée. Nous avons observé une bande dans l'éluât ainsi que dans la fraction non retenue, ce qui suggère que la protéine ne se lie pas entièrement à la colonne. De plus, cette purification s'est révélée peu spécifique, avec des bandes de faible intensité détectées lors de l'analyse SDS-PAGE. Il serait donc pertinent d'explorer d'autres méthodes de purification comme la chromatographie d'exclusion pour éliminer ces bandes supplémentaires, qui pourraient être des contaminants ou résulter d'une non-spécificité du His-tag en position N-terminale de la protéine. Une validation par Western blot de la présence du His-tag serait également instructif.

Par ailleurs, il peut être envisagé d'explorer d'autres protéine de fusion, comme la GST, pour laquelle il a été montré un rôle dans l'amélioration de la solubilité des protéines (*Harper & Speicher, 2008*). De plus, cela permettrait d'éliminer le tag His tout en conservant la possibilité d'une purification par chromatographie d'affinité, sur colonne de glutathion, étant donné que l'utilisation d'étiquettes poly-histidine a été signalée comme pouvant avoir un impact négatif sur la solubilité de la protéine cible (*Köppl et al., 2022*).

En outre, ce faisceau de facteurs suggère que le système d'expression bactérien utilisé n'est peut-être pas adapté pour obtenir une forme fonctionnelle et soluble des ECD de HK1a et HK1b. Le recours à d'autres systèmes d'expression, comme la levure, pourrait fournir un environnement plus adapté à ces protéines (*Ghaemmaghami et al., 2003*). En effet, la levure présente des avantages tels que la réalisation de modifications post-traductionnelles, notamment la glycosylation, qui améliorent la solubilité de certaines protéines. De plus, grâce à leur capacité à atteindre des densités cellulaires élevées, elles permettent une production massive de protéines. Dans ce contexte eucaryote, les protéines transitent par le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi, jouant un rôle clé dans le repliement et les modifications post-traductionnelles, assurant ainsi un repliement correct. Par ailleurs, à partir du début des années 1980, la majorité des protéines recombinantes produites dans les levures ont été exprimées à l'aide de *Saccharomyces cerevisiae* (*Hitzeman et al., 1981 ; Mattanovich et al., 2012*).

PARTIE II

RECHERCHE ET CARACTERISATION DES LIGANDS DES RECEPTEURS HK1 CHEZ LE PEUPLIER

Cette partie vise à identifier le type de signal que les récepteurs HK1 du peuplier perçoivent lors d'un stress hydrique, étant donné que le ligand potentiel qui s'y attache reste encore non identifié.

Dans un premier temps, notre objectif initial était de développer un système de criblage capable de détecter des molécules ligands de ces récepteurs. Pour y parvenir, une construction génétique "rapporteur" a été élaborée pour permettre une visualisation simple de la liaison ligand-récepteur. Cette construction a été introduite dans une souche de levure osmodéficente, et complétée par l'expression des osmosenseurs de peuplier. Ces travaux sont détaillés dans le chapitre III.

Dans un deuxième temps, le système rapporteur créé a été utilisé pour rechercher l'éventuel(s) ligand(s) par deux approches complémentaires :

- Approche ciblée : test d'une sélection restreinte de molécules candidates déjà caractérisées pour des récepteurs à domaine CACHE chez les procaryotes, à savoir les 20 acides aminés standards. Cette approche ciblée devrait permettre une identification rapide de ligands potentiels parmi un spectre réduit de candidats.
- Approche aléatoire : réalisation d'un criblage d'extraits de peuplier, principalement des extraits foliaires, sur les récepteurs HK1 de peuplier. Cette approche aléatoire devrait permettre une identification sans *a priori* sur la nature du ligand potentiel.

Par la suite, l'idée d'une application possible des extraits ayant démontré un effet notable sur la fonction des récepteurs HK1 du peuplier comme biostimulants pour l'amélioration de la tolérance des plantes à la sécheresse a été testée. Une expérimentation sur diverses espèces végétales en condition de stress hydrique a été conduite pour évaluer les effets biologiques des extraits sélectionnés. L'ensemble de ces résultats fait l'objet du chapitre IV. De plus, les résultats obtenus dans ces deux chapitres font l'objet d'un article en préparation.

CHAPITRE III

Mise au point d'un système rapporteur pour les tests
de criblage de ligands

A. Contexte et objectifs de l'étude

La détection du stress hydrique ou de la sécheresse chez les plantes est principalement médiée par les osmosenseurs. Ces derniers peuvent être classés en deux grandes catégories : les osmosenseurs directs et les osmosenseurs indirects. Les osmosenseurs directs mesurent l'activité de l'eau extracellulaire ou les changements dans l'osmolarité de façon immédiate, agissant comme des récepteurs qui détectent un ligand. En revanche, les osmosenseurs indirects détectent les conséquences secondaires des changements osmotiques, tels que la modification du volume cellulaire, la pression de turgescence, ou les variations de la concentration ionique (Wood, 1999 ; Haswell & Verslues, 2015). Chez les plantes, le mécanisme exact par lequel HK1 détecte les changements osmotiques n'est pas encore pleinement compris. De même, la nature exacte du signal de la sécheresse détectée par HK1 chez les plantes reste inconnue.

Comprendre le mode de perception de la sécheresse par les plantes est important car cela conditionne non seulement l'activation de la réponse adaptative, mais également son intensité et la nature spécifique de cette réponse. L'identification des potentiels ligands qui interagissent avec les osmosenseurs joue donc un rôle déterminant dans cette compréhension. Une variété de méthodes expérimentales a été mise en avant dans la littérature scientifique pour étudier les interactions récepteur-ligand. Par exemple, la caractérisation complète des interactions **GPCR**-ligands (**G** Protein-Coupled **R**eceptors) a été réalisée en étudiant les récepteurs dans des complexes avec un large éventail de ligands différents (Stevens et al., 2013). Pour ce faire, des techniques telles que la cristallographie aux rayons X, la **RMN** (**R**ésonance **M**agnétique **N**ucléaire) et la **HDX** (**H**ydrogen/**D**euterium **E**Xchange) ont été employées pour étudier les équilibres conformationnels et les aspects dynamiques de la GPCR. En complément de ces approches expérimentales, des méthodes informatiques telles que le criblage virtuel de ligands, l'échantillonnage conformationnel de poches de liaison au ligand et les simulations de dynamique moléculaire ont été employées pour approfondir la caractérisation et l'annotation de la structure de la GPCR et explorer un espace de liaison du ligand toujours plus large (Stevens et al., 2013).

Bien que ces méthodes aient apporté d'importantes contributions à la compréhension des interactions récepteur-ligand, elles présentent certaines limites principalement en termes de

coût. La nécessité de surmonter ces limites a conduit les chercheurs à se tourner vers d'autres approches. Parmi celles-ci, les biosenseurs se démarquent comme des dispositifs analytiques puissants, utilisés pour identifier ou mesurer la concentration d'un analyte biologique, qu'il s'agisse d'un composé, d'une structure biologique ou d'un microorganisme (Rakhi et al., 2016 ; Webb et al., 2016). Ces biosenseurs gagnent en popularité car ils offrent une capacité de criblage rapide d'un grand nombre de produits chimiques dans divers domaines, tels que la détection de phytohormone (Daudu et al., 2019) ou d'ion métallique (Žunar et al., 2022). Leur principe repose sur la détection et la transformation de la présence d'une molécule biochimique en signaux détectables et mesurables. Quand ils sont associés à des gènes rapporteurs, les promoteurs induits par l'environnement peuvent potentiellement servir de biosenseurs à des cellules entières avec un large éventail d'applications (Looger et al., 2003).

Diverses études ont mis en avant l'importance des systèmes rapporteurs fluorescents dans l'étude des voies de signalisation et des réponses aux stress environnementaux, tant chez les champignons que chez les bactéries.

Dans une étude sur le champignon filamentueux *Aspergillus nidulans*, des chercheurs ont élaboré un système rapporteur fluorescent novateur. Ce système intègre la protéine fluorescente verte améliorée (EGFP), régulée par le promoteur *gfdb* qui répond au stress osmotique, afin de suivre l'activation de la voie HOG en réponse à ce stress et au traitement au fongicide fludioxonil (Furukawa et al., 2007).

Dans une autre étude, le focus a été mis sur l'activation de la voie PhoQ/PhoP en réaction au stress induit par le NaCl dans *E. coli*. Pour cela, les chercheurs ont élaboré un système rapporteur fluorescent qui évalue la fluorescence GFP produite grâce à la cytométrie en flux (Yuan et al., 2017). Par ailleurs, une autre étude sur *E. coli* a employé un système rapporteur fluorescent (EGFP) pour évaluer l'activité d'un promoteur ProU osmorégulé en présence de stress dû au NaCl. Grâce à cette combinaison, les cellules pouvaient efficacement détecter les modifications de leur environnement. La fluorescence émise a ensuite été quantifiée à l'aide d'un spectrofluoromètre (Walawalkar et al., 2013).

Ce chapitre s'inscrit donc dans cette continuité, en explorant plus avant l'utilité et l'application des systèmes rapporteurs dans l'étude des osmosenseurs du peuplier. Dans cette perspective,

nous avons développé un biosenseur spécifiquement conçu pour identifier des ligands des récepteurs HK1 du peuplier impliqués dans la détection du stress osmotique.

Le système que nous avons développé est basé sur le gène rapporteur codant pour la protéine fluorescente verte (GFP_{UV}) introduit dans une levure osmodéficiente. Cette GFP_{UV} a été placée sous le contrôle d'un promoteur spécifiquement activé en réponse au stress osmotique. Au-delà de l'utilisation d'un tel système rapporteur pour l'identification des potentiels ligands de nos récepteurs, nous avons également envisagé une application dans le domaine de l'agriculture. En effet, des extraits capables d'induire une réponse au stress osmotique dans notre système pourraient être envisagés comme capables d'aider les plantes à mieux tolérer ce type de stress lors d'une sécheresse, agissant ainsi en tant que biostimulants potentiels. En partant de cette hypothèse, nous avons cherché à valider ce système par le test de produits commerciaux revendiquant des propriétés biostimulantes. Pour la mise au point de ce système rapporteur et de sa potentielle application, nous avons suivi un plan en 3 étapes :

- Élaboration du système rapporteur d'osmosensing : Cette étape a impliqué la conception du système rapporteur fluorescent par la sélection d'un promoteur activé spécifiquement par le stress osmotique, sa réalisation et son intégration dans une levure osmodéficiente complémentée.
- Évaluation de la fonctionnalité du système : Nous avons mené des tests qualitatifs et quantitatifs dans la souche de levure ainsi créée pour évaluer la réponse de ce système à différents types et intensités de stress osmotique.
- Validation du système rapporteur : Pour valider la possibilité que notre système permette la détection d'extraits aux capacités biostimulantes, nous avons effectué des tests en utilisant des biostimulants commerciaux, dérivés d'algues ou de levures.

B. Résultats

1. Construction du système rapporteur

a. Sélection du promoteur de stress

Dans la levure, la voie de signalisation HOG, régulée par la MAP kinase HOG1, est une voie centrale en réponse au stress osmotique (**Cf.** introduction). Cette voie régule la transcription

de plusieurs centaines de gènes *via* différents facteurs de transcription (Bai et al., 2015). Parmi ces gènes, on trouve le gène **GPD1**, qui code pour la **Glycérol-3-Phosphate Déshydrogénase**. Nous avons initialement choisi ce gène comme promoteur sensible au stress osmotique car cette enzyme permet la synthèse du glycérol, produit en réponse au stress osmotique. Toutefois, des études ont révélé que GPD1 est exprimé même en l'absence de stress osmotique et que l'absence de HOG1 n'empêche pas une induction de l'expression de GPD1 dans des souches $\Delta hog1 \Delta pbs2$ (Eriksson et al., 2000 ; Ding et al., 2013 ; Bai et al., 2015). Ces résultats remettent en question la spécificité du promoteur GPD1 comme promoteur de stress osmotique.

Ces constatations nous ont poussés à rechercher un gène de réponse au stress plus spécifique, le gène STL1. Ce dernier code pour un symporteur de glycérol et de protons localisé dans la membrane plasmique (Ferreira et al., 2005). Ce gène est non seulement le gène le plus fortement induit par la voie HOG, mais également l'unique gène spécifiquement activé par HOG1, lui-même activé par HOG1 lors d'un stress osmotique (Bai et al., 2015). En effet, la construction chimérique du gène LacZ sous le contrôle des 704 nucléotides situés en amont du gène STL1 a une expression totalement abolie dans des levures $hog1\Delta$ (**Fig. 27**). Ainsi, nous avons choisi le promoteur STL1 dans sa totalité (704 nucléotides) comme promoteur spécifique du stress osmotique pour la construction de notre système rapporteur.

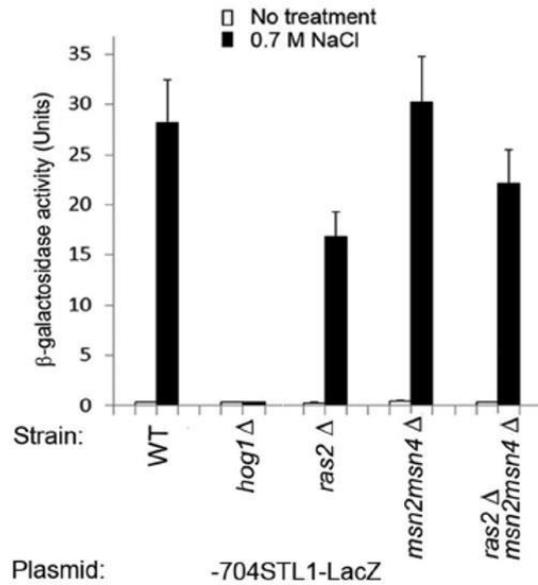


Figure 27. *STL1* est activé spécifiquement par *HOG1* en présence du stress osmotique.

La région incluant 704 nucléotides situés en amont du promoteur *STL1* a été sous-clonée en amont du gène de la β -galactosidase (*LacZ*), et la construction -704*STL1-LacZ* a été testée dans des cellules de type sauvage (WT) et mutées *hog1* Δ , *ras2* Δ , *msn2* Δ *msn4* Δ , et *ras2* Δ *msn2* Δ *msn4* Δ exposées ou non exposées à 0,7 M de NaCl pendant 1 heure. *RAS2* est une GTPase et *MSN2* et *MSN4* sont des facteurs de transcription activés en réponse au stress osmotique. D'après Bai et al., (2015).

b. Construction du vecteur rapporteur

La construction de notre système rapporteur GFP repose sur l'assemblage par recombinaison homologue des trois fragments: P_{STL1}, GFP_{UV} et un vecteur d'expression levure (pGBKT7, **annexe. 1**) modifié, pGBK Δ (**Fig. 28A**). Pour le gène rapporteur, nous avons opté pour un variant optimisé de la GFP, spécifiquement la GFP_{UV}. Cette variante a été conçue pour une fluorescence maximale lors de l'excitation par la lumière UV, ce qui la rend 18 fois plus brillante que la GFP de type sauvage tout en conservant les mêmes longueurs d'onde d'excitation et d'émission. Elle est également particulièrement bien adaptée à la levure, ce qui la rend idéale pour notre système rapporteur en levure (MoBiTec, handbook 2000).

Ce gène GFP_{UV} a été amplifié depuis le vecteur pGNG1 (**Annexe. 1**), utilisé comme gène rapporteur dans le kit "Grow'n Glow: the GFP Two-Hybrid System" (MoBiTec), spécialement conçu pour les expériences de double-hybride en levure. Le produit de la PCR a produit un fragment de 0,75 Kb correspondant à la taille attendue (**Fig. 28B**).

Pour le promoteur P_{STL1} , nous avons utilisé la souche de levure L40 Δ disponible au laboratoire, utilisée pour les tests de double-hybride. Afin d'isoler le promoteur STL1, une réaction de PCR sur colonie de levure a été effectuée avec des amorces spécialement conçues (**Annexe. 2**). La réaction de PCR a généré un fragment d'environ 0,75 Kb, ce qui correspondait à nos attentes (**Fig. 28B**).

Pour le vecteur de clonage (et d'expression levure), nous avons utilisé le vecteur pGBKT7 du kit MatchMaker (Clontech) dédié au test double-hybride (**Annexe. 1**). Ce vecteur possède un promoteur constitutif de levure (P_{ADH1}) permettant l'expression d'une protéine de fusion. De plus, il possède le marqueur d'auxotrophie « TRP1 » compatible avec la souche de levure osmodéficente utilisée permettant ainsi sa sélection. Par PCR, nous avons produit une version délétée de toute la partie comprise entre le promoteur et le terminateur afin de pouvoir y introduire nos séquences d'intérêt, générant ainsi le vecteur pGBK Δ .

Pour orchestrer cet assemblage moléculaire, nous avons fait appel au kit NEBuilder (NEB) qui permet d'assembler de manière simultanée les trois fragments purifiés pGBK Δ , P_{STL1} et GFP_{UV}. En effet, le fragment P_{STL1} possède de l'homologie avec le vecteur à son extrémité 5' et de l'homologie avec le fragment GFP_{UV} en 3'. En parallèle, le fragment GFP_{UV} possède une extrémité 5' homologue au fragment P_{STL1} et une extrémité 3' homologue au vecteur. L'assemblage permet donc un clonage orienté des trois fragments en une seule et unique réaction (**Fig. 28A**).

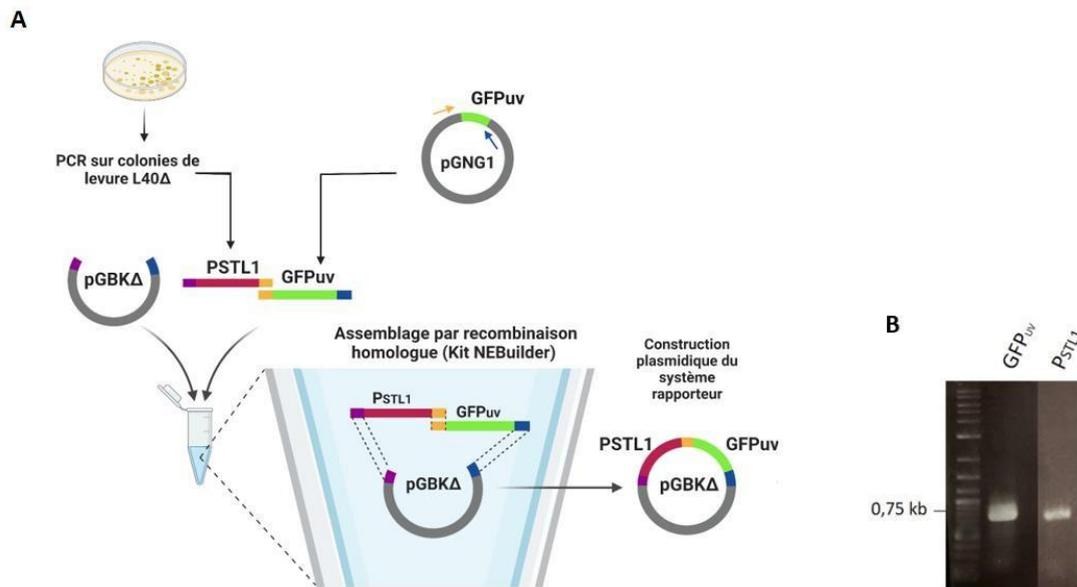


Figure 28. Construction du système rapporteur avec le gène *GFP_{UV}* sous le contrôle du promoteur de stress *P_{STL1}*.

A) Schéma montrant l'assemblage des fragments *P_{STL1}*, *GFP_{UV}* et *pGBKΔ* par recombinaison homologue en utilisant le kit NEBuilder. **B)** Gel d'agarose montrant les résultats de la PCR pour l'amplification du gène *GFP_{UV}* à partir du plasmide *pGNG1* et du promoteur de stress *P_{STL1}* à partir des colonies de levure *L40Δ*. **C)** Gel d'agarose de la PCR sur la construction *pGBKΔ-P_{STL1}-GFP_{UV}* indiquant une bande à 1,5 Kb confirmant le succès de l'assemblage des deux fragments purifiés *P_{STL1}* et *GFP_{UV}*.

c. Création du système rapporteur

Après l'assemblage, la séquence de la construction a été confirmée par séquençage puis co-transformée dans la souche de levure *MH1354*, osmodéficiente pour ses propres osmosenseurs (*Δsln1 Δsho1*) avec les constructions plasmidiques servant de contrôles positif (*pPD-SLN1*) ou négatif (*pYX212*), ou les constructions exprimant nos récepteurs de peuplier (*pYX-HK1a* et *pYX-HK1b*). Ce système rapporteur d'osmosensing fonctionne comme suit :

En l'absence de stress osmotique, l'osmosenseur *HK1* est activé par autophosphorylation. Ce dernier transfère ensuite le groupement phosphorylé à la protéine *Hpt YPD1*, qui à son tour le transfère au RR *SSK1*. Cette cascade de transfert de phosphate entraîne l'inhibition de *SSK2/SSK22*, conduisant à la désactivation de la voie *HOG*, et donc à la non émission de fluorescence (**Fig. 29A**).

Cependant, en condition hyper osmotique, HK1 devient inactif. Cette inactivation déclenche l'activation des MAPKKK de la voie HOG. HOG1 active alors les gènes de réponse au stress osmotique, en partie *via* HOT1, qui induit une expression forte de P_{STL1} , déclenchant la production de fluorescence (**Fig. 29B**).

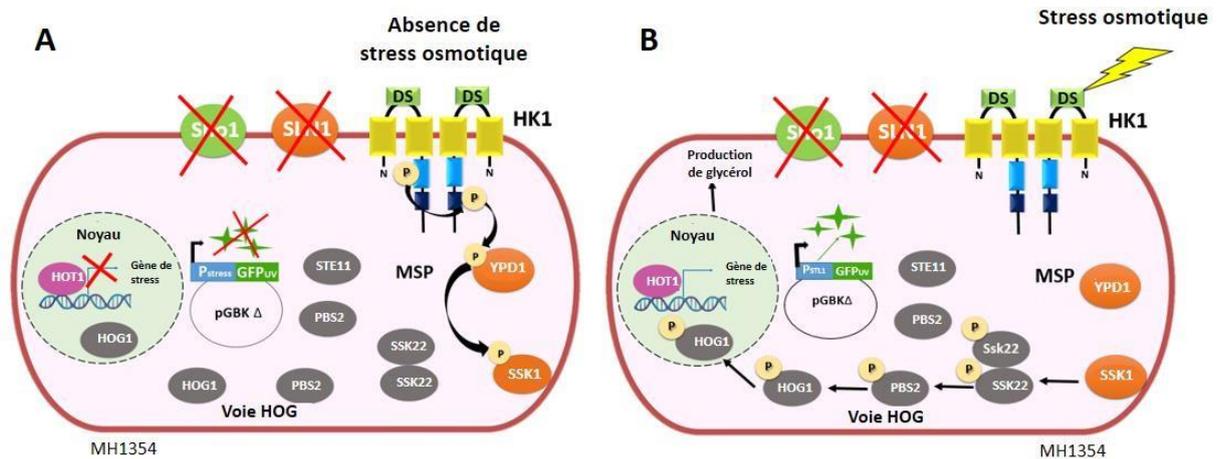


Figure 29. Fonctionnement du système rapporteur en absence et en présence de stress osmotique.

La souche de levure MH1354 a été transformée par la construction du gène rapporteur $pGBK\Delta$ - P_{STL1} - GFP_{UV} et complétée par les récepteurs HK1a ou HK1b.

2. Évaluation de la fonctionnalité du système rapporteur

a. Analyse qualitative par visualisation de la fluorescence GFP

Dans cette étape de notre étude, l'objectif principal était de vérifier le bon fonctionnement de notre système rapporteur. À cette fin, nous avons observé l'intensité de la fluorescence sous lumière UV de notre système fluorescent, à la fois en absence et en présence de NaCl à des concentrations croissantes (0,3 ; 0,6 et 0,9 M) (**Fig. 30**). Comme il est pratiqué de façon courante, nous avons choisi un stress salin par ajout de NaCl pour induire le stress osmotique (*Bai et al., 2015 ; Kim et al., 2016 ; Hamdi et al., 2020*).

Sur le milieu sans NaCl (-UW + Glu), on observe une faible croissance pour le contrôle négatif (pYX) et une forte croissance des levures exprimant SLN1, HK1a et HK1b, conforme aux résultats antérieurs obtenus avec une autre souche de levure osmodéficente (*Héricourt et al., 2016*). Sous UV, une absence de fluorescence est observée en absence de stress (-UW + Glu). En condition de stress (-UW + Glu + NaCl), on observe que les cellules complétées avec

les récepteurs SLN1 et les HK1 continuent de croître en condition de stress osmotique croissant (HK1a plus faiblement à 0,9 M NaCl). Parallèlement, on observe une augmentation de la fluorescence émise par les levures en condition croissante de NaCl. Les résultats obtenus montrent que le système rapporteur fonctionne bien en activant lors d'un stress osmotique la fluorescence de la GFP et qu'il y a une corrélation positive entre la concentration de NaCl et l'intensité de la fluorescence.

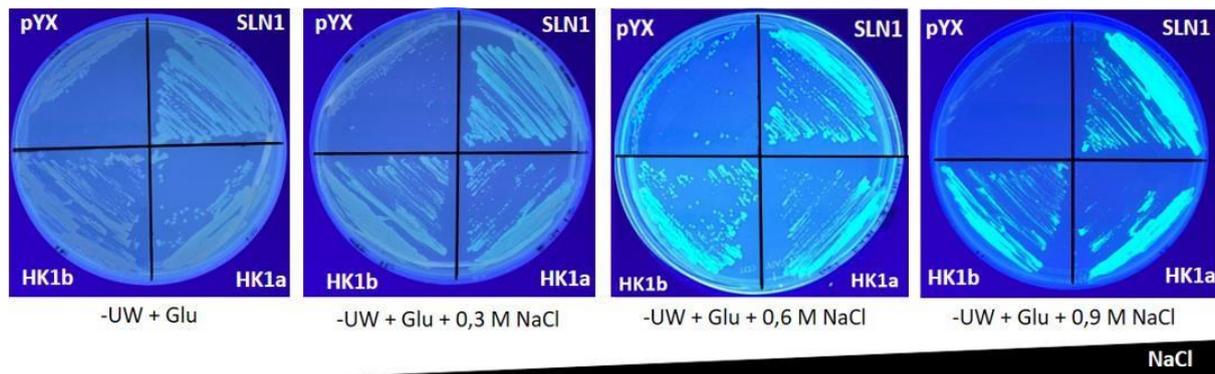


Figure 30. Vérification de la fonctionnalité du système rapporteur sous lumière UV.

Les constructions : pYX pour le contrôle négatif, pPD-SLN1 pour le contrôle positif, et pYX-HK1a ainsi que pYX-HK1b sont utilisées pour transformer la levure osmodéficiente MH1354 ($\Delta sln1 \Delta sho1$). Les levures transformées ont ensuite été étalées sur un milieu glucose en l'absence ou en présence de concentrations croissantes de NaCl (0 ; 0,3 ; 0,6 et 0,9 M) et incubées à 30 °C pendant 3 jours, afin d'évaluer respectivement la fluorescence de base et son augmentation.

Ces observations valident la fonctionnalité de notre système rapporteur d'osmosensing. Pour aller plus loin dans l'utilisation de ce système, nous avons également entrepris des mesures quantitatives de la fluorescence.

b. Analyse quantitative par mesure de la fluorescence GFP

Avant de procéder aux mesures quantitatives de fluorescence, plusieurs tests préliminaires ont été effectués pour définir les conditions optimales. Nous avons déterminé qu'une période de stress prolongée (une nuit d'incubation, résultat non montré) était nécessaire pour observer une fluorescence car aucune fluorescence n'était observée après un stress de courte durée (1h30 à 8h). Des tests sur différents volumes de culture et types de plaques (volumes de 100 μ L à 1,5 mL et plaques de 12 puits à 96 puits) ont également été effectués. Au final

nous avons retenu un protocole préconisant un volume de culture de 300 μ L dans des plaques de 96 puits.

L'utilisation de plaques de 96 puits permet de tester de nombreux échantillons en parallèle, ce qui est plus efficace en termes de temps et de ressources. De plus, l'utilisation de volume de culture de 300 μ L par puits permet de réduire la consommation de réactifs et de milieux de culture, ce qui est un avantage économique non négligeable.

Après une pré-culture sur la nuit, les cultures sont ajustées à une densité optique (DO_{600}) de 0,25, avant d'être incubées à 30°C durant 7-8 heures, jusqu'à atteindre une DO_{600} de 1. Des essais sur plaque ont été réalisés en présence ou en absence de stress osmotique, et les mesures de fluorescence ont été prises directement sur ces cultures de levure. En parallèle, la quantité de levure est estimée par la DO_{600} afin de procéder à la normalisation des valeurs de fluorescence pour obtenir des données comparables d'un test à l'autre. Les données normalisées ont révélé une augmentation de la fluorescence proportionnelle à la concentration en sel pour chacun des récepteurs testés (**Fig. 31**), confirmant les observations qualitatives précédentes sous UV.

Pour le contrôle négatif correspondant au vecteur d'expression vide (pYX), on observe une fluorescence basale faible qui augmente très légèrement avec les concentrations de NaCl (**Fig. 31**). Ces valeurs faibles de fluorescence constituent donc le « bruit de fond » de ces dosages. Pour le contrôle positif SLN1, on observe un niveau basal de fluorescence en absence de stress (0 M NaCl) qui augmente de façon significative aux concentrations de 0,6 et 0,9 M NaCl. Pour les osmosenseurs HK1a et HK1b, leur fluorescence basale sans stress est similaire à celle de SLN1, De même que l'augmentation de la concentration de NaCl à 0,6 et 0,9 M provoque une augmentation significative de la fluorescence. Il est intéressant de noter que la meilleure efficacité de HK1b par rapport à HK1a se retrouve également dans ces dosages (**Fig. 31**).

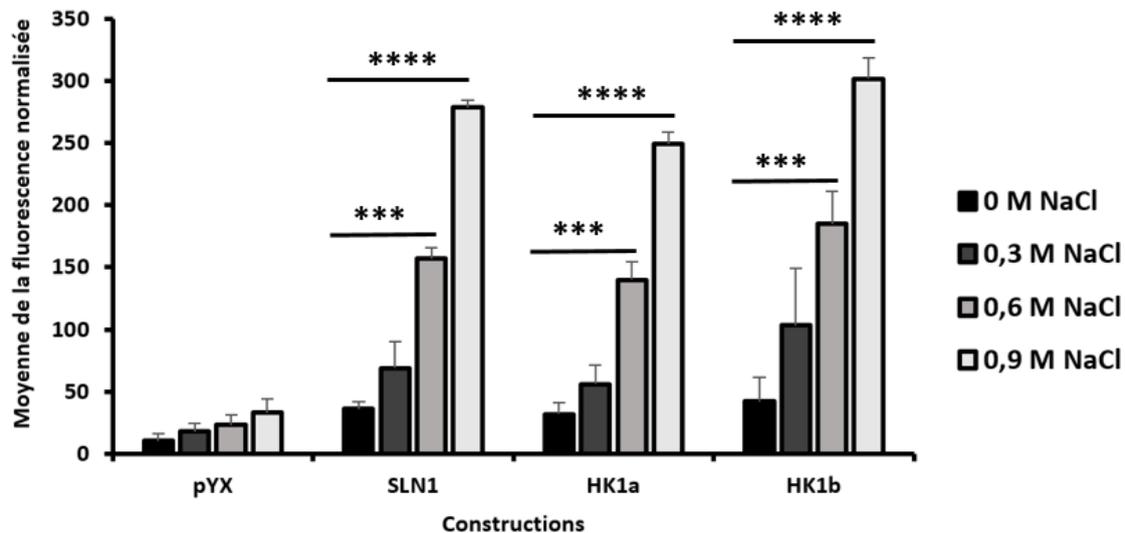


Figure 31. Vérification de la fonctionnalité du système rapporteur par mesure de la fluorescence.

Les pré-cultures de levure sont d'abord incubées à 30°C pendant une nuit, leur densité optique a été ajustée à une DO_{600} de 0,25 puis incubées 7h à 29 °C jusqu'à une DO_{600} de 1. Ensuite, elles sont placées dans des plaques à 96 puits en absence ou en présence des solutions de NaCl de différentes concentrations (0,3, 0,6 et 0,9 M NaCl) dans un volume final de 300 μ L pour induire un stress osmotique. Après une nouvelle incubation à 30 °C et en agitation pendant une nuit, les niveaux d'absorbance et de fluorescence sont mesurés pour évaluer la réponse des osmosenseurs au stress salin. Les mesures ont été prises à l'aide d'un spectrophotomètre de fluorescence, puis normalisées par rapport à la DO_{600} et rapportées en unités arbitraires (UA). Les barres d'erreur représentent l'écart-type de trois essais indépendants. Les différences statistiquement significatives sont marquées avec *** pour $p < 0.001$ et **** pour $p < 0,0001$, en utilisant un test 2way-Anova.

Ces résultats confirment la fonctionnalité de notre système rapporteur dans le contexte du stress osmotique. Afin de compléter cette étude, nous avons également cherché à savoir si ce système était capable de répondre à d'autres formes de stress osmotique. Le sorbitol est un agent osmotique couramment employé dans les études sur la levure pour explorer l'osmorégulation (Blomberg, 2022). De même le mannitol a été aussi utilisé comme agent osmotique dans la levure *S. cerevisiae* (Hamdi et al., 2020). Par ailleurs, le PolyEthylène Glycol (PEG), un agent osmotique non perméable de haut poids moléculaire (6000 Da), est couramment utilisé pour simuler des conditions de stress hydrique *in vivo* (Osmolovskaya et al., 2018). Contrairement au NaCl, ces agents ont l'avantage d'être exclusivement « osmotiques » en raison de leur nature non ionique, permettant ainsi d'étudier les effets du stress osmotique sans l'interférence des charges ioniques.

Sur la **Fig. 32**, les levures complémentées avec SLN1 montrent une augmentation de la fluorescence pour tous les agents osmotiques mais significative seulement avec NaCl et PEG, la réponse étant plus forte sous apport de sel (**Fig. 32C**). Une réponse similaire est observée lorsque les cellules sont complémentées par les récepteurs de peuplier avec des profils comparables soit une réponse plus intense avec NaCl (**Fig. 32A et B**). Les stress osmotiques générés par ajout de mannitol et de sorbitol ont induit une augmentation de fluorescence mais non significative à l'exception du sorbitol sur HK1b (**Fig. 32A et B**). Cela nous conduit à trois conclusions importantes. Premièrement, notre système rapporteur semble bien réagir à différents stress osmotiques, ce qui valide son fonctionnement en tant que système rapporteur d'osmosensing. Deuxièmement, le NaCl à une concentration de 0,9 M semble être l'agent de stress le plus efficace. Enfin, l'augmentation significative de fluorescence observée par ajout de PEG est un résultat très intéressant car l'ajout de cet agent osmotique mimant l'effet d'un déficit hydrique tel que subit par les plantes montre une activation significative du système et valide ainsi son utilisation avec les récepteurs de plantes HK1a et HK1b. Cependant, le résultat le plus marqué étant obtenu avec le NaCl, pour nos expériences futures, nous utiliserons systématiquement ce sel pour induire le stress osmotique.

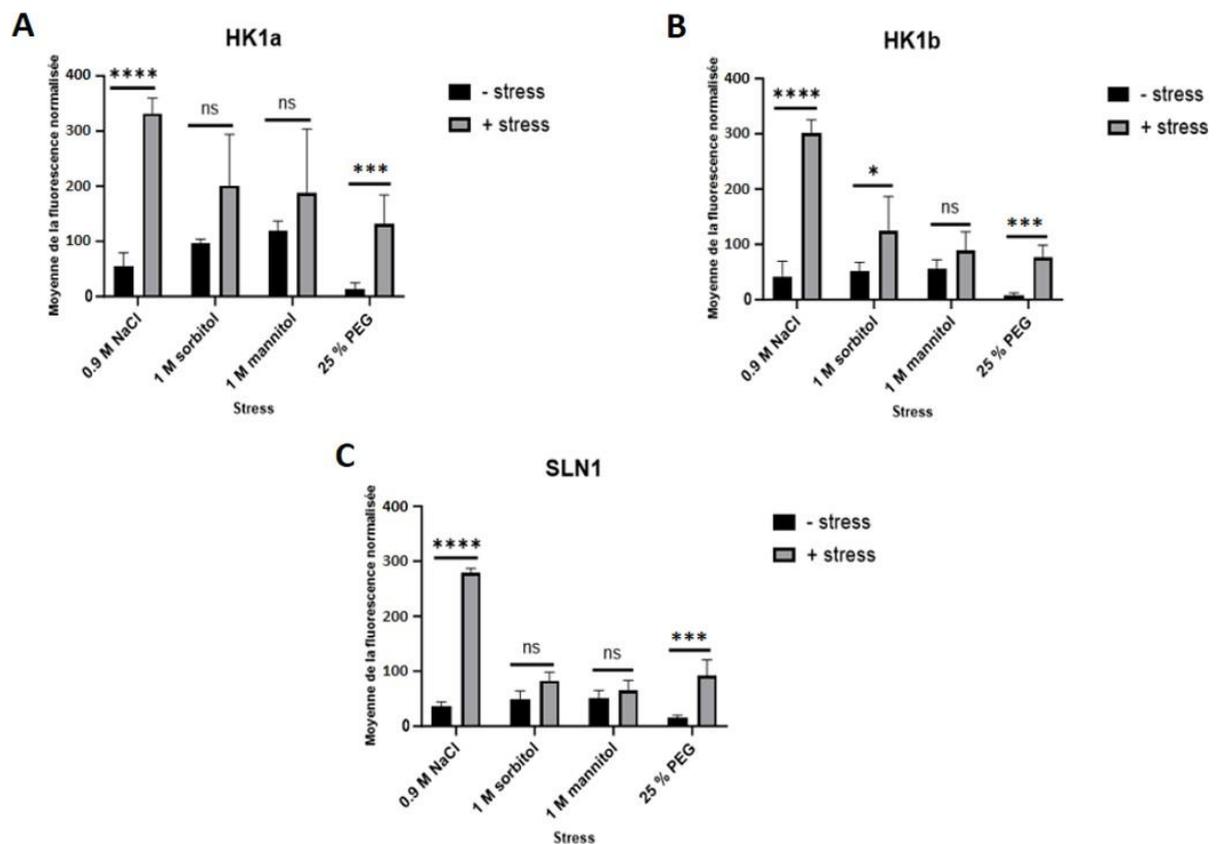


Figure 32. Réponse du système rapporteur face à divers agents osmotiques.

Des conditions de stress osmotique variées, avec 0,9 M de NaCl, 1 M de sorbitol, 1 M de mannitol et 25 % PEG ont été testées pour HK1a (A), HK1b (B) et SLN1 (C). Ces conditions ont été testées en trois essais indépendants, et les erreurs standard ont été calculées. Les valeurs représentent la moyenne \pm l'erreur standard de ces trois essais. Les différences statistiquement significatives sont marquées avec * pour $p < 0,05$ et **** pour $p < 0,0001$, en utilisant un test 2way-Anova.

Afin de comprendre les différences observées en termes d'émission de fluorescence lors de ces stress osmotiques, nous avons effectué des mesures d'osmolarité des milieux de culture contenant les différents agents de stress. Les mesures d'osmolarité montrent des valeurs fortes pour les milieux NaCl, sorbitol et mannitol alors que celle obtenue pour le milieu avec PEG est de 2,4 fois moins que celle avec NaCl. Le NaCl, ayant la plus forte osmolarité, induit une réponse de fluorescence plus intense. Il est également intéressant de noter que, malgré sa plus faible osmolarité, le PEG à 25% a induit une augmentation significative de la fluorescence (Tab. 11). Par contre, les milieux additionnés de sorbitol et de mannitol, quoique présentant des valeurs d'osmolarité plutôt fortes, n'ont pas permis une activation significative même si une augmentation de fluorescence pouvait néanmoins être observée

comparativement au milieu sans agent osmotique. Ces tests pourraient être réitérés afin d'améliorer les calculs statistiques.

Tableau 11. *Osmolarité mesurée pour les milieux avec différents agents osmotiques.*

Stress	Concentrations	Osmolarité (milliosmol)
NaCl	0.9 M	2179
Sorbitol	1 M	1709
Mannitol	1 M	1572
PEG	25 %	874

Suite à la mise en place d'un système rapporteur fonctionnel, nous avons établi un protocole expérimental dédié au criblage de ligands ciblant les récepteurs HK1a et HK1b (**Fig. 33**). Une pré-culture de levures dans un milieu sélectif –UW + Gal afin de permettre la croissance des levures osmodéficientes est nécessaire (par inhibition de la voie HOG dont l'expression constitutive est létale en condition non stressée). Les cultures sont ensuite ajustées à une DO₆₀₀ de 0,25 et incubées pendant 7 heures à 30°C, jusqu'à atteindre une DO₆₀₀ de 1 afin de réinitialiser des cultures en phase exponentielle de croissance pour une activité optimale. Les cellules sont ensuite reprises dans du milieu –UW + Glu (pour permettre la levée de l'inhibition de la voie HOG) avec ou sans addition de NaCl à 0,9 M pour induire un stress osmotique, puis réparties dans une plaque de 96 puits, dans un volume final de 300 µL. Les ligands ou extraits à tester sont ajoutés en même temps que le milieu avec NaCl. Après une incubation nocturne à 30°C avec agitation, les mesures d'absorbance et de fluorescence sont prises pour évaluer l'éventuelle interaction des osmosenseurs avec les différents ligands (**Fig. 33**).

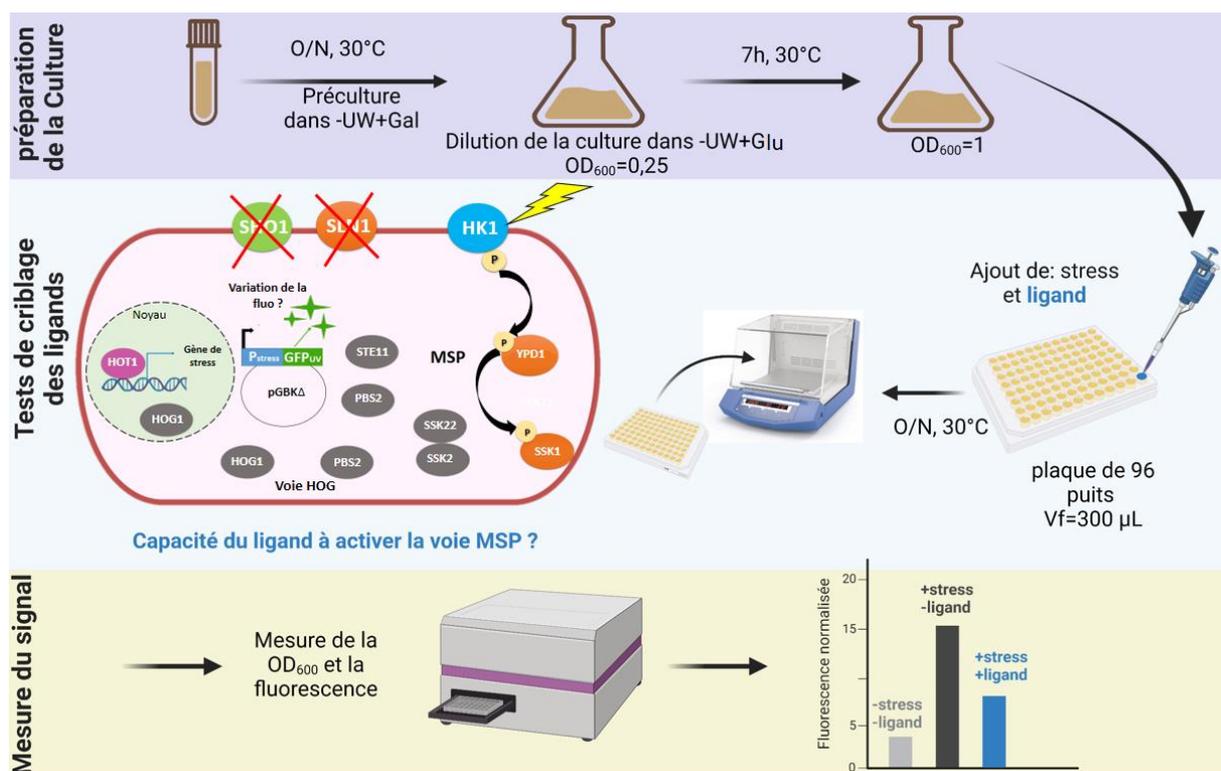


Figure 33. Schéma représentant le protocole de criblage des ligands pour les récepteurs HK1a et HK1b.

3. Validation de la fonctionnalité du système rapporteur en tant que système d'identification de biostimulant potentiel

Suite à la mise au point du protocole, notre premier objectif était d'utiliser ce système pour identifier le ou les ligands potentiels de nos récepteurs HK1. Cet aspect fondamental sera abordé dans le chapitre suivant. Dans un second temps, et dans une optique appliquée, l'objectif était de déterminer dans quelle mesure ce système rapporteur pouvait permettre l'identification d'extraits aux capacités biostimulantes. Pour ce faire, nous avons procédé à des tests en utilisant différents produits et biostimulants déjà commercialisés et utilisés dans le secteur agricole. Nous avons eu recours à des biostimulants dérivés d'algues et d'autres dérivés de levures.

a. Effet des biostimulants issus d'extraits d'algues sur la fonction des récepteurs HK1

Depuis longtemps, les algues ont été employées en agriculture comme engrais. Toutefois, ce n'est qu'au cours des dernières décennies que leurs propriétés biostimulantes ont été

reconnues et ont permis l'utilisation des polysaccharides de type laminarine, alginates et carraghénane dans le secteur agricole (*Khan et al., 2009 ; Craigie, 2011*). Dans le cadre du projet ProBioSec visant à identifier de nouveaux biostimulants pour la tolérance des plantes à la sécheresse, nous nous sommes tournés vers une société productrice de biostimulants à base d'algues, Algaïa. Cette entreprise nous a fourni un ensemble de 22 échantillons contenant à la fois des extraits commerciaux mais aussi des extraits expérimentaux à tester en aveugle. Ces tests constituent donc un moyen de valider la capacité de notre système à identifier de potentiel biostimulant. Initialement, les tests ont été menés sur le récepteur HK1b et réalisés à la fois en condition normale et en présence d'un stress osmotique induit par une concentration de 0,9 M de NaCl (**Fig. 34**).

En absence de stress, certains extraits ont entraîné une augmentation de la fluorescence, tandis que d'autres ont provoqué sa diminution par rapport au témoin sans biostimulant. Cependant, ces variations n'étaient pas considérées comme significatives étant donné la taille des barres d'erreur sauf pour E16 (**Fig. 34A**).

Lorsque le stress osmotique a été appliqué, la majorité des extraits ont entraîné une diminution de la fluorescence comparée au témoin sans extrait. Parmi eux, quatre biostimulants (E4, E13, E14 et E16) se sont distingués par une réduction plus marquée de la fluorescence, bien que non significative à cause de la taille des barres d'erreur, sauf pour E4 et E16 une fois de plus (**Fig. 34B**). Cette baisse suggère que ces extraits peuvent activer la voie MSP entraînant une diminution de la voie HOG, et donc de la fluorescence. Suite à ces résultats, l'entreprise nous a communiqué des informations sur la nature des échantillons. Parmi ces quatre extraits, E4 est actuellement en cours d'expérimentation en tant que biostimulant pour une meilleure tolérance au stress salin. Les trois autres extraits correspondent à des biostimulants déjà commercialisés pour la tolérance à la sécheresse. Malgré des résultats peu ou pas significatifs d'un point de vue statistique, le système rapporteur a quand même pointé des extraits effectivement reconnus comme biostimulant sur les plantes. Ces résultats encourageants vont donc dans le sens d'une validation de ce système rapporteur comme outil de détection de biostimulant potentiel.

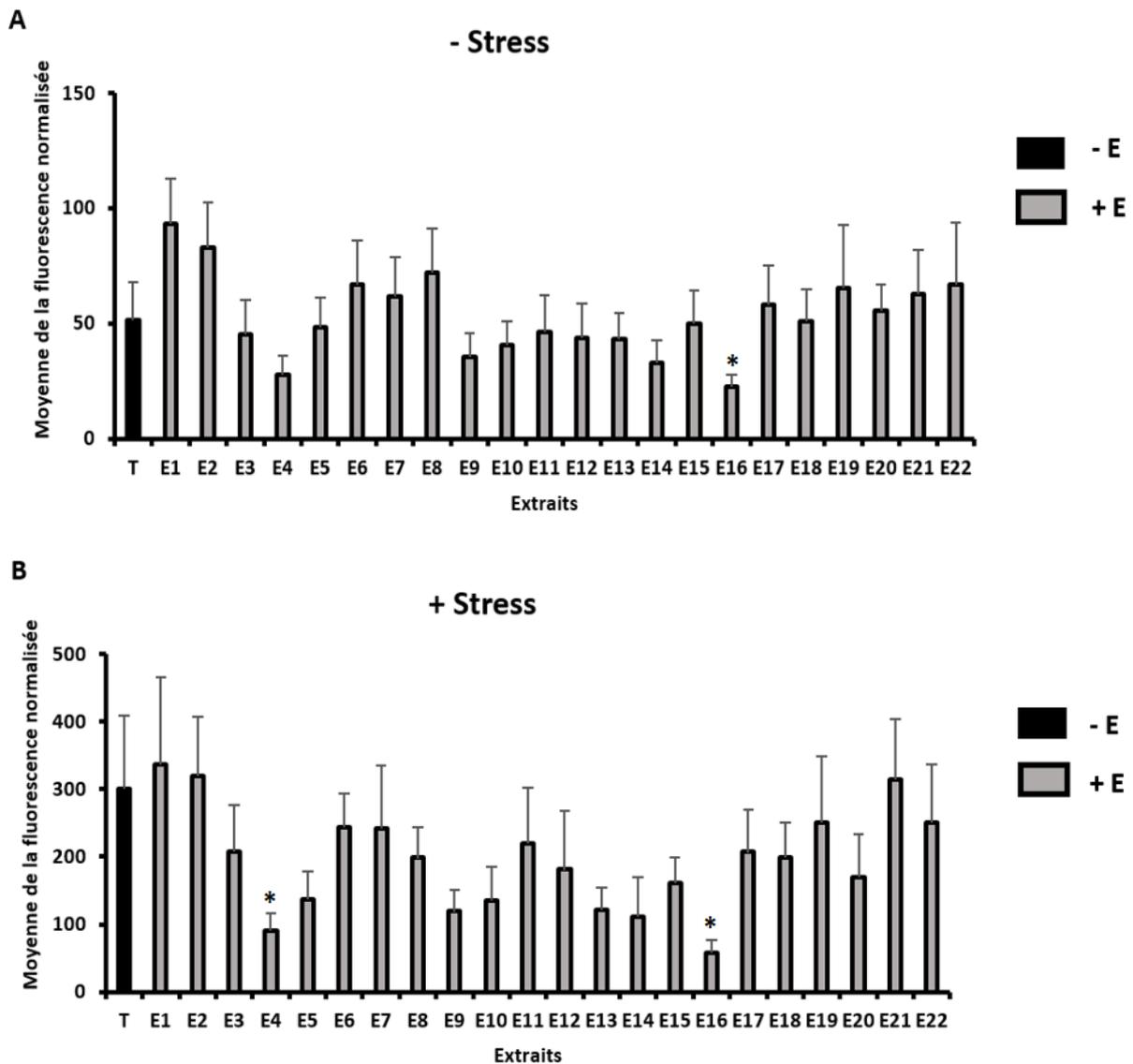


Figure 34. Évaluation de la fonctionnalité du système rapporteur à travers le criblage d'extraits dérivés d'algues.

A) Criblage sur le récepteur HK1b en absence de stress. **B)** Criblage sur le récepteur HK1b en présence de stress (0,9 M NaCl). La mention T renvoie au témoin sans biostimulant, et E indique extrait. Les différents extraits sont indiqués par des numéros allant de E1 à E22. Les mesures de la fluorescence sont normalisées par rapport à la DO_{600} et exprimées en unités arbitraires (UA). Les erreurs types proviennent de trois tests distincts. Les différences statistiquement significatives sont marquées avec * pour $p < 0,05$ en utilisant un test 2way-Anova.

Face à ces résultats obtenus avec HK1b, nous avons souhaité étendre nos tests aux autres osmosenseurs pour vérifier si les effets observés avec les biostimulants étaient reproductibles. L'entreprise nous a alors fourni de nouveaux extraits des biostimulants qu'elles souhaitent tester plus avant, à savoir E13, E14 et E17 - ce dernier étant une version plus concentrée du

biostimulant E16. Ces tests ont été réalisés sur SLN1, HK1a et HK1b, toujours en présence d'un stress osmotique induit par une concentration de 0,9 M de NaCl (**Fig. 35**).

Les résultats obtenus ont révélé que l'ajout des biostimulants E13 et E14 provoque une diminution significative de la fluorescence pour SLN1, HK1a et HK1b, avec une diminution de la fluorescence plus marquée pour HK1a, suggérant une interaction ou une sensibilité particulière de ces osmosenseurs à ces biostimulants (**Fig. 35A et B**). À l'inverse, le biostimulant E17 n'a pas montré d'effet significatif sur la fluorescence (**Fig. 35C**), tout comme dans le test effectué précédemment.

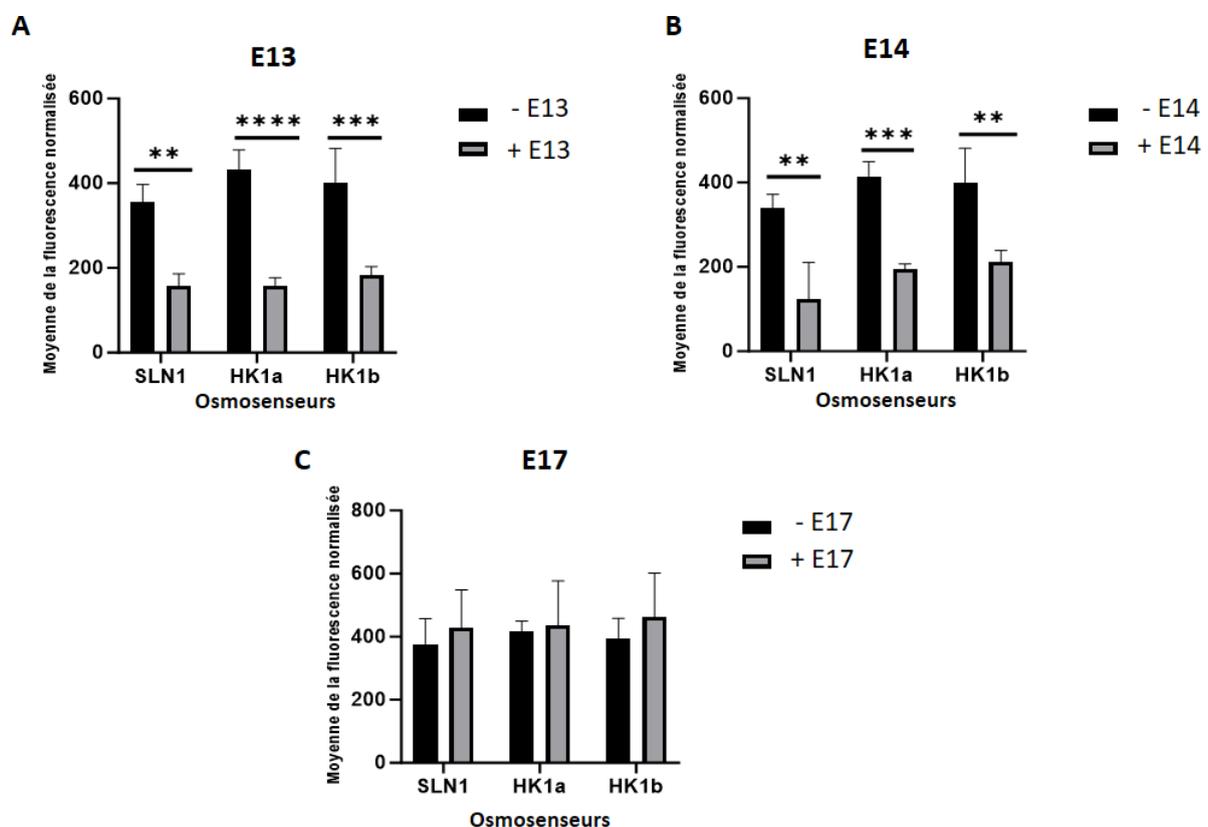


Figure 35. *Evaluation de l'effet des biostimulants E13, E14 et E17 sur SLN1, HK1a et HK1b.*

Les biostimulants E13 (A), E14 (B) et E17 (C) sont testés sur SLN1, HK1a et HK1b en présence de 0,9 M NaCl. E indique extrait. Les mesures de la fluorescence normalisées par rapport à la DO_{600} sont exprimées en unités arbitraires (UA). Les erreurs types proviennent de trois tests distincts. Les différences statistiquement significatives sont marquées avec ** pour $p < 0.01$, *** pour $p < 0.001$ et **** pour $p < 0,0001$, en utilisant un test 2way-Anova.

b. Effet des biostimulants issus de levure sur la fonction des récepteurs HK1

En complément des biostimulants issus d'algues, nous avons voulu consolider ces résultats en utilisant des produits du commerce de nature différente. Nous avons donc testé des produits issus de levure, commercialisés par la société Agrauxine. Ces composés, développés pour favoriser la croissance et la résilience des plantes, sont formulés à partir de divers produits dérivés de la levure, chacun avec une action distincte.

Biosmart : Biostimulant foliaire permettant de minimiser les effets des stress abiotiques tels que la sécheresse. Il est produit à partir de la fermentation des levures.

Moka : Biostimulant produit à partir d'extraits de levure. Il vise à favoriser les étapes de fructification des plantes.

Roméo : Il ne s'agit pas d'un biostimulant mais d'une solution de biocontrôle à base de parois cellulaires de levure.

Dans le cadre de notre protocole, ces produits ont été dilués 500 fois dans le milieu –UW + Glu, et les tests ont été menés sous un stress osmotique induit par 0,9 M de NaCl (**Fig. 36**). De manière notable, l'ajout de Biosmart a provoqué une élévation significative de la fluorescence pour tous les osmosenseurs étudiés (SLN1, HK1a et HK1b), avec cependant une significativité encore plus marquée pour HK1a et HK1b (**Fig. 36A**). Ces observations indiquent une interaction de Biosmart avec ces osmosenseurs suggérant que ce biostimulant serait capable d'augmenter l'extinction du MSP du au stress, entraînant une plus grande activation de la voie HOG et donc une augmentation de la fluorescence. D'un autre côté, la réponse observée pour Moka et Roméo indique que ces produits n'ont pas d'effet sur les récepteurs testés (**Fig. 36B et C**).

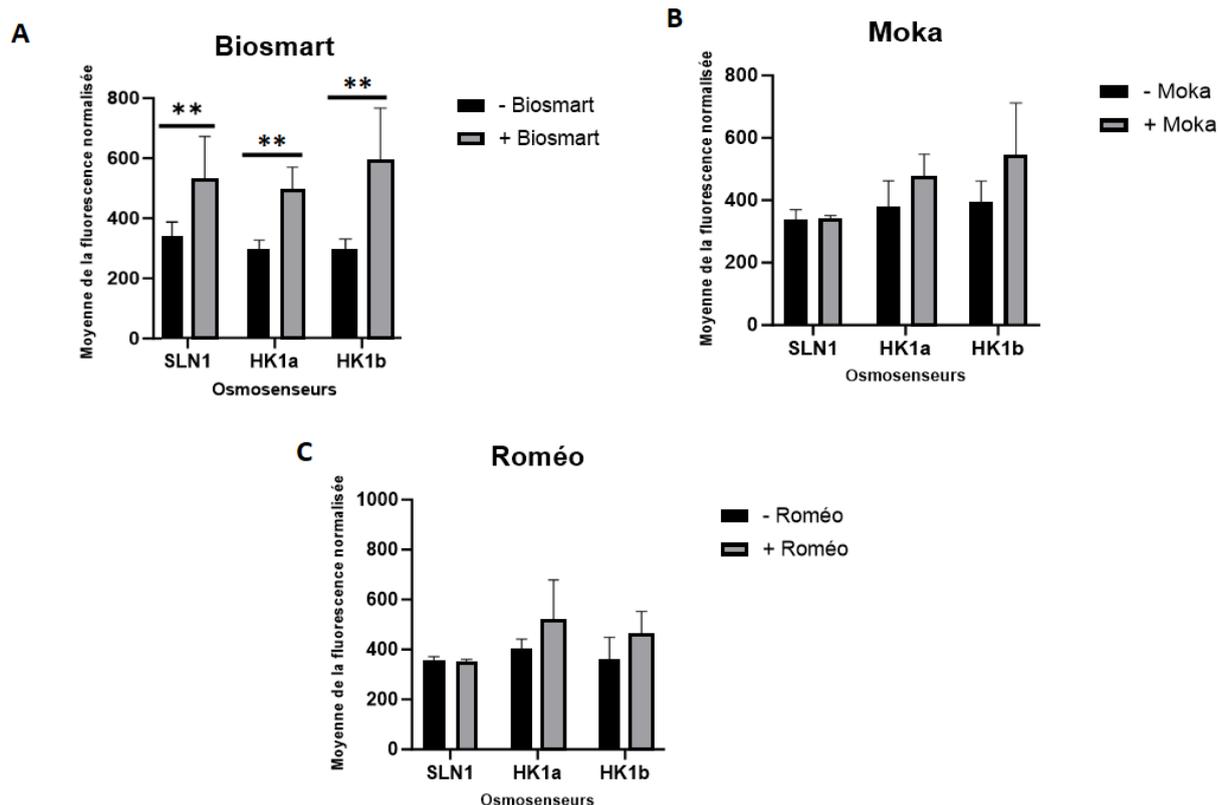


Figure 36. *Evaluation de l'effet des biostimulants issus de levure sur SLN1, HK1a et HK1b.*

Les produits commerciaux issus de levure Biosmart (A), Moka (B) et Roméo (C) ont été testés pour leur capacité à modifier l'activité de SLN1, HK1a et HK1b en présence de 0,9 M NaCl. Les mesures de la fluorescence sont normalisées par rapport à la DO_{600} et exprimées en unités arbitraires (UA). Les erreurs types proviennent de trois tests distincts. Les différences statistiquement significatives sont marquées avec ** pour $p < 0.01$, *** pour $p < 0.001$ et **** pour $p < 0,0001$, en utilisant un test 2way-Anova.

C. Discussion et perspectives

Afin d'explorer des interactions entre les osmosenseurs et des molécules ligands, nous avons élaboré un système rapporteur d'osmosensing utilisable comme outil d'identification de biostimulant.

La construction de notre système a impliqué plusieurs étapes dont la principale a été d'identifier un gène le plus spécifique possible de la réponse au stress osmotique. Le caractère unique de l'activation du gène STL1 en présence de stress osmotique (Bai *et al.*, 2015) a été une réelle opportunité. En combinaison avec le gène marqueur GFP, nous avons pu créer un système simple répondant à ce stress, à la fois qualitatif et quantitatif. De plus, l'introduction

des constructions HK1a et HK1b permet d'obtenir un modèle exprimant des récepteurs végétaux, plus pertinents pour tester des extraits végétaux.

Nous avons étudié la réponse des osmosenseurs SLN1, HK1a et HK1b face au stress osmotique généré par différents agents osmotiques. L'augmentation la plus forte a été observée en présence de 0,9 M NaCl mais tous les agents testés ont permis une augmentation de la fluorescence, bien que non significative pour le sorbitol et le mannitol. En présence de sorbitol, une exception notable a été observée pour HK1b, où l'augmentation était significative. Il est intéressant de noter que l'osmolarité du milieu contenant 0,9 M de NaCl était la plus élevée, surpassant celle observée avec 1 M de sorbitol. Cette observation s'aligne avec des études antérieures qui ont montré que le NaCl a un effet osmotique sur les cellules à 0,5 M semblable à celui du sorbitol à 1 M. Cette réponse pourrait être due à une combinaison d'effets osmotiques dus à la dissociation du NaCl en ions Na⁺ et Cl⁻ et de possibles effets secondaires relatifs à la toxicité ionique spécifique (*Blomberg & Adler, 1992 ; Blomberg, 2022*). Contrairement au NaCl, le sorbitol, de par sa nature non ionique, est peu assimilé par *S. cerevisiae*, ce qui pourrait le rendre métaboliquement inerte comme agent stressant (*Sarthy et al., 1994 ; Blomberg, 2022*). De plus, étant un polyol, le sorbitol est bénin pour la machinerie cellulaire et il pourrait potentiellement s'accumuler intracellulairement pour agir comme osmolyte. D'ailleurs, il joue le rôle d'osmolyte chez certains organismes (*Yancey, 2005 ; Blomberg, 2022*) et pourrait même remplacer, dans une certaine mesure, le rôle osmoprotecteur du glycérol chez la levure (*Blomberg, 2022*), d'où peut-être l'effet léger de l'augmentation de la fluorescence.

Le mannitol est également une molécule non ionique et donne une réponse tout à fait comparable au sorbitol. En revanche, le PEG à 25% présente une osmolarité notablement inférieure par rapport aux autres agents évalués, mais induit une augmentation significative de la fluorescence. Étant un polymère de haute masse moléculaire (6000 Da), le PEG pourrait restreindre l'entrée et la sortie de diverses molécules ou ions de la cellule, amplifiant ainsi le stress cellulaire (*Maurya et al., 2022*).

Dans l'optique de valider ce système rapporteur en tant qu'outil d'identification de potentiel biostimulant, nous avons cherché à démontrer que des biostimulants reconnus puissent être effectivement identifiés par ce système. Ainsi, nous avons testé des produits commerciaux,

biostimulants ou non, afin de tester la réactivité et la spécificité de notre système rapporteur face à des agents connus pour améliorer l'activité biologique des plantes. En testant des biostimulants issus d'algues, nous avons obtenu des résultats prometteurs dans la mesure où les quatre produits pointés par le système correspondent effectivement à des biostimulants pour la tolérance des plantes à la sécheresse ou au stress salin. Toutefois, il est à noter que le biostimulant E17, bien qu'étant une version concentrée de E16, n'a pas donné la même réponse que ce dernier, et reste sans effet dans notre système. Cette disparité suggère que la concentration de composés actifs peut être critique pour sa détection. Un excès de certains composants dans E17 pourrait perturber le métabolisme cellulaire ou même être toxiques, annulant ainsi les effets bénéfiques observés avec E16. Cela pointe du doigt une limite de notre système rapporteur qui ne semble pas être adapté à tous les extraits. D'une manière générale, les résultats ont montré une diminution de la fluorescence en situation de stress. Cette observation suggère que ces échantillons pourraient interagir, directement ou indirectement, avec les osmosenseurs, réactivant ainsi la voie MSP partiellement éteinte par le stress osmotique, et conduisant à une diminution de la réponse de la cellule au stress.

Pour les produits issus de levure, seul Biosmart a permis une augmentation significative de la fluorescence en présence de stress. Étant le seul produit, parmi les trois, proposé comme biostimulant pour la sécheresse, ce résultat encourageant nous conforte dans la spécificité de notre système. Par ailleurs, l'augmentation de fluorescence observée suggère que le biostimulant exerce une action qui accentue l'extinction de la voie MSP générée par le stress, conduisant à une augmentation de la réponse de la cellule au stress. De façon surprenante, il s'agit là d'une réponse opposée à celle observée pour les produits issus d'algues. Cependant, dans les deux cas une altération de la réponse du système en présence de l'extrait a été mesurée pour des produits reconnus pour leurs effets bénéfiques sur la tolérance des plantes à la sécheresse. Des tests supplémentaires, avec des dilutions différentes ou des biostimulants commerciaux différents, semblent donc nécessaires pour comprendre plus précisément le mécanisme d'action mis en œuvre dans ce système rapporteur.

L'ensemble des expériences menées jusqu'à présent ont examiné les effets de ces produits lors d'un stress court (une nuit) dans des conditions de culture liquide. Cependant, il pourrait être intéressant de regarder comment ces extraits agissent lors d'un stress long. En utilisant

des cultures sur milieu solide avec les extraits infusés dans le milieu (comme cela a été fait pour le PEG dans le chapitre I), il serait possible de tester la réponse du système de façon continue pendant plusieurs jours. Cela permettrait de déterminer non seulement si l'extrait peut aider les cellules à gérer le stress initial, mais aussi s'il fournit une protection continue ou renforcée contre le stress osmotique sur la durée.

En conclusion, nous avons réussi à élaborer un biosenseur efficace, capable de percevoir et de réagir aux variations de l'environnement osmotique. De plus, les résultats prometteurs obtenus dans cette étude nous ont conduit à faire une demande de dépôt de brevet pour l'exploitation de ce biosenseur comme outil d'identification d'extraits aux capacités biostimulantes pour la tolérance des plantes à la sécheresse.

CHAPITRE IV

Exploration de ligands potentiels pour les récepteurs
HK1

A. Contexte et objectifs de l'étude

L'interaction des récepteurs de type osmosenseur avec leurs ligands potentiels demeure largement inexploré dans le domaine végétal. Malgré l'importance de cette interaction dans le mécanisme de la voie MSP face au stress hydrique, la nature précise des molécules ligands échappe toujours à notre compréhension. Les indices existants, notamment dans la levure, suggèrent que des éléments de la paroi pourraient avoir des interactions avec l'osmosenseur SLN1. En effet, il a été montré qu'une protéine pariétale pourrait jouer un rôle modulateur de l'activité de l'osmosenseur SLN1 (*Shankarnarayan et al., 2008*). Cependant, les identités moléculaires spécifiques restent indéterminées.

L'exploration des ligands constitue non seulement une étape fondamentale pour décrypter les mécanismes de perception du stress osmotique chez le peuplier, mais elle ouvre également des horizons pour développer de nouvelles stratégies d'amélioration de la tolérance des plantes à la sécheresse.

Ce challenge posé par la méconnaissance des interactions moléculaires entre les récepteurs HK1 et leurs ligands potentiels a été abordé par une stratégie d'approche double : d'une part, cibler des molécules déjà identifiées pour leur interaction avec des domaines similaires chez d'autres organismes, et d'autre part adopter une approche exploratoire et donc aléatoire.

- **Approche ciblée** : Guidés par des informations préexistantes dans la littérature, nous avons exploré l'interaction des récepteurs de peuplier avec des molécules déjà identifiées pour d'autres récepteurs chez les procaryotes. Ces ligands potentiels, notamment des acides aminés, offrent un point de départ intéressant pour cette étude.
- **Approche aléatoire** : En adoptant une démarche exploratoire, nous avons testé des extraits végétaux dérivés du peuplier, à la fois de ses feuilles et de ses racines. Grâce au système rapporteur que nous avons développé, ces extraits ont été criblés pour identifier des molécules potentiellement actives. Les extraits végétaux qui se sont révélés actifs ont ensuite été testés sur plantes entières (fleuries, fruitiers, potagers et vigne), afin d'évaluer leur capacité à renforcer la tolérance des plantes face à la sécheresse.

B. Résultats

1. Approche ciblée : test de molécules candidates (acides aminés)

La recherche des ligands potentiels des domaines CACHE a conduit à de nombreuses investigations chez les procaryotes. Par exemple, l'utilisation des structures tridimensionnelles disponibles de plusieurs récepteurs bactériens de surface cellulaire a permis de définir huit modèles computationnels de domaine CACHE (*Upadhyay et al., 2016*). A ce jour, seuls quelques-uns de ces domaines possèdent des ligands identifiés. Parmi ces domaines, on trouve la famille dCache_1 (double Cache 1^{er} modèle) à laquelle appartient le domaine CACHE des récepteurs HK1. La majorité des ligands connus pour cette famille correspondent à des acides aminés et des petits acides organiques (*Upadhyay et al., 2016*). Suivant cette idée, nous avons entrepris des tests ciblés pour évaluer la capacité des acides aminés, dans un premier temps, à se lier aux récepteurs HK1.

L'ensemble des 20 acides aminés a été préparé dans un milieu aqueux, à l'exception de l'aspartate (Asp) et du tryptophane (Trp) qui ont été préparés dans 1 M et 2M HCl respectivement, et de la phénylalanine (Phe) dans 1 M NH₄OH. Les acides aminés ont été testés à une concentration de 0,02 M en présence d'un stress salin induit par 0,9 M de NaCl.

L'analyse des résultats a révélé que la majorité des acides aminés n'a pas significativement modifié les niveaux de fluorescence pour HK1a et HK1b, indiquant une interaction négligeable ou inexistante avec ces récepteurs dans les conditions testées (**Fig. 37**). Cependant, une exception notable a été observée pour le tryptophane (Trp). En présence de cet acide aminé, une baisse significative de la fluorescence a été enregistrée pour les deux récepteurs, HK1a et HK1b (**Fig. 37**). Cette diminution suggère une interaction potentielle entre le tryptophane et les récepteurs, qui pourrait activer la voie MSP et donc réduire la voie HOG en présence de stress salin.

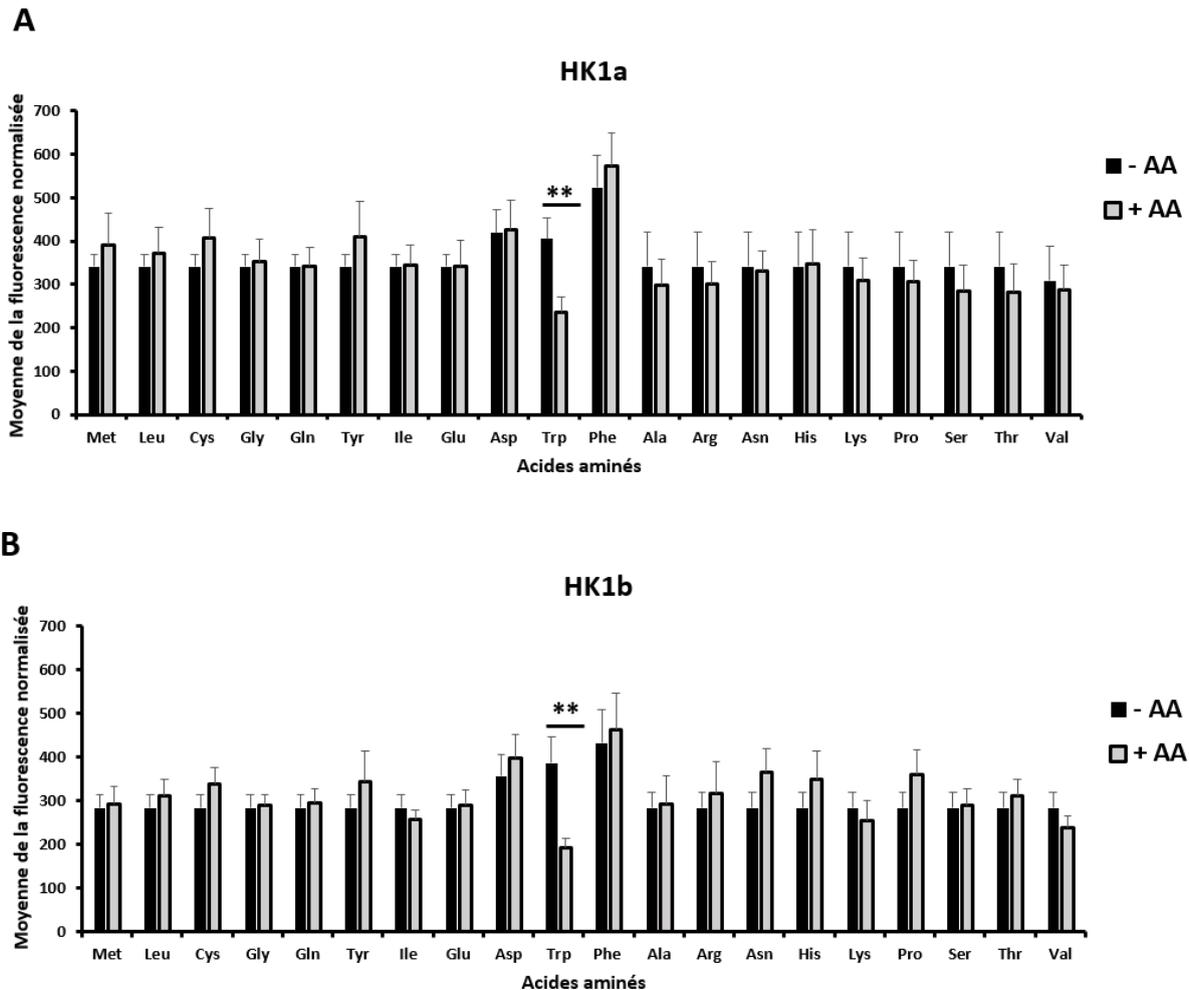


Figure 37. Criblage des 20 acides aminés pour leur interaction avec les récepteurs HK1a et HK1b.

Les 20 acides aminés ont été testés pour leur capacité à se fixer sur les récepteurs HK1a (A) et HK1b (B) en présence de 0,9 M NaCl. Les mesures de la fluorescence sont normalisées par rapport à la DO_{600} et exprimées en unités arbitraires (UA). Les erreurs types proviennent de 6 tests distincts. AA indique Acide Aminé. Les différences statistiquement significatives sont marquées avec ** pour $p < 0.01$ en utilisant un test 2way-Anova.

Pour évaluer plus avant l'interaction observée entre le tryptophane et les récepteurs HK1a et HK1b en présence de 0,9 M NaCl, des expérimentations complémentaires ont été réalisées avec des concentrations de NaCl réduites. L'objectif était de déterminer si l'effet du tryptophane sur les récepteurs était maintenu dans des conditions de stress osmotique moindre. De plus, nous avons testé cet acide aminé sur l'osmosenseur de levure SLN1.

Ces tests ont révélé que l'effet notable du tryptophane sur la fluorescence des récepteurs, observé précédemment à 0,9 M NaCl, s'atténuait considérablement à des concentrations plus faibles. Ainsi, à 0,3 M et 0,6 M NaCl, l'impact du tryptophane sur HK1a, HK1b et l'osmosenseur

de levure SLN1 n'était plus significatif, bien que la baisse de signal soit toujours observable à 0,6 M. (Fig. 38A, B et C).

De façon étonnante, même lorsque le niveau de stress osmotique était maintenu à 0,9 M NaCl, le tryptophane ne semblait pas influencer significativement l'activité de SLN1 (Fig. 38C), contrairement à ce qui a été observé pour HK1a et HK1b. Ce résultat suggère une spécificité pour les récepteurs du peuplier, qui ne s'étend pas nécessairement à l'osmosenseur de levure.

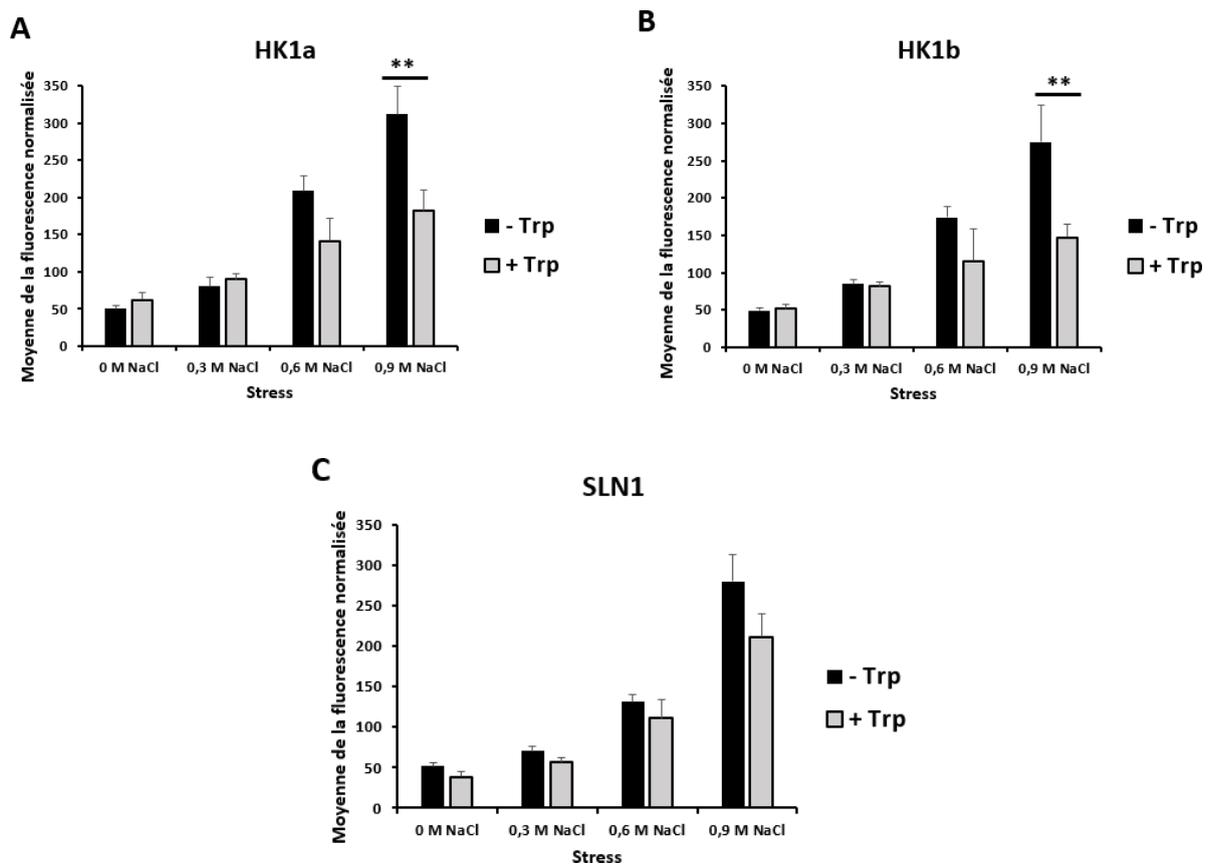


Figure 38. Effet du tryptophane sur l'activité des osmosenseurs SLN1, HK1a et HK1b.

Le Tryptophane (Trp) a été testé pour son capacité à se fixer sur les récepteurs HK1a (A), HK1b (B) et SLN1 (C) en absence et en présence de concentrations croissantes de NaCl (0,3, 0,6 et 0,9 M). Les mesures de la fluorescence sont normalisées par rapport à la DO_{600} et exprimées en unités arbitraires (UA). Les erreurs types proviennent de 6 tests distincts. Les différences statistiquement significatives sont marquées avec ** pour $p < 0.01$ en utilisant un test 2way-Anova.

2. Approche aléatoire

Le choix de tester les extraits de feuilles et de racines du peuplier repose sur le fait que les récepteurs HK1a et Hk1b sont exprimés aussi bien dans les racines que dans les feuilles (Héricourt *et al.*, 2013 ; 2016). De ce fait, l'utilisation d'un extrait foliaire semblait tout à fait envisageable, permettant ainsi l'utilisation d'une biomasse importante peu exploitée chez le peuplier et facilement accessible. Par ailleurs, notre équipe travaillant sur des projets parallèles impliquant la production de différents types d'extraits racinaires, nous avons également souhaité profiter de cette opportunité pour tester ces phytoextraits produits en interne.

a. Tests d'extraits foliaires de peuplier

Afin d'obtenir des phytoextraits les plus variés possibles, nous avons effectué des récoltes de feuilles sur une dizaine de génotypes différents de peuplier, dans des conditions de culture différentes et à des temps de croissance différents. Ces récoltes ont été effectuées la première année sur deux sites distincts de l'INRAE : Ardon et St-Cyr-en-Val. Sur le site d'Ardon, quatre génotypes de peuplier ont été utilisés : Skado, Koster, Dellinois et Pourtet. Ces derniers participent à un dispositif expérimental soumis à deux conditions hydriques différentes : irriguée et non irriguée. Trois périodes de récolte ont été choisies durant la saison de croissance : en début (Juillet), au milieu (Septembre) et en fin de saison (Octobre) (**Fig. 39**) (pour plus de détails, voir section matériels et méthodes). Sur le site de St-Cyr-en-Val, la récolte a porté sur les génotypes Dorskamp, Flevo, I-214, Triplo et Monviso. À la différence de l'autre site, une seule récolte a été réalisée en début de saison (Juillet) en raison de la difficulté d'accès aux différents arbres de cette parcelle expérimentale (**Fig. 39**). Suite aux récoltes, les feuilles ont été congelées immédiatement dans l'azote liquide puis fournies au partenaire du projet, l'Institut de Chimie Organique et Analytique (ICOA) pour extraction et analyse par UHPLC-MS (voir matériels et méthodes). Différents protocoles d'extraction ont été adoptés en utilisant des solvants issus de la chimie verte afin d'enrichir la diversité des extraits. Ces extractions ont conduit à l'obtention de 34 extraits différents qui ont été criblés dans le système rapporteur fluorescent.

Durant la deuxième année, la récolte a été faite uniquement sur les deux génotypes sélectionnés lors des criblages en première année et en plus grande quantité pour les essais

sur plante. De grands volumes de phytoextraits ont alors été produits et fournis à la station d'expérimentation horticole partenaire du projet, le Comité de Développement Horticole de la Région Centre-Val-de-Loire (CDHR-CVL), où ils ont été testés sur un seul type de plante, les pensées (*Viola x wittrockiana*), à titre d'expérimentation préliminaire (**Fig. 39**).

La troisième année, les deux phytoextraits ayant donné des résultats intéressants ont été expérimentés sur toute la gamme de plantes horticoles incluant les plantes fleuries comme la Nemesia (*Nemesia fruticans*) et la rose d'Inde (*Tagetes erecta*), les plantes fruitières telles que le framboisier (*Rubus idaeus*) ainsi que les plantes potagères comme les tomates (*Solanum lycopersicum*). De plus, ces deux phytoextraits ont également été utilisés pour des essais sur vigne (cépage chenin blanc) avec une autre station d'expérimentation végétale partenaire du projet, l'Institut Français de la Vigne et du vin (IFV). Les premiers essais étant actuellement en cours, ces expérimentations ne seront pas présentées dans ce manuscrit. En parallèle de ces tests, une étude approfondie a été menée à l'ICOA afin d'identifier, par Spectrométrie de Masse à Haute Résolution (HRMS), les composés chimiques contenus dans les phytoextraits qui ont démontré un effet bénéfique sur les pensées lors des expérimentations précédentes (**Fig. 39**).

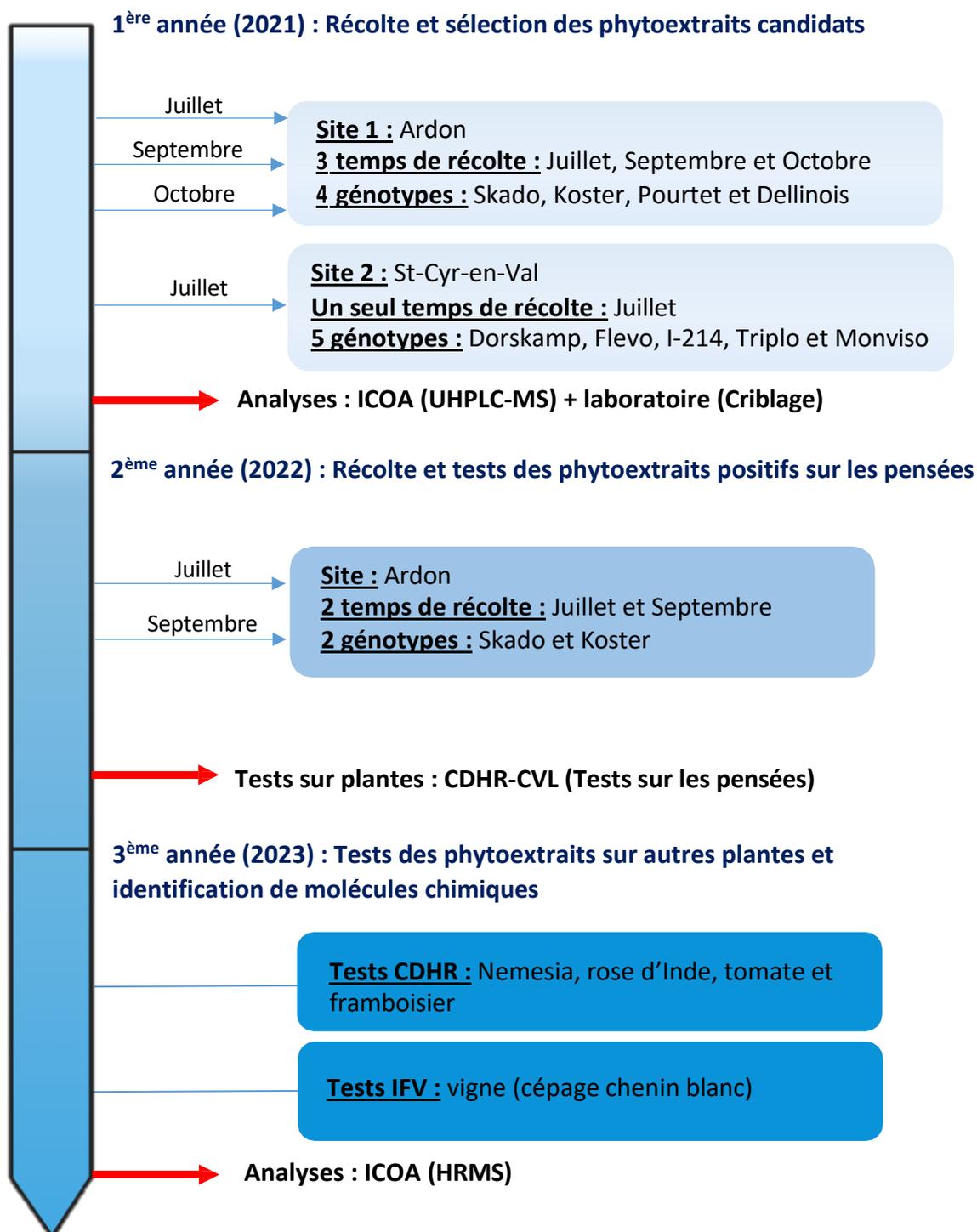


Figure 39. Frise chronologique des différentes étapes de récoltes des feuilles de peuplier et d'analyses des phytoextraits dans le cadre du projet ProBioSec.

1) Sélection des phytoextraits candidats

Pour les phytoextraits du site de St-Cyr-en-Val, deux méthodes d'extraction ont été utilisées avec deux solvants différents : l'éthanol 70 % et l'acétate d'éthyle 100%. Pour la première extraction à l'éthanol, le résidu sec a été repris dans de l'éthanol 50%. Parallèlement, le culot

sec issu de l'extraction à l'acétate d'éthyle a été repris dans un mélange acétonitrile/isopropanol à 50%. Pour les phytoextraits du site d'Ardon, un seul solvant d'extraction a été utilisé, l'éthanol 70 %, puis le résidu sec a été repris dans de l'éthanol 50 %.

Pour assurer la détection des composés, quatre types de détecteurs ont été utilisés (voir matériels et méthodes), mais que deux qui ont été privilégiés et les deux autres se sont révélés moins pertinents car ils montraient nettement moins de composés par rapport aux deux principaux utilisés. Le premier détecteur, opérant dans l'UV à 280 nm, permet de détecter principalement les composés pourvus de groupements chromophores, tels que les polyphénols ou flavonoïdes. Le second, un détecteur DEDL, permet de détecter des composés moins volatils que la phase mobile, y compris des molécules telles que les sucres ou terpènes, moins perceptibles en UV.

(1) Phytoextraits du site de St-Cyr-en-Val

L'analyse chromatographique avec le détecteur UV à 280 nm montre des profils chromatographiques distincts selon le solvant d'extraction utilisé, que ce soit l'éthanol ou l'acétate d'éthyle. Chaque génotype présente un profil chromatographique spécifique, avec des pics distincts à différentes rétentions.

De plus, certains pics spécifiques semblent être présents dans un solvant et absents dans l'autre. En effet, lors de l'extraction à l'éthanol 70%, on remarque la présence de deux groupes de composés majoritaires pour les cinq génotypes étudiés. La première série, observable entre 3 et 8 minutes, correspond aux polyphénols, et la seconde, s'étendant entre 8 et 14 minutes, est associée aux flavonoïdes (**Fig. 40A**). De plus, la méthode d'extraction avec l'acétate d'éthyle 100% a révélé une troisième catégorie de composés, détectée entre 22 et 27 minutes, correspond aux terpènes (**Fig. 40B**).

Ainsi, les profils chromatographiques dérivés de l'éthanol 70 % (**Fig. 40A**) affichent des intensités plus marquées pour certains pics comparativement à ceux issus de l'acétate d'éthyle 100 % (**Fig. 40B**). Par exemple, le pic le plus prononcé dans le phytoextrait Dorskamp semble atteindre près de 200 mAU en utilisant l'éthanol 70 %, alors qu'en utilisant l'acétate d'éthyle 100 %, cette intensité atteignait que 20 mAU (flèches noires). Dans l'ensemble, les résultats présentent des profils variés tant en nature qu'en intensité en fonction des génotypes et des solvants utilisés.

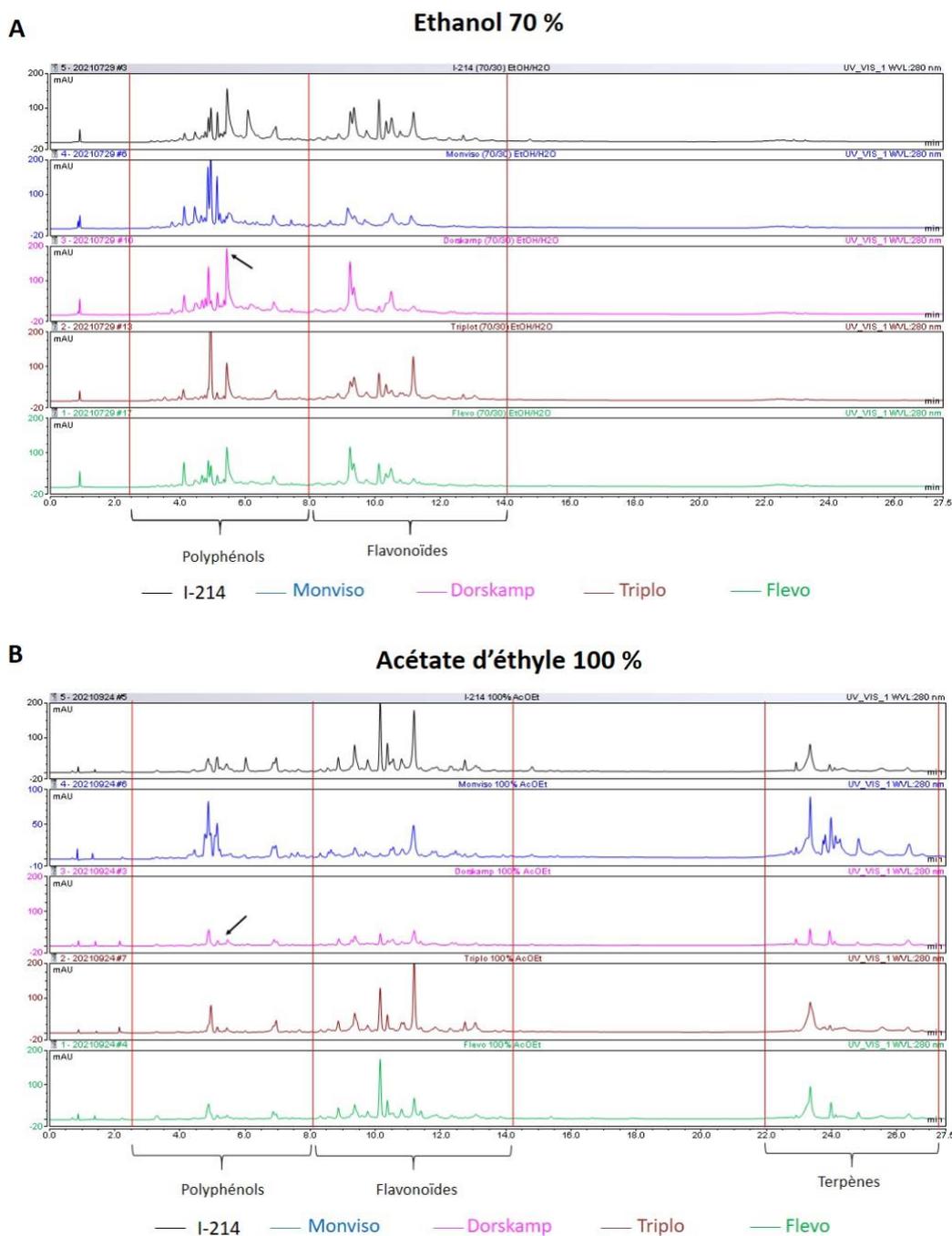


Figure 40. Profils chromatographiques obtenus par UHPLC-MS des phytoextraits foliaires des cinq génotypes de la récolte de St-Cyr-en-Val.

Comparaison des profils chimiques des phytoextraits de cinq génotypes (I-214, Monviso, Dorskamp et Flevo) de site de St Cyr issus de la première récolte (Juillet). Deux méthodes d'extraction ont été utilisées : dans l'éthanol à 70 % (A) et dans l'acétate d'éthyle à 100 % (B). L'analyse a été réalisée à l'ICOA en utilisant un système UHPLC-MS et un détecteur de type UV₂₈₀. L'axe des abscisses représente le temps de rétention (min) et l'axe des ordonnées indique l'intensité du signal en milli unité d'absorbance (mAU). Les flèches noires indiquent le pic le plus prononcé dans Dorskamp en utilisant l'éthanol 70 % (A) et le pic correspondant en utilisant l'acétate d'éthyl 100 % (B).

(2) Phytoextraits du site d'Ardon

Pour les échantillons du site d'Ardon, seule l'extraction à l'éthanol 70% a été utilisée. En utilisant le détecteur UV à 280 nm, nos observations chromatographiques ont révélé des tendances similaires à celles identifiées chez les génotypes de St-Cyr-en-Val en utilisant l'éthanol à 70%, deux régions distinctes de composés se sont démarquées : une première qui correspond aux polyphénols et une deuxième aux flavonoïdes (**Fig. 41**). De plus, une tendance se dessine à travers les trois temps de récoltes : les profils chimiques sont semblables, mais on observe une intensification des pics chromatographiques au fil du temps, comme montré pour le génotype Skado irrigué (**Fig. 41**). Cette tendance à la hausse de l'intensité des signaux est également perceptible pour les autres génotypes que ça soit irrigués ou non irrigués (résultats non montrés). Les composés semblent s'accumuler au cours du temps.

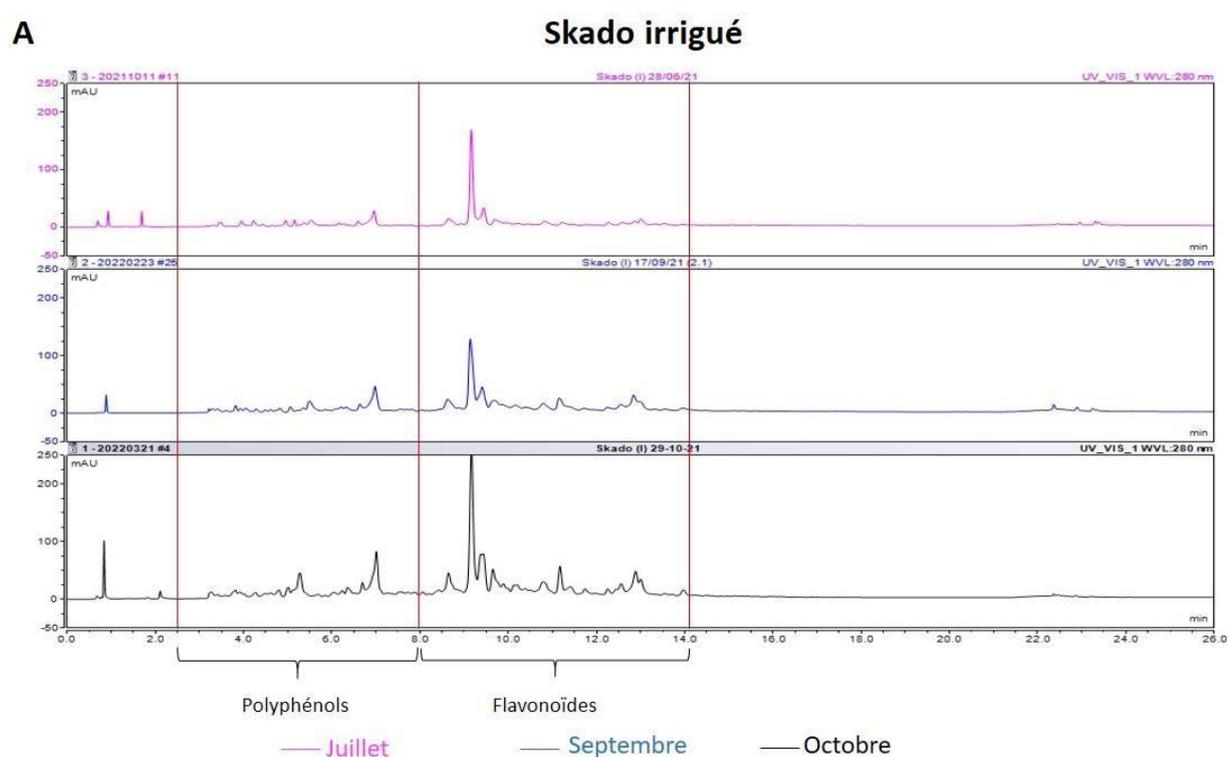


Figure 41. *Profils chromatographiques obtenus par UHPLC-MS du phytoextrait de Skado irrigué.*

Comparaison des profils chimiques des trois récoltes (juillet, septembre et octobre) du phytoextrait du génotype Skado irrigué. Une seule méthode d'extraction dans l'éthanol à 70 % a été utilisée. L'analyse a été réalisée à l'ICOA en utilisant un système UHPLC-MS et un détecteur de type UV_{280 nm}. L'axe des abscisses représente le temps de rétention (min) et l'axe des ordonnées indique l'intensité du signal en milli unité d'absorbance (mAU).

En comparant les profils en condition irriguée par rapport à non irriguée, il est apparu que les profils chimiques étaient similaires (**Fig. 42A et B**). Cette observation suggère que les conditions hydriques n'ont pas influencé la composition chimique des feuilles avec les méthodes d'extraction utilisées, mais les conditions météorologiques lors de cette période de récolte sont à prendre en compte pour l'interprétation de ces observations.

Par ailleurs, des variations chimiques distinctes ont été identifiées entre les différents génotypes. Notamment, Skado se démarque par son profil chimique différent, tandis que les génotypes Koster, Pourtet et Dellinois présentent des profils chimiques comparables, indépendamment des conditions d'irrigation auxquelles ils ont été soumis (**Fig. 42A et B**).

En conclusion, à la lumière de nos observations, nous avons décidé de ne pas poursuivre l'exploration de la parcelle du site de St-Cyr-en-Val, du fait de sa difficulté d'accès (parcelle non entretenue en fin d'expérimentation) pour la suite de nos recherches. Concernant le site d'Ardon, il ressort que le génotype Skado se distingue des trois autres génotypes.

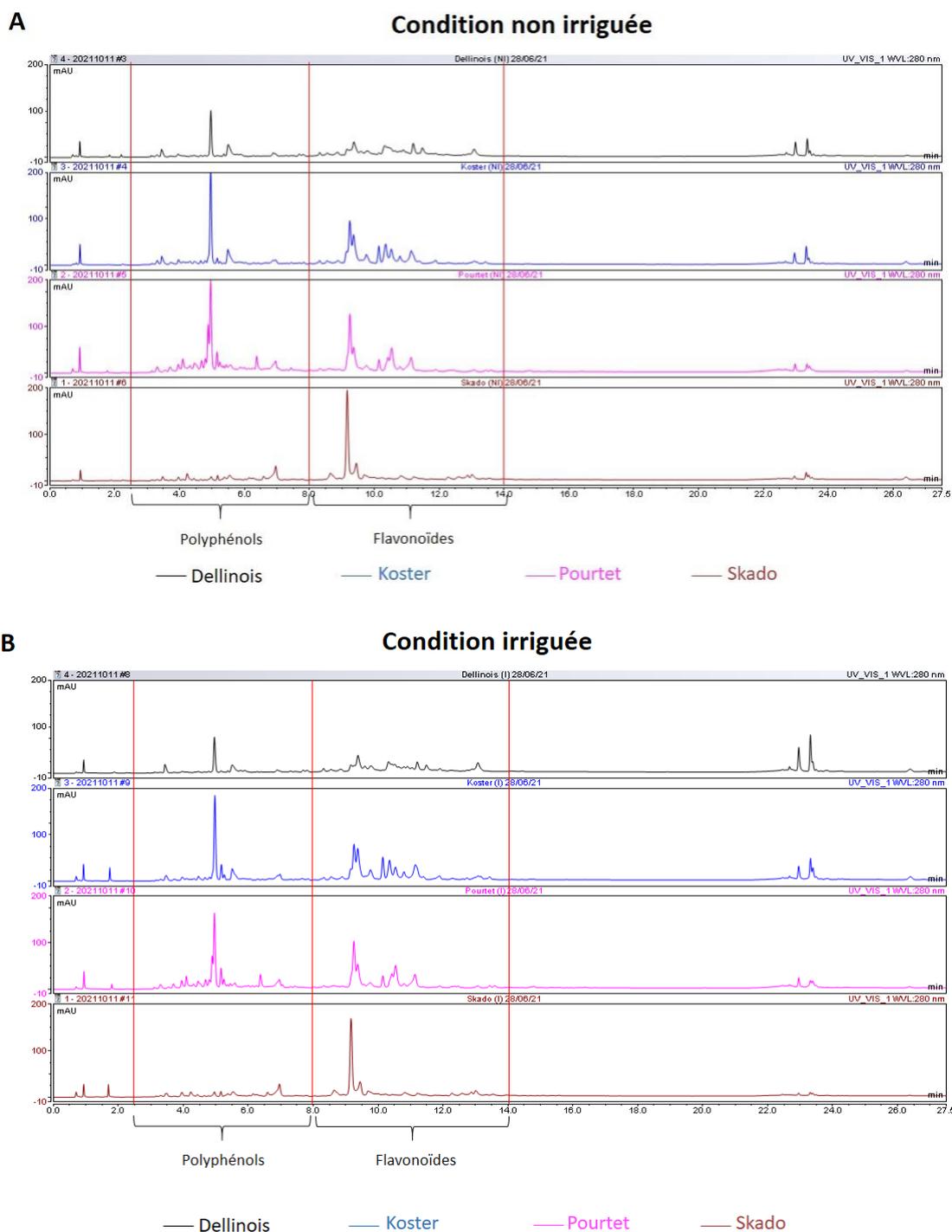


Figure 42. *Profils chromatographiques obtenus par UHPLC-MS des phytoextraits foliaires des quatre géotypes de peuplier.*

Comparaison des profils chimiques des phytoextraits de quatre géotypes (Dellinois, Koster, Pourtet et Skado) du site d'Ardon issus de la première récolte (Juillet) en condition non irriguée (A) et irriguée (B). L'analyse a été réalisée à l'ICOA en utilisant un système UHPLC-MS en utilisant le détecteur UV_{280 nm}. L'axe des abscisses représente le temps de rétention (min) et l'axe des ordonnées indique l'intensité du signal en milli unité d'absorbance (mAU).

(3) Tests de fluorescence

Des tests de criblage dans le système rapporteur ont été réalisés en présence de 0,9 M NaCl sur les quatre géotypes du site d'Ardon : Dellinois, Koster, Pourtet et Skado, issus des trois récoltes (Juillet, Septembre et Octobre) et dans les deux conditions d'irrigation avec un seul solvant (éthanol 70 %), ainsi que les cinq géotypes du site de St-Cyr-en-Val : I-214, Monviso, Dorskamp, Pourtet et Flevo avec les deux solvants (éthanol 70 % et acétate d'éthyle 100 %). Ces 34 phytoextraits ont été évalués pour leur capacité à modifier l'activité des récepteurs HK1a et HK1b dans le système rapporteur.

Pour les phytoextraits des géotypes provenant du site de St-Cyr-en-Val, les résultats n'ont pas révélé de variations significatives pour l'ensemble des cinq géotypes, indépendamment du solvant utilisé (résultats non montrés). En revanche, pour les géotypes du site d'Ardon, les résultats ont montré que l'extrait Skado de la première récolte provoque une augmentation notable de la fluorescence par rapport au témoin (T) lorsqu'il est testé avec les récepteurs HK1a et HK1b (**Fig. 43A et C**), en présence de 0,9 M NaCl. Cette augmentation a été constatée aussi bien pour Skado irrigué concernant l'osmosenseur HK1a, que pour les conditions irriguées et non irriguées concernant HK1b. Un autre géotype, Koster de la récolte de septembre en condition irriguée, a également montré une hausse significative de la fluorescence par rapport au témoin pour les deux récepteurs HK1a et HK1b (**Fig. 43B et D**). Néanmoins, aucun résultat significatif n'a été observé pour la troisième récolte (Octobre, résultat non montré).

Ces augmentations de la fluorescence en présence des phytoextraits issus des géotypes Skado irrigué (récolte juillet) et de Koster irrigué (récolte septembre) montrent que ces phytoextraits sont capables de stimuler la réponse de la levure face au stress et constituent ainsi les deux extraits retenus par ce criblage. Il semble donc que ces extraits contiennent des molécules capables d'agir sur l'osmosensing *via* une interaction, directe ou indirecte, avec le MSP HK1. Ces deux extraits représentent des candidats prometteurs à analyser plus avant pour identifier les potentiels ligands de nos récepteurs. De plus, ils constituent les deux extraits candidats pour les tests sur plantes dans le cadre d'une application en tant que biostimulant.

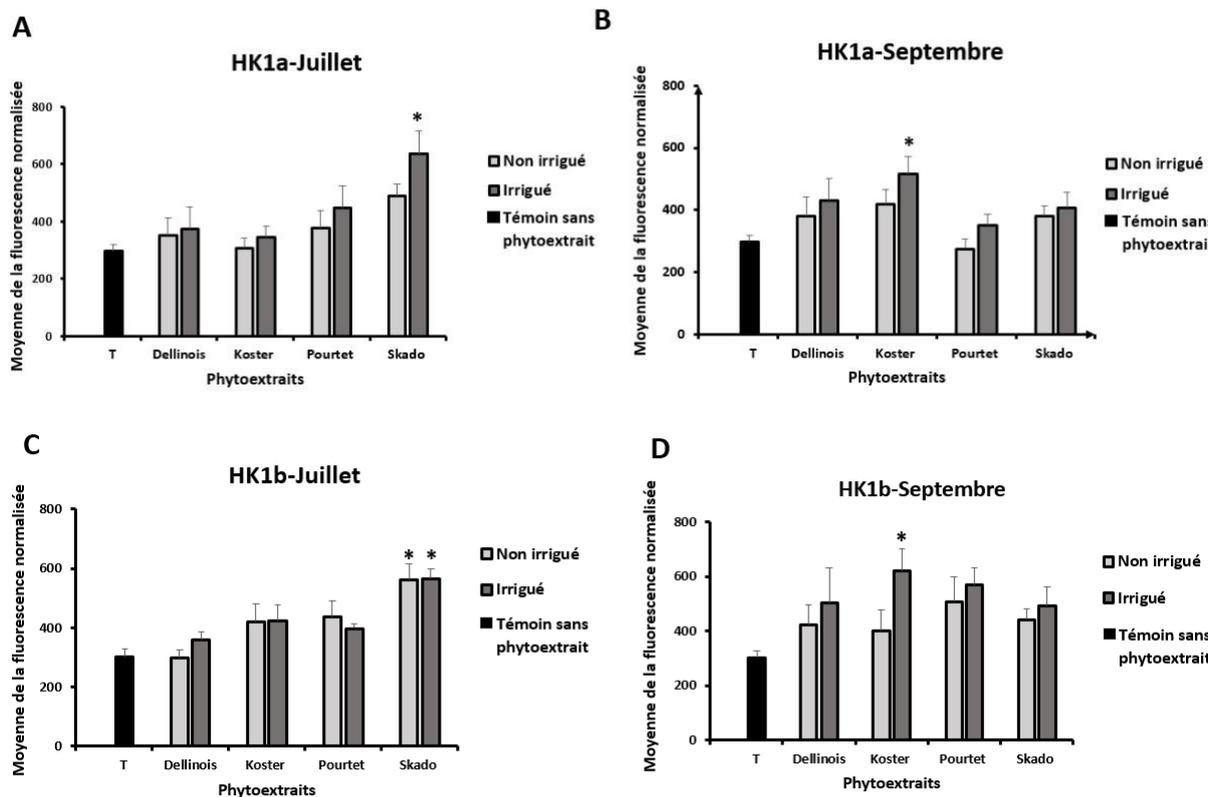


Figure 43. Effets des extraits foliaires de peuplier sur l'activité de HK1a et HK1b.

Les phytoextraits de la première et la deuxième récolte respectivement pour HK1a (A et B) ainsi que pour HK1b (C et D), ont été testés pour leur capacité à moduler l'activité des récepteurs HK1 chez le peuplier en présence d'un stress salin de 0,9 M NaCl. Le contrôle (T) désigne l'intensité de la fluorescence en présence de 0,9 M NaCl sans ajout de phytoextraits. Les valeurs de fluorescence ont été ajustées par rapport à la DO_{600} et sont présentées en unités arbitraires (UA). L'erreur standard est calculée à partir de trois essais indépendants. Les écarts significatifs, déterminés par un test 2way-Anova, sont signalés par * pour une valeur $p < 0.05$.

2) Effet biologique des phytoextraits identifiés

(1) Tests préliminaires

Dans le cadre de notre exploration d'un éventuel effet biostimulant des phytoextraits sur plante, nous avons procédé à une deuxième récolte de feuilles pour la production des phytoextraits sélectionnés à une plus grande échelle lors de la deuxième année. Les analyses effectuées par UHPLC-MS sur cette seconde récolte, ainsi que les tests dans le système rapporteur, ont confirmé les résultats obtenus avec ceux de la première année (données non montrées). Nous avons choisi d'étudier en premier lieu leur impact sur une seule espèce végétale, les pensées, à titre d'essai préliminaire. L'objectif principal de ces essais est de déterminer si ces plantes à fleurs réagissent aux traitements des phytoextraits Skado et

Koster, notamment en ce qui concerne un éventuel effet phytotoxique, et si ces extraits peuvent améliorer leur développement face au stress hydrique. L'ensemble de ces essais a été mené par les techniciens de la station expérimentale du CDHR et j'en présente ici les principaux résultats.

Ces phytoextraits ont été testés selon huit modalités (**Tab. 12**). Les modalités 0 et 1 servent de points de référence pour s'assurer que le stress est bien perçu par les plantes. Les modalités 2 et 5 offrent un regard sur l'éventuel effet de phytotoxicité des plantes face à l'extrait dans un environnement non stressant, tandis que les modalités 3, 4 ainsi que 6 et 7 permettent d'appréhender les effets des phytoextraits à deux concentrations différentes dans un contexte de stress.

Tableau 12. *Les différentes modalités testées dans l'essai.*

0	Témoin non traité et non stressé
1	Témoin non traité et stressé
2	Plants traités avec Skado à 0,2 % et non stressés
3	Plants traités avec Skado à 0,2 % et stressés
4	Plants traités avec Skado à 0,1 % à et stressés
5	Plants traités avec Koster à 0,2 % et non stressés
6	Plants traités avec Koster à 0,2 % et stressés
7	Plants traités avec Koster à 0,1 % et stressés

Tests sur les pensées :

Cette expérience a testé les effets des deux phytoextraits sélectionnés (Skado et Koster) sur le développement et la mortalité des pensées, une espèce bisannuelle, avec deux facteurs variables : la dose du phytoextrait (deux concentrations de 0,1% et 0,2%) et le stress hydrique en diminuant l'apport en eau de 50%. Les phytoextraits ont été appliqués sur les feuilles juste après l'application du stress et de façon répétée toutes les deux semaines soient trois traitements au total.

Les tests ont été effectués sur 240 plants de pensées, et les impacts des phytoextraits ont été étudiés sous des conditions sans stress hydrique (80-90% d'humidité du substrat) et en condition de stress hydrique (60-70% d'humidité du substrat). Pour l'ensemble des mesures de croissance effectuées (hauteur des plants, diamètre des tiges, niveau d'enracinement et floribondité), aucune différence entre le témoin sans stress et le témoin stressé n'a été observée (non montré). Il apparaît donc que le stress n'a pas impacté la croissance des plantes.

Cependant, lors de l'évaluation finale, le taux de mortalité a été déterminé et a permis de voir un impact des traitements (**Fig. 44**). Ainsi, les résultats ont montré que le traitement avec Skado ou Koster ont entraîné une diminution du taux de mortalité en condition de stress de trois (6,7% modalités 4 et 6) à cinq fois (3,3% modalités 3 et 7) comparativement au témoin non traité qui affichait un taux de 16,7 % (modalité 1). Il semble même y avoir un effet bénéfique des extraits en absence de stress puisque le taux de mortalité chute entre 0 et 3,3% pour les deux modalités témoin stressé sans traitement (modalités 2 et 5). Ces résultats indiquent donc un effet bénéfique des extraits en faveur de la survie des plantes en conditions de stress hydrique.

En parallèle, une analyse a été réalisée pour évaluer la phytotoxicité suivant une grille de notation de phytotoxicité qui se base sur le type d'organe touché, les symptômes observés et leur intensité. Les données ont révélé l'absence d'une quelconque phytotoxicité pour les deux extraits.

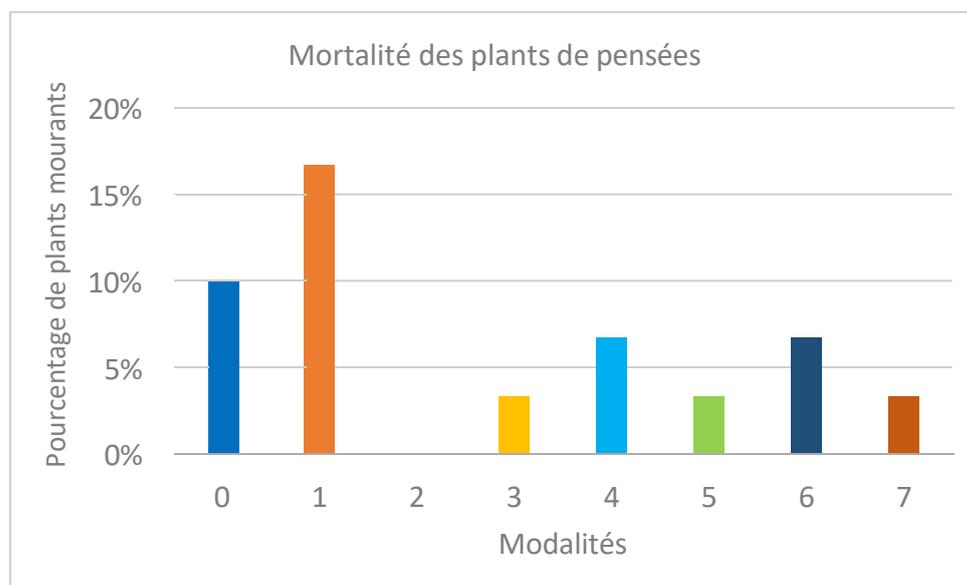


Figure 44. *Impact des phytoextraits Skado et Koster sur le taux de mortalité des pensées en absence et en présence de stress hydrique.*

*L'étude a examiné les effets des deux phytoextraits, Skado et Koster, appliqués à des concentrations de 0,2% et 0,1%, en absence et en présence de stress hydrique. Les différentes modalités sont numérotées de 0 à 7 (voir **Tab. 12**). Ces résultats sont basés sur deux répétitions de 15 individus chacun (dans chaque modalité).*

(2) Tests sur la gamme de plantes horticoles

Fort de ces résultats prometteurs obtenus lors des tests préliminaires, nous avons décidé d'étendre nos tests à l'ensemble de la gamme des plantes horticoles : les fleuries (rose d'Inde et *Nemesia*), les fruitiers (framboisier) et les potagers (tomate). Ces espèces ont été choisies en raison de leur représentativité des espèces horticoles, mais aussi pour leur variabilité et sensibilité de réponses à la sécheresse.

Tests sur la rose d'Inde :

La rose d'Inde a été utilisée dans le but de corroborer les observations préalablement réalisées sur les pensées car ces deux espèces pourraient présenter des réponses analogues face au stress hydrique. Ces tests ont été réalisés sur 240 plants, et les impacts des phytoextraits ont été étudiés en condition sans et avec stress hydrique. Aucune phytotoxicité n'a été observée suite aux traitements avec les phytoextraits, cependant, une infestation d'acariens est arrivée sur les plants, à mi-parcours de l'essai, qui n'a pas pu être éliminée. La quasi-totalité de l'essai a été perdu rendant son exploitation impossible. Néanmoins, une mesure intermédiaire (avant l'infestation) a révélé une tendance, bien que non significative, à l'amélioration de la floribondité en condition de stress hydrique pour les plants traités par rapport aux plants non traités, et ce pour les deux extraits aux deux dilutions (résultat non montré).

Tests sur *Nemesia* :

La plante *Nemesia* a été sélectionnée pour apprécier l'effet des extraits sur une plante fleurie présentant une réponse différente de celle des pensées face au stress hydrique. Un total de 240 plants a été soumis à ces tests. Les plants soumis au stress hydrique affichaient une diminution d'humidité de substrat, qui était globalement de l'ordre de 15 % par rapport à ceux cultivés dans des conditions normales.

Il est à noter qu'aucun signe de phytotoxicité n'a été détecté suite aux traitements. De surcroît, les contrôles sans traitement avec et sans stress (modalité 0 et 1) ont pu montrer une différence significative en fin de période de test (semaine 25, **Fig. 45**), confirmant la bonne perception du stress par les plantes. De plus, parmi l'ensemble des paramètres de croissance analysés, l'évaluation des impacts des phytoextraits sur la croissance en hauteur des plants a révélé une amélioration significative avec l'extrait Koster à la concentration de 0,1 % (modalité

7) par rapport au témoin non traité (modalité 1) au bout de sept semaines de culture et trois applications (**Fig. 45**, bloc de droite). Ce résultat indique que cette concentration de phytoextraits peut aider les plants à maintenir leur croissance en hauteur malgré les conditions de stress hydrique, les rendant ainsi comparables aux plants en conditions hydriques optimales.

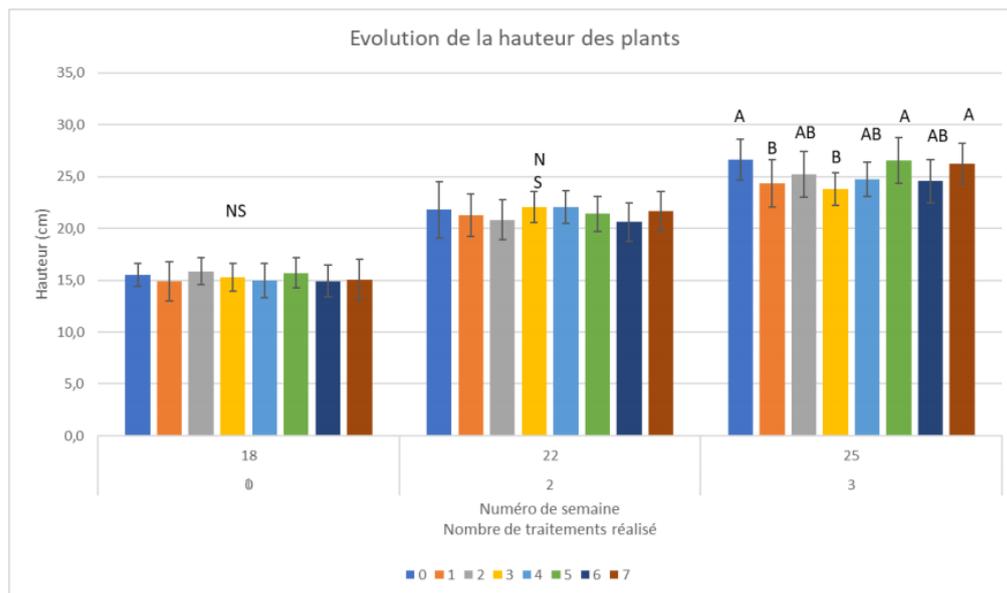


Figure 45. Effets des phytoextraits Skado et Koster sur la hauteur chez *Nemesia* face au stress hydrique.

Les phytoextraits Skado et Koster ont été testés aux concentrations de 0,1% et 0,2%, sur des plants de *Nemesia* soumis ou non au stress hydrique. L'évolution de la hauteur des plants a été examinée pendant les 7 semaines de traitements (semaines 18 à 25). Les données présentées reposent sur trois répétitions de l'expérience. Pour l'analyse statistique, un test ANOVA a été employé.

Tests sur framboisier :

Le framboisier a été choisi pour représenter la gamme des fruitiers, étant particulièrement sensible à la disponibilité en eau du sol. Les expérimentations, menées sur 240 plants, ont permis d'évaluer les effets des phytoextraits dans des conditions sans et avec stress hydrique.

Aucun symptôme de phytotoxicité n'a été observé sur les plants suite aux traitements. Plusieurs paramètres ont été mesurés pour évaluer la qualité des plants traités avec les deux extraits, mais aucun effet bénéfique significatif des traitements n'a été mis en évidence sur

les différentes mesures effectuées. Cependant, il est important de noter que le niveau de stress hydrique appliqué a été particulièrement faible lors des tests. En effet, la différence d'humidité de substrat entre la condition en absence et en présence de stress hydrique était globalement de 5% tout le long de la période avec quelques rares passages à 10-15% (**Fig. 46**). Avec une différence si minime, les contrôles sans traitement avec et sans stress (modalité 0 et 1) n'ont pas montré de différence significative pour les différents paramètres mesurés (données non montrées). Il semble donc que le stress ait été trop faible pour avoir un impact sur les plants testés et permettre d'évaluer l'effet de nos deux extraits.

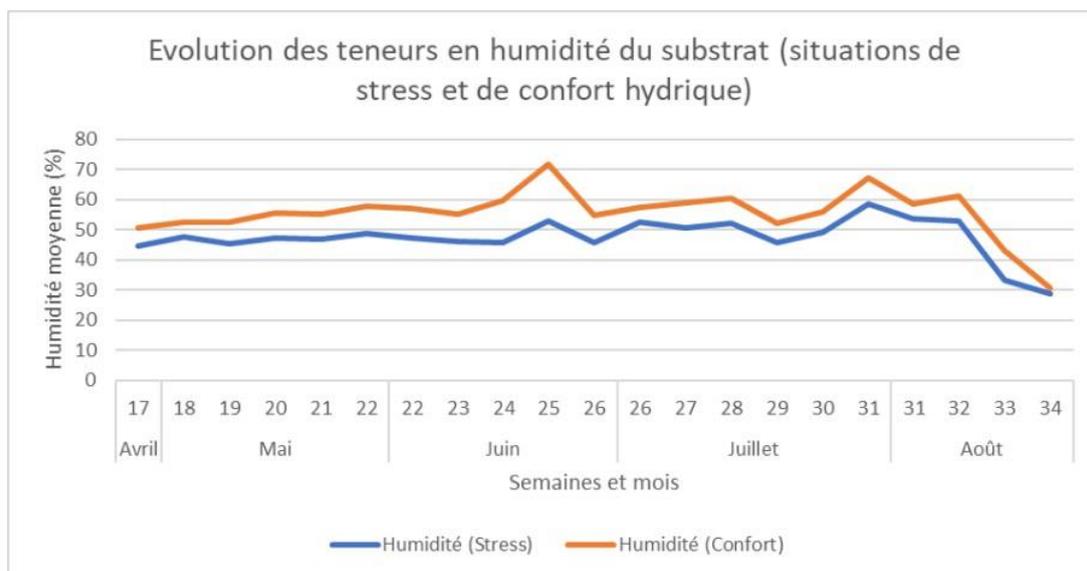


Figure 46. *Suivi d'humidité du substrat en absence et en présence du stress hydrique.*

Pour assurer le suivi et la vérification de l'instauration du stress hydrique, des sondes spécifiques mesurant l'humidité ont été placées directement dans le substrat. Ces dispositifs ont permis d'enregistrer, de manière continue, les niveaux d'humidité chaque semaine, depuis la 17^{ème} jusqu'à la 34^{ème} semaine.

Tests sur tomates :

La tomate a été choisie pour représenter la gamme des plantes potagères, étant également sensible à la sécheresse. Au total, les tests ont porté sur 240 plants de tomates et les mesures d'humidité du substrat ont montré une moyenne de 10 % sur l'ensemble de la période de croissance. Il est ressorti que le stress hydrique était présent mais d'intensité faible lors de l'expérimentation.

Aucune manifestation de phytotoxicité n'a été enregistrée tout au long de la culture des tomates. Par ailleurs, la différence significative entre les témoins avec et sans stress en l'absence de tout traitement (modalité 0 et 1), atteste que le stress a bien été perçu par les plantes. Parmi les différentes mesures réalisées, il ressort que la hauteur des plants a montré que, suite à l'application d'un traitement, une différence significative est apparue pour le phytoextrait Skado à 0,2 % (modalité 3) (**Fig. 47A**). De même, le nombre d'étages foliaires a révélé une amélioration significative pour l'extrait Koster à 0,2 % (modalité 6) (**Fig. 47B**). Les deux extraits semblent donc permettre une meilleure croissance des plants de tomate en conditions de stress.

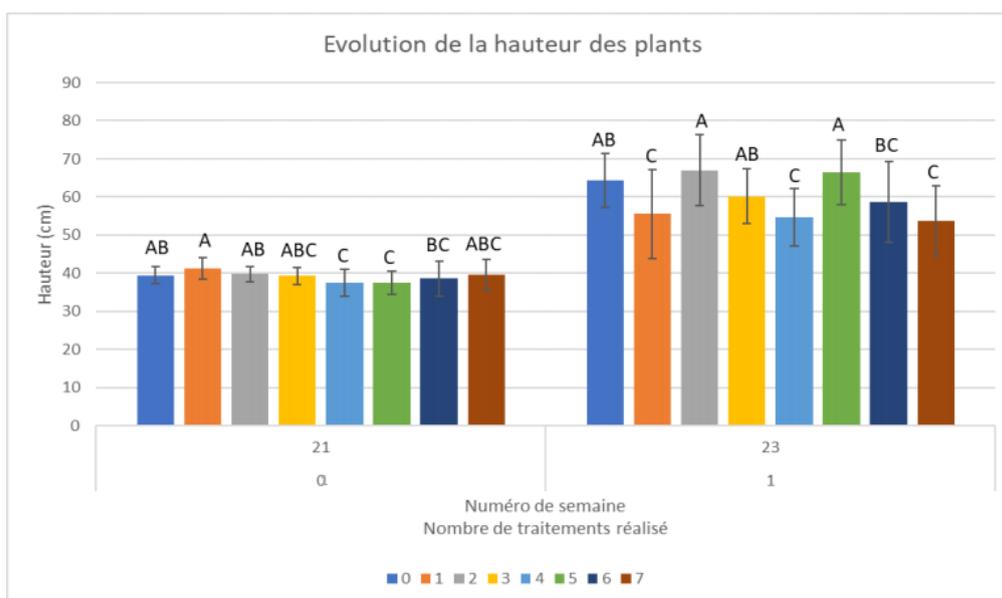
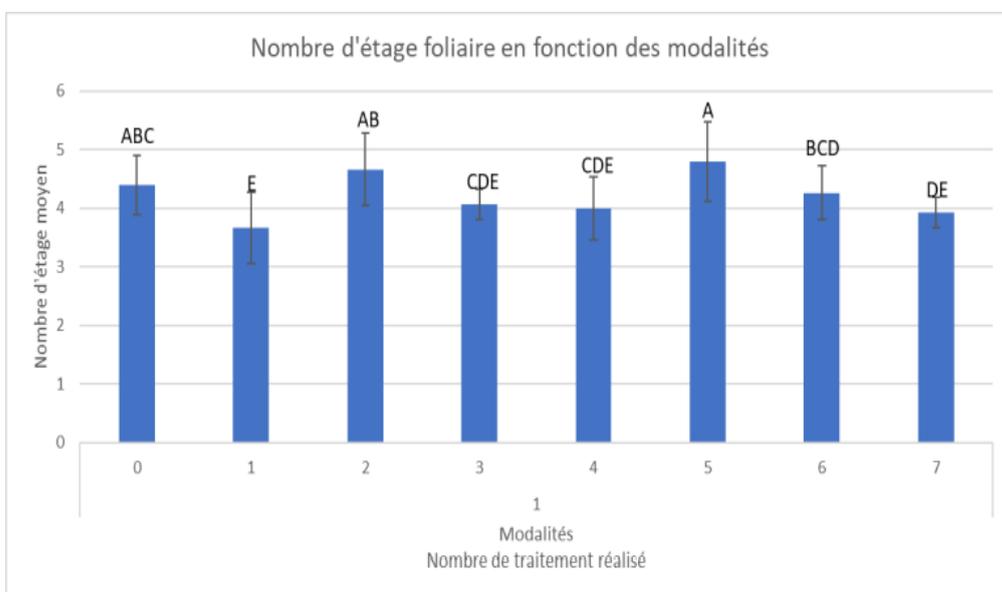
A**B**

Figure 47. Effets des phytoextraits sur la hauteur et le nombre d'étages foliaires des tomates.

Les effets des traitements avec Skado et Koster, à des concentrations de 0,1% et 0,2%, sur deux aspects clés : la hauteur (A) et le nombre d'étages foliaires (B) des plants, en présence ou absence de stress hydrique. Les modalités mises en œuvre sont identifiées par des numéros de 0 à 7 (voir Tab. 12). Un traitement a été effectué durant la semaine 21. Le nombre d'étages foliaires a été analysé pendant la semaine 21. Ces observations découlent de trois blocs répétés de l'expérimentation. Pour l'analyse statistique, un test ANOVA a été employé.

3) Identification des composés actifs par HRMS

Par la suite, nous avons souhaité caractériser plus avant les deux extraits sélectionnés. Pour cela, une HRMS a été employée afin de déterminer la composition chimique des phytoextraits

Skado et Koster et identifier ainsi les molécules qui pourraient être à l'origine des effets observés. Les résultats ont montré des différences quantitatives et qualitatives entre les deux phytoextraits (**Fig. 48A et B**). En effet, 12 pics majeurs ont pu être identifiés pour Skado et 17 pour Koster avec des différences d'intensité. Parmi ces différents pics, seulement une petite fraction a pu aboutir à l'identification d'un composé (**Tab. 13**). Les molécules identifiées sont majoritairement spécifiques à chaque génotype et seulement deux d'entre elles sont communes aux deux génotypes : l'Isoquercétine et la Nigracin/Salireposide. Cependant, le nombre de molécules identifiées est trop restreint par rapport au nombre total de pics pour définir précisément si certaines molécules sont spécifiques. Cette première analyse permet néanmoins de commencer à caractériser la composition de nos extraits.

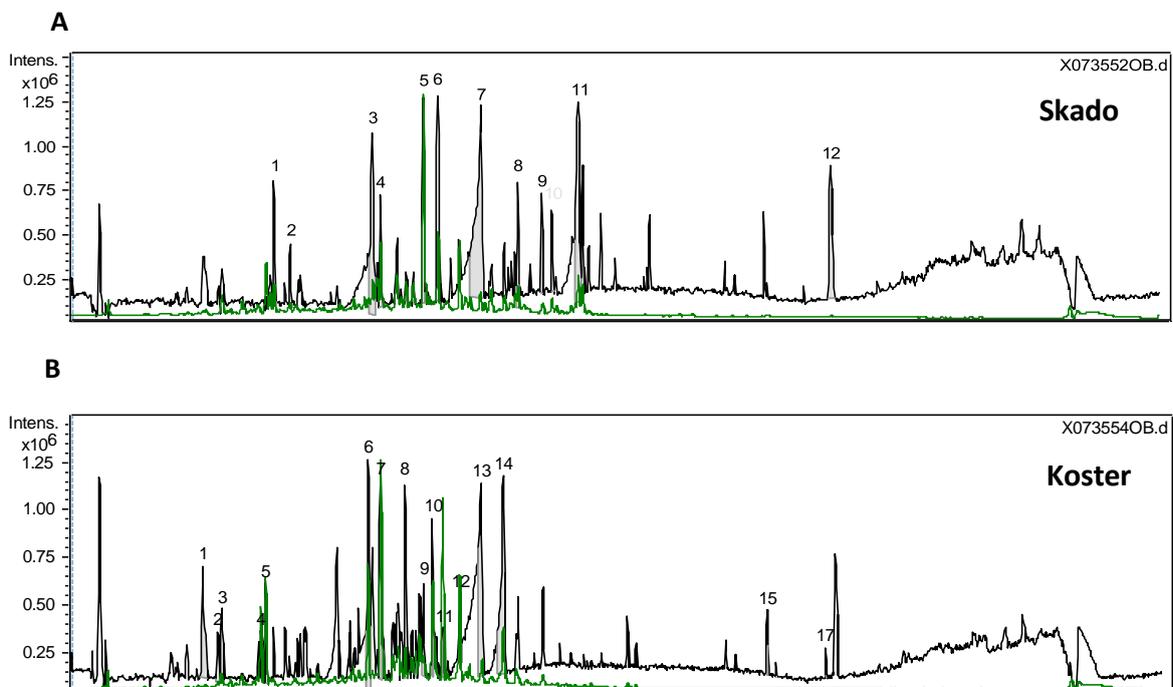


Figure 48. Identification des composés présents dans les phytoextraits Skado et Koster par HRMS.

A) Chromatogramme de l'extrait Skado. **B)** Chromatogramme de l'extrait Koster. Vert : chromatogramme des composés qui absorbent à 280 nm, Noir : chromatogramme qui révèle les ions négativement chargés.

Tableau 13. Analyse des pics majeurs et suggestions de composés identifiés à partir de la littérature.

Extrait	Pic	Temps de rétention (min)	Formule brute	Composés
Skado	3	7,67	C ₂₀ H ₂₄ O ₁₀	Salicortin
	4	7,88	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	Isoquercetin
	5	8,95	C ₂₀ H ₂₂ O ₉	Nigracin/Salireposide
	6	9,32	C ₂₀ H ₂₂ O ₉	Nigracin/Salireposide
	9	11,94	C ₂₀ H ₂₄ O ₁₀	Salicortin
	11	12,86	C ₂₇ H ₂₈ O ₁₁	Tremulacin
Koster	3	3,88	C ₁₃ H ₁₈ O ₇	Salicin
	5	4,99	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	Chlorogenic acid
	7	7,87	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	Isoquercetin
	9	8,95	C ₂₀ H ₂₂ O ₉	Nigracin/Salireposide
	17	19,09	C ₃₀ H ₄₈ O ₈	Pladienolide B/Ajugacetalsterone

b. Tests d'exsudats racinaires de peuplier

Au sein de notre équipe de recherche, des projets cherchant à comprendre la régulation mise en place lors d'un stress osmotique au niveau des racines de peuplier (Projet CosmétoPop) ont amenés à la production d'exsudats et d'extraits racinaires de peuplier. Les racines étant l'organe premier de perception de la contrainte sécheresse et les récepteurs HK1 étant plus exprimés dans les racines, nous avons trouvé pertinent de tester ces extraits dans notre système rapporteur. Nous avons ainsi pu utiliser deux types d'exsudats racinaires de *Populus nigra* : ceux issus de cultures en aéroponie et ceux provenant de cultures en hydroponie. En complément, nous avons également eu l'opportunité d'évaluer un extrait racinaire issu de hairy-root d'une lignée de peuplier hybride (717-1B4) transformée par *Rhizobium rhizogenes*.

1) Aéroponie

Les exsudats racinaires obtenus à partir de cultures en aéroponie ont été préparés en les solubilisant dans 50% d'éthanol à une concentration de 10 mg/mL. Nous avons évalué quatre fractions d'exsudats, trois d'un même lot (A3-1, A3-4 et A3-5) et une issue d'un lot différent (A4-3).

Les tests ont été effectués en présence de 0,9 M NaCl. Les résultats indiquent une légère tendance générale à la baisse de la fluorescence pour les récepteurs HK1a et HK1b lors de l'utilisation de la plupart des exsudats mais globalement non significative. Seul l'exsudat A3-1 a entraîné une réduction significative de la fluorescence pour HK1a, mais cet effet spécifique n'a pas été retrouvé chez les autres exsudats issus du même lot, à savoir A3-4 et A3-5 (Fig. 49B et C). Cette disparité, au sein même d'un lot, nous incite donc à la prudence dans l'interprétation de cette différence significative. Ainsi, globalement ces tests n'ont pas permis de mettre en évidence un effet significatif des exsudats sur les récepteurs étudiés.

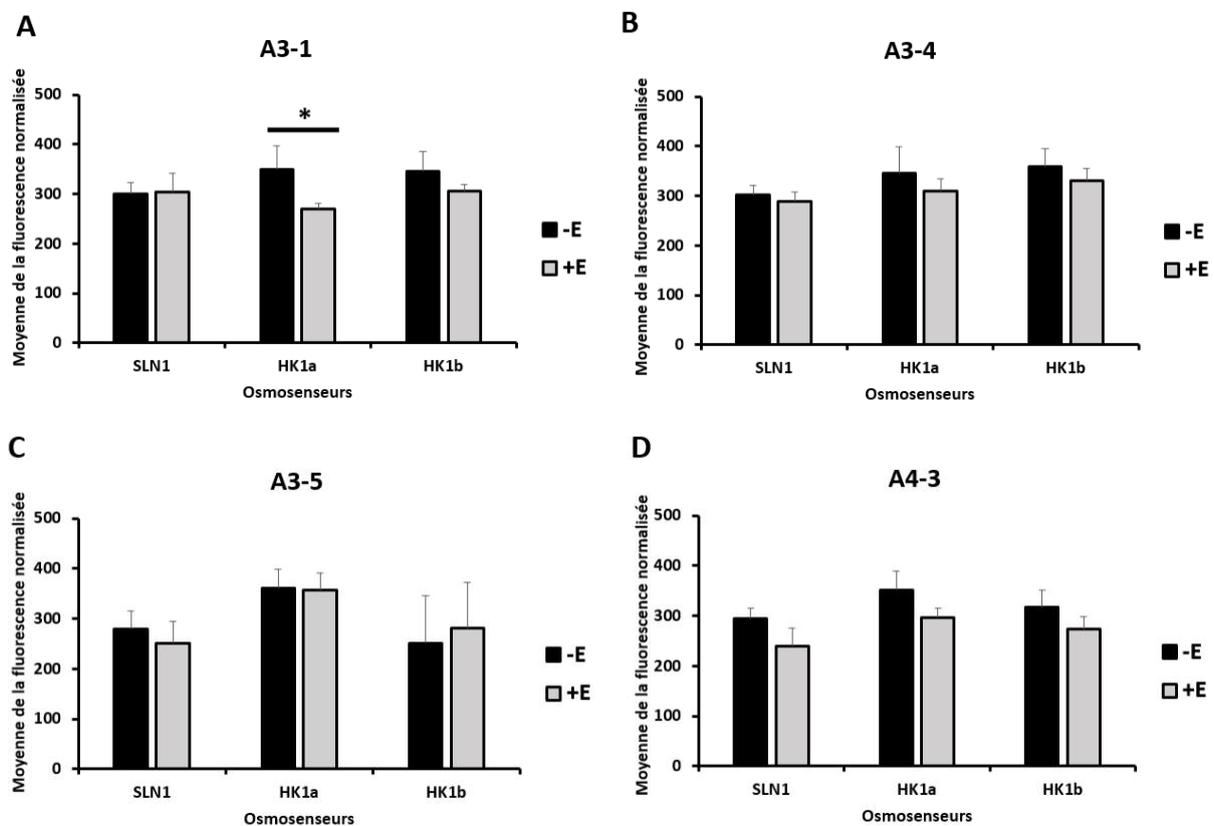


Figure 49. Effets des exsudats racinaires de peuplier issus de cultures en aéroponie sur les récepteurs *SLN1*, *HK1a* et *HK1b*.

Les exsudats racinaires issus de cultures en aéroponie : A3-1 (A), A3-4 (B), A3-5 (C) et A4-3 (D) sont testés sur *SLN1*, *HK1a* et *HK1b* en présence de 0,9 M de NaCl. E désigne exsudat. Les mesures de la fluorescence normalisées par rapport à la DO_{600} sont exprimées en unités arbitraires (UA). Les erreurs types proviennent de six tests distincts. Les différences statistiquement significatives sont marquées avec * pour $p < 0.05$, en utilisant un test 2way-Anova.

2) Hydroponie

En parallèle, nous avons testé des exsudats racinaires provenant d'une autre méthode de culture : l'hydroponie. Cette autre technique pourrait offrir des profils d'exsudats différents, potentiellement porteurs de propriétés différentes. En effet, les conditions de culture en hydroponie, où les racines sont immergées dans une solution nutritive, peuvent influencer les échanges entre les racines et leur environnement, comparativement à l'aéroponie où les racines sont en contact avec un brouillard nutritif. Ainsi, nous avons testé trois fractions d'exsudats hydroponiques issus de trois lots différents (H10, H11-4 et H12).

À l'instar de ce qui a été fait avec les exsudats issus de l'aéroponie, les exsudats ont été repris dans un milieu contenant 50% d'éthanol à une concentration de 10 mg/mL. En conditions de stress à 0,9 M NaCl, l'évaluation des exsudats racinaires issus de cultures en hydroponie n'a pas révélé d'effets sur les récepteurs étudiés car les très légers changements induits par ces exsudats n'ont pas présenté de significativité statistique (**Fig. 50**).

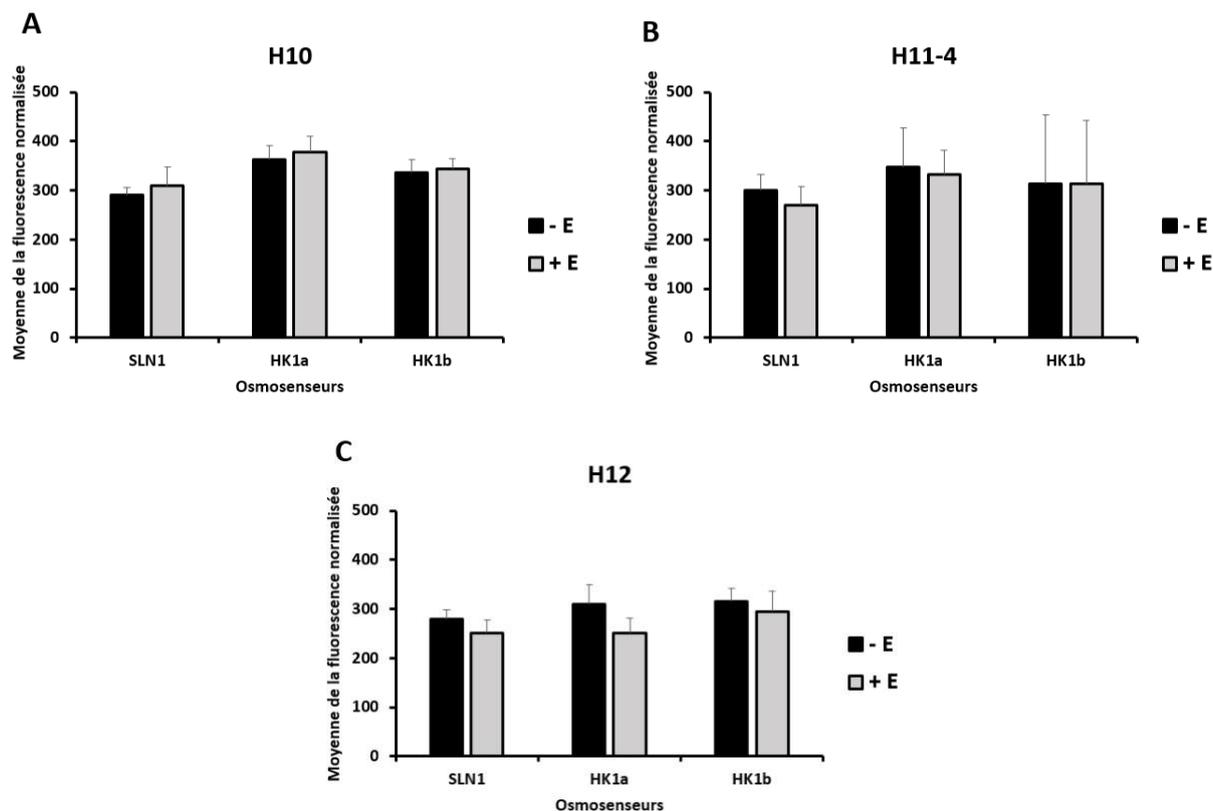


Figure 50. *Effets des exsudats racinaires de peuplier issus de cultures en hydroponie sur les récepteurs SLN1, HK1a et HK1b.*

Les exsudats racinaires issus de cultures en hydroponie : H10 (A), H11-4 (B) et H12 (C) sont testés sur SLN1, HK1a et HK1b en présence de 0,9 M de NaCl. E désigne exsudat. Les mesures de la fluorescence normalisées par rapport à la DO_{600} sont exprimées en unités arbitraires (UA). Les erreurs types proviennent de trois tests distincts.

c. Tests d'extraits racinaires de peuplier

Nous avons donc testé aussi cette autre source d'extrait provenant de "hairy-root". Lors de la préparation de l'extrait, deux solvants ont été utilisés : l'éthanol 70% (EtOH) et l'acétate d'éthyle 100% (ACOEt). Dans nos expérimentations, les tests ont été effectués en présence de 0,9 M de NaCl. Les résultats ont montré une légère réduction de la fluorescence suite à l'ajout de l'extrait, indépendamment du solvant utilisé, mais de manière non significative (Fig. 51).

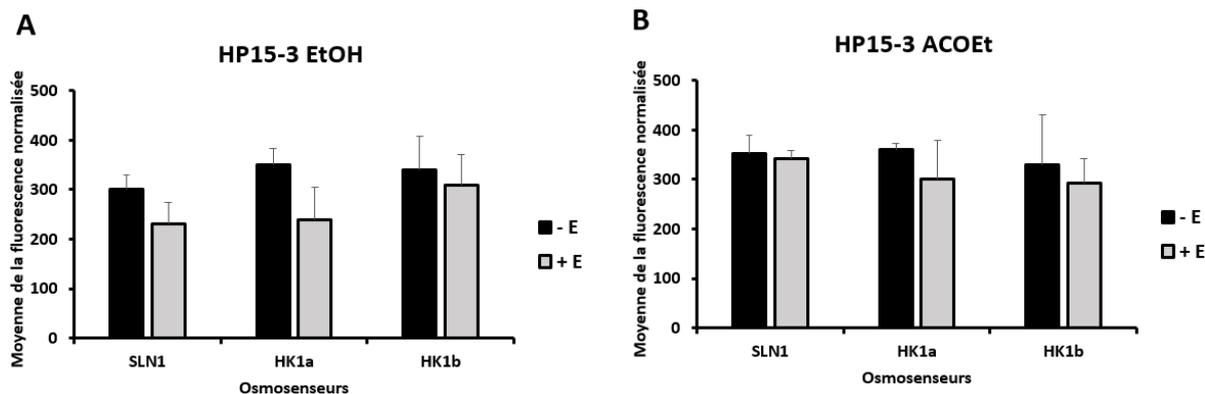


Figure 51. Effets d'un extrait racinaire issu d'une lignée de hairy-root à partir de peuplier hybride sur les récepteurs SLN1, HK1a et HK1b.

L'exsudat racinaire issu de HP15-3 et solubilisé dans l'EtOH à 70 % (A) ou dans l'AcOEt (B) a été testé sur SLN1, HK1a et HK1b en présence de 0,9 M de NaCl. E désigne extrait racinaire. Les mesures de la fluorescence normalisées par rapport à la DO_{600} sont exprimées en unités arbitraires (UA). Les erreurs types proviennent de trois tests distincts.

C. Discussion et perspectives

L'objectif central de ce chapitre était de rechercher des ligands capables de se fixer sur nos récepteurs HK1. Ces investigations s'inscrivent dans la continuité du chapitre précédent où nous avons élaboré un système rapporteur fluorescent d'osmosensing. Cette construction nous a permis de procéder au criblage de molécules candidates pré-sélectionnées, en l'occurrence, les 20 acides aminés, ainsi que des extraits foliaires et racinaires de peuplier.

Notre premier intérêt a été d'évaluer la capacité des 20 acides aminés à interagir avec les récepteurs HK1. Les données expérimentales ont montré que seul le tryptophane a permis une diminution significative de la fluorescence pour les deux récepteurs HK1a et HK1b, laissant suggérer une interaction possible.

Des études antérieures, impliquant des récepteurs avec un domaine CACHE de type dcache1, tels que nos récepteurs HK1, ont montré une interaction avec le tryptophane. Par exemple, des travaux sur la bactérie *Bacillus subtilis* ont dévoilé que le récepteur transmembranaire McpC peut potentiellement fixer le tryptophane, que ce soit de manière directe ou indirecte via la lipoprotéine YckB liée à des transporteurs d'acides aminés (Glekas et al., 2012). Dans un contexte différent, une recherche sur la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* a mis en évidence

le rôle prédominant de PctA, un transducteur chimiotactique, dans la détection des 18 L-amino-acides dont le tryptophane (Taguchi et al., 1997). Par ailleurs, l'utilisation d'un test basé sur le décalage thermique à haut débit dans la bactérie *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* a permis de détecter des molécules reconnues par le chémorécepteur PscB, un homologue de PctB de *P. aeruginosa*. Parmi ces molécules, le tryptophane a été détecté (McKellar et al., 2015). En revanche, le lien entre la fixation du tryptophane et l'osmosensing n'a pas été fait dans ces différentes études. Par ailleurs, en matière d'acides aminés ayant des effets biostimulants, plusieurs sont mis en avant, comme la glycine, reconnue pour son potentiel anti-stress, ou encore la proline qui est reconnue pour sa capacité à neutraliser les radicaux libres sous stress et à réduire le stress environnemental (Chen, 2011 ; du Jardin, 2015 ; Yakhin et al., 2017). Toutefois, le tryptophane ne figure pas parmi ces acides aminés.

De plus, il est possible que la diminution de fluorescence observée pour cet acide aminé soit un artefact. En effet, le tryptophane correspond précisément au marqueur de sélection (TRP1) du vecteur portant le gène rapporteur GFPuv (pGBK), absent du milieu sélectif (-UW). Il est donc possible que ce vecteur se perde au cours des divisions sans la pression de sélection du fait de l'ajout de tryptophane. La diminution de fluorescence observée pourrait donc être la conséquence de la raréfaction du vecteur rapporteur. Ainsi, une validation de ces résultats, possiblement par des tests *in vitro*, sera nécessaire avant de poursuivre avec cet acide aminé.

Pour compléter ces tests *in vivo*, nous envisageons de mettre en place des tests *in vitro* avec l'ECD des protéines HK1 une fois purifié. Il sera alors possible de réaliser des tests avec l'ECD fixé sur colonne et de passer les molécules candidates pour déterminer une possible fixation, en particulier les petits acides organiques tels que le fumarate ou le succinate. La piste des acides organiques est d'autant plus intéressante que récemment l'effet biostimulant de l'acide β cyclocitrique, un apocaroténoïde, a été démontré sur Arabidopsis et tomate (D'Alessandro et al., 2019). Ces tests offriront la possibilité d'examiner directement les interactions entre ces molécules et l'ECD des HK1 dans des conditions maîtrisées par une analyse en spectrométrie de masse. Pour approfondir ces analyses, nous pourrions recourir à d'autres méthodologies telles que la Calorimétrie Isotherme de Titration (ITC) (Velázquez- Campoy et al., 2004), la spectroscopie RMN (Nguyen et al., 2019) ou la Microscopie à Force Atomique (AFM) (Müller & Dufrêne, 2008) qui fourniraient des données à la fois quantitatives et descriptives sur ces interactions. En parallèle, nous envisageons aussi de tester les acides

organiques avec le système rapporteur pour leur capacité à moduler la réponse au stress osmotique.

Par la suite, nous nous sommes penchés sur l'analyse des phytoextraits foliaires de peuplier afin d'évaluer leur capacité à influencer l'activité des récepteurs HK1a et HK1b. De nos essais, deux phytoextraits, Skado et Koster, se sont démarqués. Le fait que les profils chimiques ne présentent que très peu de différence entre les deux conditions d'irrigation pourraient trouver son explication dans les conditions météorologiques. En effet, les données Météo pour l'été 2021 en Région CVL ont présenté un mois de juillet pluvieux et un mois d'août peu ensoleillé. Les peupliers n'ont donc pas expérimenté de sécheresse cette année-là et la quantité de pluie reçue n'a probablement pas permis de contraster les deux conditions d'irrigation.

Bien que les profils chimiques dans les deux conditions d'irrigation soient similaires, ce sont les extraits en condition irriguée principalement qui ont présenté une augmentation significative de la fluorescence. Cela est peut-être dû au fait que notre système pourrait être sensible à la concentration des extraits testés. En effet, les extraits dans les deux conditions d'irrigation, bien que similaires en termes de composition, n'ont pas exactement les mêmes concentrations de composés. Ce constat a été également fait lors des tests sur les extraits d'algues où l'extrait E17, très concentré, n'a pas donné de résultat significatif alors que l'extrait E16 de même nature mais en concentration moindre a fonctionné. De même, les extraits foliaires issus de la troisième récolte en octobre n'ont pas présenté d'effet significatif alors qu'ils correspondaient aux extraits les plus riches en composés. Comme évoqué précédemment, ces observations semblent donc pointer du doigt une limite de notre système rapporteur possiblement sensible à la concentration des composés. Quoi qu'il en soit, la sélection des deux extraits Skado et Koster est intéressante car elle suggère que ces extraits pourraient intensifier la réponse des plantes au stress, et potentiellement améliorer leur résistance face au stress hydrique. Ce constat est d'autant plus pertinent que des études antérieures ont identifié ces deux génotypes comme étant particulièrement tolérants à la sécheresse parmi différentes variétés de peupliers testées (Bouyer, 2019).

Sur le plan moléculaire, diverses études ont émis l'hypothèse d'une interaction entre l'osmosenseur SLN1 et certains composants de la paroi cellulaire. Ainsi, il a été démontré que l'activité de SLN1 peut être indirectement régulée par une protéine de la paroi cellulaire (Shankarnarayan et al., 2008). De plus, la suppression de cette paroi pendant la préparation

de sphéroplastes de levure entraîne une activation constitutive de la voie HOG. (Reiser et al., 2003). Dans le contexte de notre étude, les molécules présentes dans les phytoextraits pourraient influencer cette interaction, modifiant ainsi la réponse des récepteurs et entraînant l'amplification observée de la fluorescence. En effet, les composés des phytoextraits pourraient agir soit directement sur les récepteurs pour les inactiver, soit indirectement en renforçant l'interaction entre l'osmosenseur et la paroi cellulaire. Dans cet optique, l'utilisation d'un produit commercial à base de paroi de levure (Roméo) était intéressante à tester mais les résultats n'ont pas montré d'effet. On ne peut pas exclure non plus que ces composés puissent agir en ciblant directement la voie HOG. De plus, les réponses opposées obtenues avec les extraits d'algues et le tryptophane (dans le sens de la baisse de la fluorescence) et celles obtenues avec les produits issus de levure et les extraits foliaires (dans le sens de hausse de la fluorescence) ne permettent pas de dégager un fonctionnement clair du mécanisme d'action de l'osmosensing. Au final, la compréhension de ce mécanisme nécessite encore de plus amples investigations.

Les phytoextraits sélectionnés, Skado et Koster, ont été testés sur les différents types de plantes horticoles. Le framboisier a été sélectionné pour nos essais en raison de sa sensibilité marquée au stress hydrique (Morales et al., 2013) tout comme les tomates (Rasul & Tahir, 2023). L'application de ces phytoextraits a permis d'améliorer certains paramètres de croissance, tels que la hauteur et le nombre d'étages foliaires ainsi que la diminution de la mortalité lors d'une sécheresse. Ces résultats sont donc très encourageants, d'une part pour la capacité du système rapporteur a identifié des extraits avec un potentiel effet biostimulant, et d'autre part pour l'obtention de deux nouveaux extraits qui permettent effectivement d'améliorer la croissance et la survie des plantes en condition de sécheresse. L'approche adoptée pour ces essais a été de traiter les plantes avec les phytoextraits une fois qu'elles commençaient à subir un stress hydrique dans le cadre d'une action curative. Cependant, d'autres protocoles d'application pourront être envisagés, en particulier un traitement préventif. Appliquer les extraits avant l'instauration du stress hydrique pourrait pré-conditionner et préparer les plantes à faire face à des conditions défavorables, potentiellement avec des résultats plus bénéfiques. Outre les ajustements de protocole, une concentration réduite des extraits pourrait également être examinée afin de minimiser les quantités d'extrait à utiliser. De plus, l'application de stress plus intense pourra être envisagée,

étant donné que les stress modérés appliqués dans nos essais se sont avérés parfois trop faibles. Ceci, combiné à des intervalles de temps différents entre chaque traitement, pourrait aider à optimiser l'utilisation des phytoextraits.

Lors du criblage des exsudats racinaires de peuplier cultivés en aéroponie, un effet distinct a été noté avec l'exsudat racinaire A3-1, se manifestant par une baisse de la fluorescence. Cependant, cette particularité n'a pas été observée dans d'autres exsudats du même lot, suggérant l'absence d'un impact significatif de ces exsudats sur les récepteurs étudiés. De même, les exsudats racinaires provenant de cultures en hydroponie n'ont montré aucun effet notable. Il en va de même pour l'exsudat racinaire de type "hairy route". Comme évoqué dans la discussion du chapitre 3 concernant les biostimulants commerciaux, bien que nos investigations antérieures se soient concentrées sur les impacts de ces extraits pu exudat face à au stress osmotique en milieu liquide, il serait pertinent d'étudier leur comportement face à un stress de plus longue durée en utilisant des cultures sur milieu solide avec les extraits infusés.

La caractérisation chimique des phytoextraits Skado et Koster *via* la HRMS nous a permis d'identifier quelques composés. Ces deux extraits renferment deux molécules en commun, à savoir l'Isoquercétine et Nigracin/Salireposide. La coexistence de ces composés dans les deux extraits constitue une piste intéressante pour la caractérisation des molécules potentiellement impliquées dans les effets bénéfiques observés lors des essais phénotypiques pour ces deux extraits. Il est notable que plusieurs des composés trouvés correspondent à ceux déjà répertoriés dans la littérature pour différentes espèces de peuplier : Salicortin (*Populus tremuloides*) (Kruger & Manion, 1994), Isoquercetin (*Populus balsamifera*) (Pearl & Darling, 1971a), Nigracin/Salireposide (*Populus tremuloides*, *Populus davidiana*) (Pearl & Darling, 2002 ; Zhang et al., 2006), Tremulacin (*Populus tremuloides*, *Populus deltoides*) (Pearl & Darling, 1971b ; Picard et al., 1994), Salicin (*Populus tremuloides*, *Populus balsamifera*, *Populus sieboldii*) (Greenaway et al., 1991 ; Greenaway, 1992 ; Schimel et al., 1996) et l'acide chlorogénique (*Populus tremula*) (Abreu et al., 2020). Certaines de ces molécules (l'isoquercetin et l'acide chlorogénique) sont des types de polyphénols. Une étude a mis en évidence une augmentation de la capacité antioxydante de composés phénoliques tels que la catéchine et le kaempférol ainsi que des composés polyphénoliques tant dans les racines que dans les feuilles en situation de stress hydrique induit par le PEG₆₀₀₀ (Popović et

al., 2016). De plus, parmi ces composés, l'acide salicylique et les flavonoïdes tels que l'Isoquercétine, sont reconnus pour leurs propriétés biostimulantes et de défense des plantes (*Rajjou et al., 2006 ; Nehela et al., 2021 ; Shah et al., 2022*).

Afin de poursuivre la caractérisation de nos deux extraits, nous envisageons par la suite une analyse par HPLC avec l'utilisation de standard de référence. Cette démarche permettra non seulement de valider les identifications préalablement effectuées par HRMS, mais également de quantifier précisément ces molécules. De plus, nous comptons procéder à un examen plus poussé des deux phytoextraits à travers un fractionnement utilisant la **Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC)**. Cette méthode exploite deux phases liquides non miscibles pour isoler des composés spécifiques en sous-fractions. L'objectif est de tester ces sous-fractions, ne contenant plus que quelques composés, dans notre système rapporteur afin de déterminer quelles molécules contribuent à l'activité observée des extraits. Par la suite, les sous-fractions positives seront soumises à des tests sur plantes en condition de stress et celles présentant un effet biostimulant pourront être à nouveau caractérisées pour leur composition. De plus, des analyses par MS/MS peuvent être envisagées afin de fragmenter les ions moléculaires correspondants aux pics non identifiés en ions fragments plus petits. En analysant ces fragments, on peut obtenir des informations sur la structure de la molécule originale. Il est également possible, après plusieurs sous-fractionnements permettant d'aboutir à une seule molécule, d'utiliser la RMN pour obtenir l'identification exacte du composé.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Face aux contraintes environnementales, telles que la sécheresse, les plantes ont évolué et mis en place différentes stratégies pour y faire face. Ces stratégies reposent sur une perception et une transduction de la contrainte à l'échelle cellulaire. C'est dans cette optique de compréhension des voies de signalisation, essentielle à la compréhension des mécanismes adaptatifs des végétaux, que se sont inscrits les travaux exploratoires de ma thèse. Ces travaux ont permis :

- D'une part, d'approfondir la caractérisation fonctionnelle des osmosenseurs HK1 du peuplier.
- D'autre part, de partir à la recherche de ligands spécifiques pour ces récepteurs.

Comment les récepteurs HK1 perçoivent-ils la contrainte ?

Notre étude fonctionnelle des récepteurs HK1 a mis en avant le rôle des domaines CACHE et TM2 dans l'osmosensing chez le peuplier. En particulier, nous avons mis en évidence trois acides aminés dans le domaine CACHE qui pourraient jouer un rôle dans la réponse au stress osmotique. De précédentes études sur *S. cerevisiae* ont indiqué que l'activité de SLN1 pourrait être modulée par un contact physique avec des composants de la paroi cellulaire (*Shankarnarayan et al., 2008*). Il est donc possible que les HK1 de peuplier interagissent avec des molécules de la paroi ou de l'apoplasme grâce aux trois acides aminés identifiés dans cette étude. Par ailleurs, il apparaît que le domaine TM2 joue un rôle déterminant dans la capacité de perception des récepteurs HK1 de peuplier et dans la différence de réponse osmotique entre HK1a et HK1b.

Pour aller plus loin, une perspective intéressante serait d'entreprendre une série de mutations ciblées sur les éléments de structure secondaire du domaine CACHE. En effet, des domaines CACHE analogues à ceux de HK1a/b (dCache_1) ont été structurellement identifiés, comme c'est le cas pour la protéine Tlp3, un chémorécepteur bactérien (*Liu et al., 2015*). Ces structures se composent de feuillets bêta intercalés d'hélices alpha, formant deux sous-domaines CACHE successifs. Une comparaison de ces motifs avec ceux des protéines HK1a/b pourrait permettre d'identifier des éléments homologues à cibler. Dans cette optique, il serait intéressant de procéder à une mutagénèse de type délétion sur les motifs structurants de type

hélice alpha ou feuillet bêta du domaine CACHE des récepteurs HK1. Les mutants ainsi obtenus pourraient ensuite être évalués par complémentation fonctionnelle au sein de la levure. Cette approche pourrait apporter des informations supplémentaires sur le mode de fonctionnement des récepteurs HK1.

Un des objectifs de mon travail de thèse consistait également à obtenir des données fonctionnelles des récepteurs HK1 par le biais d'une analyse structurale de l'ECD. La résolution de la structure 3D de ce domaine répond à deux enjeux majeurs : d'une part, décrypter les mécanismes de reconnaissance et de sélectivité des récepteurs envers différents ligands et, d'autre part, proposer pour la première fois la structure tridimensionnelle réelle d'un domaine CACHE issu de récepteurs de plante.

Tout d'abord, nous avons réussi à produire les ECD des récepteurs HK1 dans *E. coli*, mais sous forme insoluble. Cependant, grâce à une stratégie consistant à dénaturer puis renaturer la protéine à partir des corps d'inclusion, nous sommes parvenus à solubiliser la protéine. La méthode utilisée étant peu dénaturante, le processus de renaturation ultérieure est facilité en minimisant les effets sur la structure secondaire naturelle de la protéine. Il s'agit maintenant de réussir à obtenir une protéine purifiée pour passer aux essais de cristallisation.

Les obstacles rencontrés lors des étapes de solubilisation soulignent la difficulté de l'expression de protéines membranaires en système hétérologue (*Seddon et al., 2004*). A la place de la thioredoxine, l'utilisation d'autres étiquettes de fusion comme la GST pourrait aider à la solubilisation de la protéine en aidant à stabiliser sa structure et en prévenant son agrégation (*Harper & Speicher, 2008*). Par la suite, l'exploration d'autres systèmes d'expression, comme celui de la levure (*Ghaemmaghami et al., 2003*), pourrait être envisagée pour aider à obtenir des protéines solubles et fonctionnelles. En effet, la levure présente la caractéristique d'effectuer des modifications post-traductionnelles, telles que la glycosylation, qui peuvent optimiser la solubilité de certaines protéines. De surcroît, les cultures de levures offrent la possibilité de produire des protéines en grandes quantités dont le repliement est facilité en comparaison avec les cellules procaryotes. En effet, les protéines produites dans ce système eucaryote traversent le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi qui jouent un rôle important dans le repliement et les modifications post-traductionnelles des protéines, assurant ainsi une configuration tridimensionnelle appropriée. De plus, S.

cerevisiae a été largement utilisée dès le début des années 1980 pour l'expression de protéines recombinantes dans les levures (Hitzeman et al., 1981 ; Mattanovich et al., 2012).

Quel est le potentiel ligand qui pourrait se fixer sur les récepteurs HK1 ?

Afin d'identifier les ligands qui se fixent potentiellement sur ces récepteurs, nous avons développé un système rapporteur d'osmosensing fluorescent activé par le stress, dans un contexte de levure osmodéficiente complémentée. Ce système s'est avéré effectivement capable de répondre de façon spécifique et proportionnelle à différents stress osmotiques. Il constitue donc un biosenseur pour la détection des variations de l'environnement osmotique.

Les tests préliminaires avec des produits biostimulants ou non, en particulier ceux issus d'algues, ont montré des résultats contrastés. Le fait que certains extraits issus d'algues atténuent la réponse fluorescente en situation de stress suggère l'activation potentielle de la voie MSP, modulant ainsi la réponse cellulaire au stress osmotique. Les résultats avec le produit issu de levure, Biosmart, allant dans le sens opposé, suggère que ce biostimulant pourrait intensifier l'extinction de la voie MSP en réponse au stress. Ces résultats différentiels rendent difficile la détermination précise du fonctionnement de ces récepteurs. Ils montrent un mécanisme différent de la régulation de la réponse osmotique par les récepteurs en fonction du biostimulant présent et sa composition. De plus, on ne peut pas exclure que ces biostimulants interagissent également avec d'autres voies de signalisation intracellulaire qui possèdent des protéines en commun avec la voie MSP, ce qui pourrait moduler la réponse de cette voie.

Suite à la mise en place et à la validation de notre système rapporteur, nous l'avons employé dans l'objectif d'identifier des ligands susceptibles d'interagir avec les récepteurs HK1. Parmi les acides aminés examinés, seul le tryptophane a montré une interaction potentielle avec les deux récepteurs HK1a et HK1b. Cependant, cette baisse de fluorescence pourrait ne pas être représentative d'une véritable interaction, mais plutôt le résultat d'un artefact. Comme évoqué dans le chapitre précédent, le tryptophane étant le marqueur de sélection du vecteur rapporteur, il se pourrait que le vecteur soit perdu au fil des divisions, sans pression de

sélection, d'où la diminution de fluorescence observée. Ainsi, il est essentiel de confirmer ces observations avant d'approfondir davantage dans cette voie.

Il serait intéressant de réaliser des tests *in vitro* pour évaluer l'interaction d'autres molécules candidates, comme des petits acides organiques, avec l'ECD des deux HK1. Ces essais seront particulièrement instructifs une fois la purification de l'ECD achevée, car ils permettront d'examiner directement ces interactions dans un environnement contrôlé. Une analyse par spectrométrie de masse sera mise en œuvre pour identifier les ligands fixés. Par ailleurs, des techniques complémentaires telles que la calorimétrie isotherme de titration (ITC) ou la spectroscopie RMN pour obtenir des informations quantitatives et qualitatives sur ces liaisons pourront être envisagées.

Lors de l'évaluation dans le système rapporteur des extraits foliaires, deux d'entre eux, Skado et Koster, ont augmenté la fluorescence, indiquant une amplification de la réponse au stress. Ces extraits pourraient renforcer la réponse au stress osmotique des plantes, augmentant ainsi leur résistance face au stress hydrique. Au niveau moléculaire, il est possible que les composés contenus dans ces phytoextraits interagissent soit directement avec les osmosenseurs, soit indirectement en renforçant une interaction entre les osmosenseurs et des éléments de la paroi. L'ensemble des résultats ne présentant pas une réponse claire, des tests supplémentaires sont donc nécessaires pour définir plus précisément le mécanisme de fonctionnement des récepteurs HK1a et HK1b.

Il est à noter que lors de ces tests, nous avons observé des différences contrastées de réponse, en fonction de la concentration des extraits, que ce soit pour les extraits d'algues ou les extraits foliaires. Ces observations suggèrent donc une sensibilité de notre système qui limiterait sa capacité à identifier tous les extraits capables de propriétés biostimulantes. D'autre part, les extraits foliaires testés ont été obtenus par extraction éthanolique. Hors, des travaux réalisés au sein de l'équipe montrent des profils phytochimiques différents lorsque des phases d'extractions séquentielles variables pour la polarité des solvants ont été utilisées. Ces nouveaux résultats ouvrent également de nouvelles pistes d'investigation au vu des différences de composition chimiques observées dans ces nouveaux extraits.

Nous avons évalué l'impact des phytoextraits sélectionnés sur l'amélioration de la tolérance des plantes à la sécheresse en conduisant des expérimentations sur différentes espèces

végétales. Les résultats ont mis en évidence leur potentiel biostimulant en optimisant certains indicateurs de croissance et de survie en condition de sécheresse, faisant de ces extraits des candidats biostimulants prometteurs. Ils rentreraient dans la catégorie des biostimulants organiques de type extraits végétaux et pourraient constituer une nouvelle solution issue du peuplier pour l'amélioration de la tolérance des plantes à la sécheresse.

Nos investigations sur les phytoextraits nous conduisent à envisager aussi une autre approche. L'idée de traiter les plantes de manière préventive cette fois, avant l'instauration du stress hydrique, pourrait constituer une stratégie permettant de potentialiser les effets bénéfiques des extraits. L'optimisation de leur utilisation par des variations de concentrations et des intervalles de traitement adaptés sera également à considérer dans les futures expérimentations. En parallèle des tests sur les plantes horticoles, nous sommes en train également d'évaluer l'efficacité des extraits végétaux sélectionnés sur la vigne. Ces tests pourraient fournir des indications précieuses sur les bénéfices potentiels de nos extraits pour un autre type de culture, également soumise aux problèmes de sécheresse. Il pourra être envisagé par la suite d'étendre les essais sur des plantes de grandes cultures, telles que les céréales.

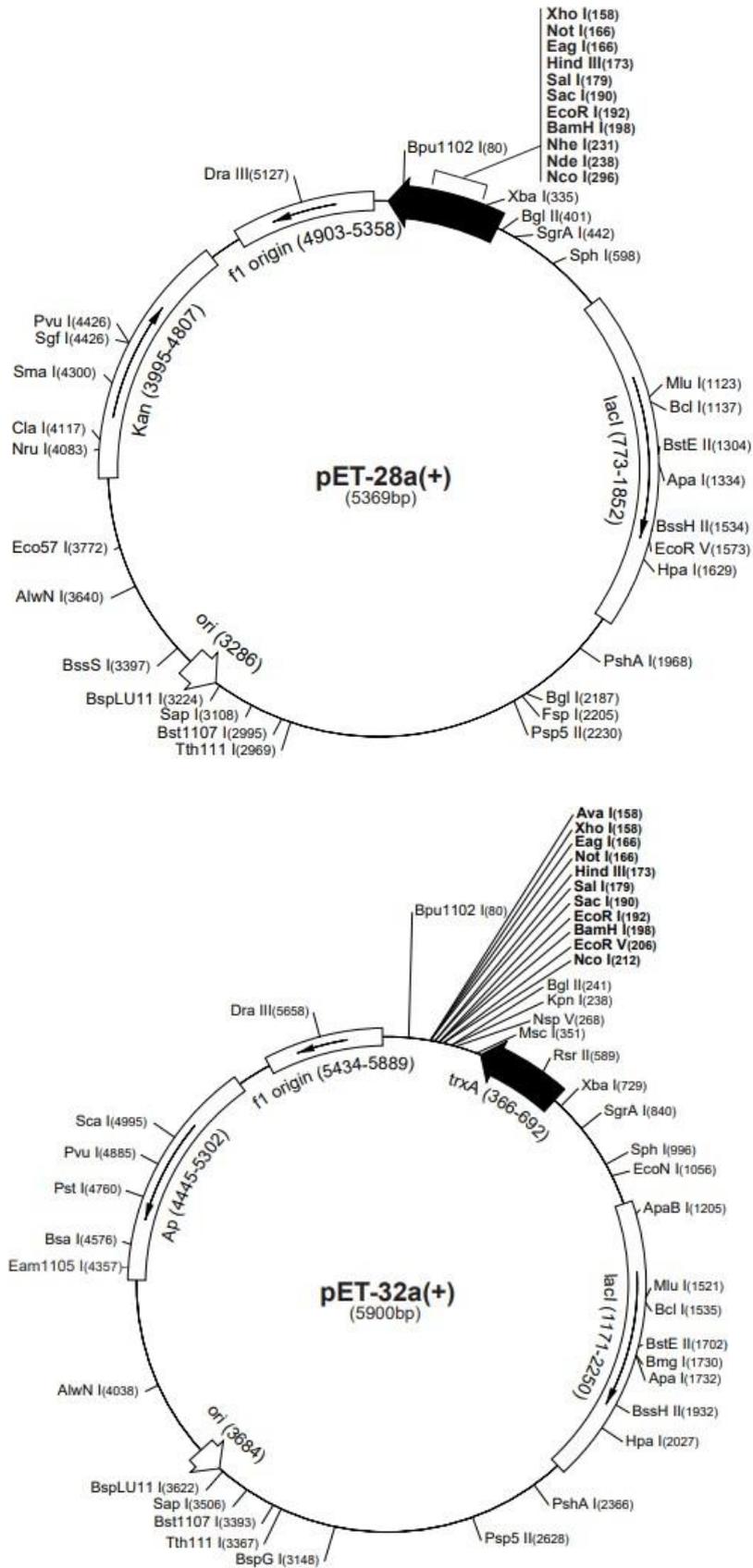
La caractérisation chimique des phytoextraits par HRMS a permis de repérer plusieurs composés déjà identifiés dans différentes espèces de peupliers. Parmi ces composés, l'acide salicylique et les flavonoïdes tels que l'Isoquercétine, sont reconnus pour leurs propriétés biostimulantes et de défense des plantes (*Shah et al., 2022 ; Rajjou et al., 2006 ; Nehela et al., 2021*). A l'aide de standard de référence, une analyse HPLC de nos extraits pourra être envisagée. Cette étape, tout en confirmant les molécules préalablement identifiées par HRMS, devrait également nous permettre de les quantifier et ainsi pouvoir caractériser plus finement la composition de nos extraits. De plus, une stratégie de fractionnement des extraits de Skado et Koster *via* la Chromatographie de Partage Centrifuge (**CPC**) est prévue. Cette approche est envisagée pour obtenir des composés séparés en sous-fraction qui pourront être testés dans le système rapporteur afin d'identifier la ou les molécules actives dans les extraits.

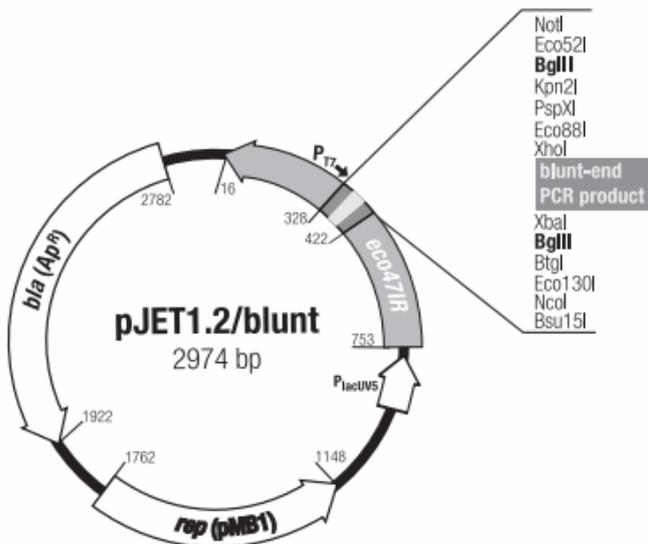
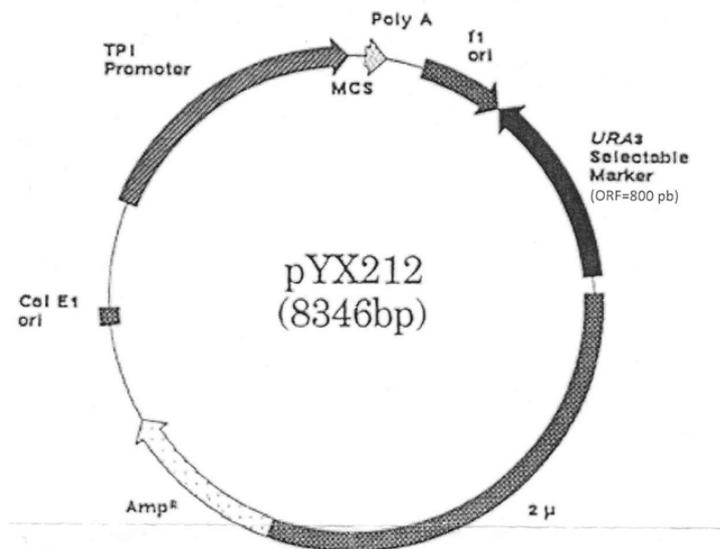
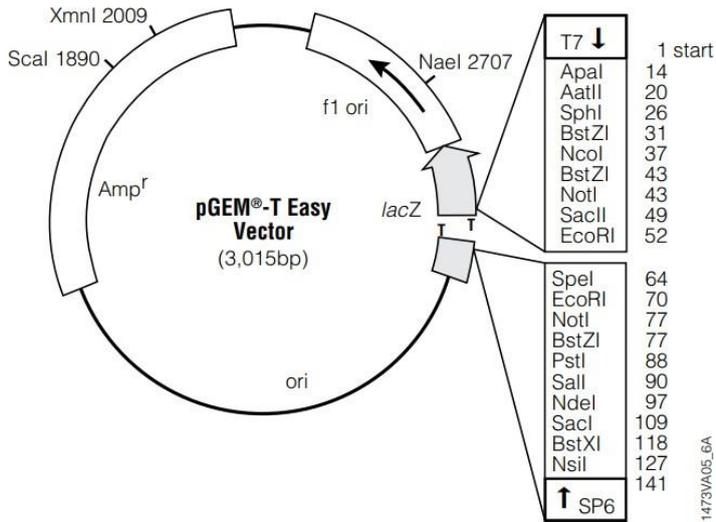
En récapitulant l'ensemble du travail de cette thèse, les récepteurs HK1a et HK1b ont pu être mieux caractérisés avec la mise en évidence de domaines et acides aminés spécifiques impliqués dans leur fonction, la production de l'ECD des protéines HK1 du peuplier sous forme

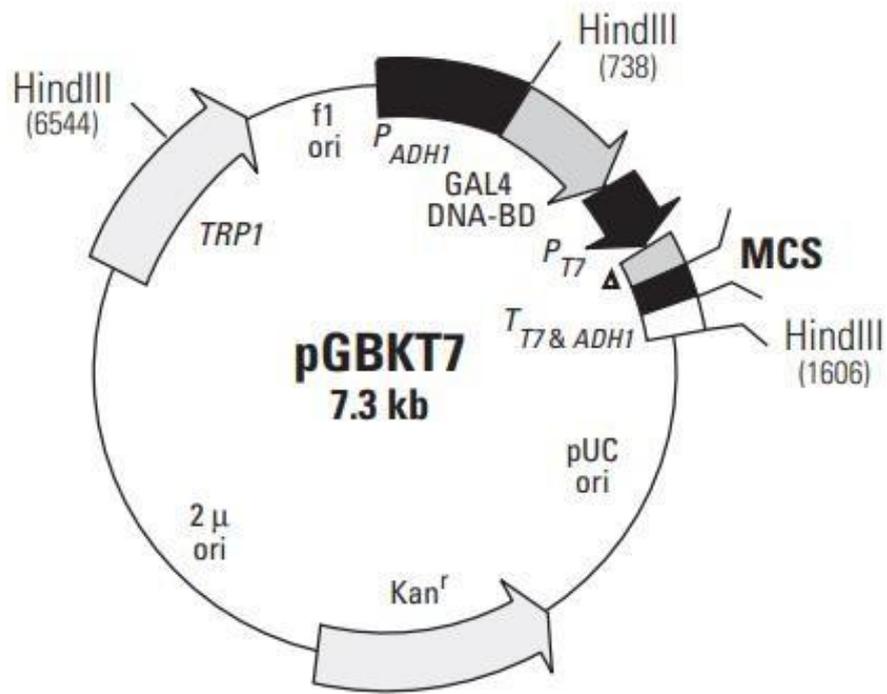
soluble devrait ouvrir des perspectives pour l'exploration structurale, inédits dans le domaine végétal, une fois la purification achevée. Par ailleurs, la mise au point d'un système biosenseur de l'environnement osmotique constitue un outil utilisable à la fois pour l'identification de ligands potentiels des osmosenseurs HK1 mais aussi pour l'identification d'extraits aux capacités potentielles de biostimulants. Au vu de ces résultats innovants, il a été jugé pertinent de considérer la protection de ces innovations. Ainsi, un brevet est actuellement en cours de dépôt pour l'exploitation du système rapporteur en tant qu'outil de détection d'extraits dotés de propriétés biostimulantes pour l'amélioration de la tolérance des plantes à la sécheresse.

ANNEXES

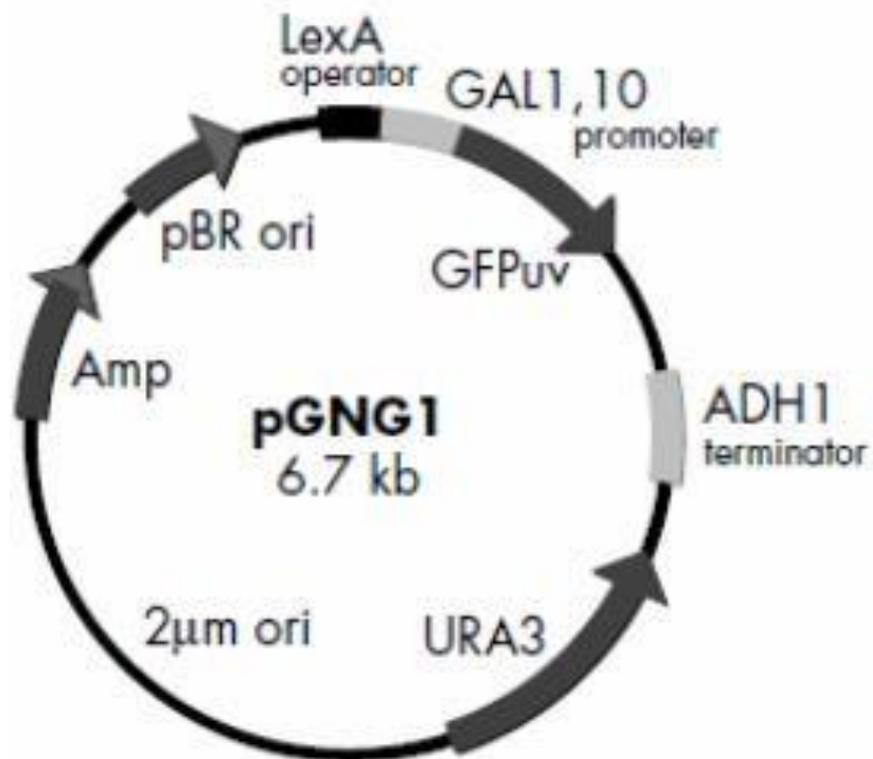
ANNEXE 1. Cartes des principaux plasmides utilisés







▲ c-Myc epitope tag



ANNEXE 2. Séquences d'amorces utilisées pour l'amplification de la GFP_{UV} à partir du vecteur pGNG1 et de P_{STL1} par PCR sur colonies de levure L40Δ.

Amorces	Orientation	Amplification	Séquences
GFP-5 prom STL1	5'-3'	GFP _{UV}	TAGAAAGTTTTAGACCATGAGTAAAGGAGAAGAAGT
GFP-3 vect	3'-5'		TCGCCCCGGAATTAGCTTTATTTGTAGAGCTCATCCAT
PromSTL1- 5 vect	5'-3'	P _{STL1}	GTTTGTGCACTTGCCGACGGACGTACGGACGAAATA
PromSTL1- 3	3'-5'		GGTCTAAAACCTTCTATGTTCTATTTTCTATTTTTT

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

Albertyn, J., Hohmann, S., Thevelein, J. M., & Prior, B. A. (1994). GPD1, which encodes glycerol-3-phosphate dehydrogenase, is essential for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*, and its expression is regulated by the high-osmolarity glycerol response pathway. *Molecular and Cellular Biology*, *14*(6), 4135-4144.

Allen, C., Macalady, A., Chenchouni, H., Bachelet, D., McDowell, N., Vennetier, M., Kitzberger, T., Rigling, A., Breshears, D., Hogg, E. H., Gonzalez, P., Fensham, R., Zhang, Z., Castro, J., Demidova, N., Lim, J.-H., Allard, G., Running, S., Semerci, A., & Cobb, N. (2010). A global overview of drought and heat-induced tree mortality reveals emerging climate change risks for forests. *Forest Ecology and Management*, *259*, 660-684.

Almadi, L., Paoletti, A., Cinosi, N., Daher, E., Rosati, A., Di Vaio, C., & Famiani, F. (2020). A Biostimulant Based on Protein Hydrolysates Promotes the Growth of Young Olive Trees. *Agriculture*, *10*(12), 618.

Amorim, J. H., Porchia, B. F. M. M., Balan, A., Cavalcante, R. C. M., da Costa, S. M., de Barcelos Alves, A. M., & de Souza Ferreira, L. C. (2010). Refolded dengue virus type 2 NS1 protein expressed in *Escherichia coli* preserves structural and immunological properties of the native protein. *Journal of Virological Methods*, *167*(2), 186-192.

Anantharaman, V., & Aravind, L. (2000). Cache - a signaling domain common to animal Ca(2+)-channel subunits and a class of prokaryotic chemotaxis receptors. *Trends in Biochemical Sciences*, *25*(11), 535-537.

Antoniadi, I., Novák, O., Gelová, Z., Johnson, A., Plíhal, O., Simerský, R., Mik, V., Vain, T., Mateo-Bonmatí, E., Karady, M., Pernisová, M., Plačková, L., Opassathian, K., Hejátko, J., Robert, S., Friml, J., Doležal, K., Ljung, K., & Turnbull, C. (2020). Cell-surface receptors enable perception of extracellular cytokinins. *Nature Communications*, *11*(1), 4284.

Apel, K., & Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, *55*, 373-399.

Artner, C., & Benkova, E. (2019). Ethylene and Cytokinin: Partners in Root Growth Regulation. *Molecular Plant*, *12*(10), 1312-1314.

Atkinson, N. J., & Urwin, P. E. (2012). The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. *Journal of Experimental Botany*, *63*(10), 3523-3543.

B

Baek, M., DiMaio, F., Anishchenko, I., Dauparas, J., Ovchinnikov, S., Lee, G. R., Wang, J., Cong, Q., Kinch, L. N., Schaeffer, R. D., Millán, C., Park, H., Adams, C., Glassman, C. R., DeGiovanni, A., Pereira, J. H., Rodrigues, A. V., van Dijk, A. A., Ebrecht, A. C., ... Baker, D. (2021). Accurate prediction of protein structures and interactions using a three-track neural network. *Science*, *373*(6557), 871-876.

Bai, C., Tesker, M., & Engelberg, D. (2015). The yeast Hot1 transcription factor is critical for activating a single target gene, *STL1*. *Molecular Biology of the Cell*, *26*(12), 2357-2374.

Baltazar, M., Correia, S., Guinan, K. J., Sujeeth, N., Bragança, R., & Gonçalves, B. (2021). Recent Advances in the Molecular Effects of Biostimulants in Plants: An Overview. *Biomolecules*, *11*(8), 1096.

Bartrina, I., Jensen, H., Novák, O., Strnad, M., Werner, T., & Schmölling, T. (2017). Gain-of-Function Mutants of the Cytokinin Receptors AHK2 and AHK3 Regulate Plant Organ Size, Flowering Time and Plant Longevity. *Plant Physiology*, *173*(3), 1783-1797.

Bavaresco, L., Lucini, L., Squeri, C., Zamboni, M., & Frioni, T. (2020). Protein hydrolysates modulate leaf proteome and metabolome in water-stressed grapevines. *Scientia Horticulturae*, *270*, 109413.

Bekker, M., Teixeira de Mattos, M. J., & Hellingwerf, K. J. (2006). The role of two-component regulation systems in the physiology of the bacterial cell. *Science Progress*, *89*(Pt 3-4), 213-242.

Belimov, A. A., Dodd, I. C., Hontzeas, N., Theobald, J. C., Safronova, V. I., & Davies, W. J. (2009). Rhizosphere bacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase increase yield of plants grown in drying soil via both local and systemic hormone signalling. *New Phytologist*, *181*(2), 413-423.

Berendsen, R. L., Pieterse, C. M. J., & Bakker, P. A. H. M. (2012). The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science*, *17*(8), 478-486.

Bertheau, L., Cheddor, F., Guirimand, G., Courdavault, V., Depierreux, C., Morabito, D., Brignolas, F., Héricourt, F., & Carpin, S. (2012). Identification of five B-type response regulators as members of a multistep phosphorelay system interacting with histidine-containing phosphotransfer partners of *Populus osmosensor*. *BMC Plant Biology*, *12*(1), 241.

Bertheau, L., Djeghdir, I., Foureau, E., Cheddor, F., Glevarec, G., Oudin, A., Depierreux, C., Morabito, D., Brignolas, F., Courdavault, V., Héricourt, F., Auguin, D., & Carpin, S. (2015). Insights into B-type RR members as signaling partners acting downstream of HPT partners of HK1 in the osmotic stress response in *Populus*. *Plant Physiology and Biochemistry*, *94*,

244-252.

Bertheau, L., Miranda, M., Foureau, E., Rojas Hoyos, L. F., Cheddor, F., Héricourt, F., Depierreux, C., Morabito, D., Papon, N., Clastre, M., Scippa, G. S., Brignolas, F., Courdavault, V., & Carpin, S. (2013). In planta validation of HK1 homodimerization and recruitment of preferential HPT downstream partners involved in poplar multistep phosphorelay systems. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 147(4), 991-995.

Bhattacharyya, P. N., & Jha, D. K. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 28(4), 1327-1350.

Binder, B. M. (2008). The ethylene receptors: Complex perception for a simple gas. *Plant Science*, 175(1), 8-17.

BLACKMAN, P. G., & DAVIES, W. J. (1984). Age-related Changes in Stomatal Response to Cytokinins and Abscisic Acid. *Annals of Botany*, 54(1), 121-126.

Blomberg, A. (2022). Yeast osmoregulation – glycerol still in pole position. *FEMS Yeast Research*, 22(1), foac035.

Blomberg, A., & Adler, L. (1992). Physiology of Osmotolerance in Fungi¹¹This review is dedicated to Professor Birgitta Norkrans who introduced us to this field of science. In A. H. Rose (Éd.), *Advances in Microbial Physiology* (Vol. 33, p. 145-212). Academic Press.

Boothroyd-Roberts, K., Gagnon, D., & Truax, B. (2013). Hybrid poplar plantations are suitable habitat for reintroduced forest herbs with conservation status. *SpringerPlus*, 2, 507.

Borkovich, K. A., Alex, L. A., Yarden, O., Freitag, M., Turner, G. E., Read, N. D., Seiler, S., Bell-Pedersen, D., Paietta, J., Plesofsky, N., Plamann, M., Goodrich-Tanrikulu, M., Schulte, U., Mannhaupt, G., Nargang, F. E., Radford, A., Selitrennikoff, C., Galagan, J. E., Dunlap, J. C., ... Pratt, R. (2004). Lessons from the Genome Sequence of *Neurospora crassa*: Tracing the Path from Genomic Blueprint to Multicellular Organism. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(1), 1-108.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.

Bradshaw, H. D., Ceulemans, R., Davis, J., & Stettler, R. (2000). Emerging Model Systems in Plant Biology: Poplar (*Populus*) as A Model Forest Tree. *Journal of Plant Growth Regulation*, 19(3), 306-313.

Brda, N., Huc, R., Granier, A., & Dreyer, E. (2006). Temperate forest trees and stands under severe drought: A review of ecophysiological responses, adaptation processes and long-term

consequences.

Bren, A., & Eisenbach, M. (2000). How signals are heard during bacterial chemotaxis: protein-protein interactions in sensory signal propagation. *Journal of Bacteriology*, 182(24), 6865-6873.

Brewster, J. L., de Valoir, T., Dwyer, N. D., Winter, E., & Gustin, M. C. (1993). An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science (New York, N.Y.)*, 259(5102), 1760-1763.

Buckley, T. N. (2005). The control of stomata by water balance. *New Phytologist*, 168(2), 275-292.

Burgess, R. R. (2009). Refolding solubilized inclusion body proteins. *Methods in Enzymology*, 463, 259-282.

Busov, V. B., Brunner, A. M., Meilan, R., Filichkin, S., Ganio, L., Gandhi, S., & Strauss, S. H. (2005). Genetic transformation: a powerful tool for dissection of adaptive traits in trees. *The New Phytologist*, 167(1), 9-18.

C

Calvo, P., Nelson, L. M., & Kloepper, J. W. (2014). Agricultural uses of plant biostimulants. *Plant and Soil*, 383(1-2), 3-41.

Canellas, L. P., Olivares, F. L., Aguiar, N. O., Jones, D. L., Nebbioso, A., Mazzei, P., & Piccolo, A. (2015). Humic and fulvic acids as biostimulants in horticulture. *Scientia Horticulturae*, 196, 15-27.

Casino, P., Rubio, V., & Marina, A. (2009). Structural insight into partner specificity and phosphoryl transfer in two-component signal transduction. *Cell*, 139(2), 325-336.

Celletti, S., Astolfi, S., Guglielmo, N., Colla, G., Cesco, S., & Mimmo, T. (2020). Evaluation of a Legume-Derived Protein Hydrolysate to Mitigate Iron Deficiency in Plants. *Agronomy*, 10(12), 1942.

Chaves, M. M., Maroco, J. P., & Pereira, J. S. (2003). Understanding plant responses to drought - from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology: FPB*, 30(3), 239-264.

Chaves, M. M., Pereira, J. S., Maroco, J., Rodrigues, M. L., Ricardo, C. P. P., Osório, M. L., 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.

Chefdor, F., Bénédicti, H., Depierreux, C., Delmotte, F., Morabito, D., & Carpin, S. (2006). Osmotic stress sensing in Populus: Components identification of a phosphorelay system. *FEBS*

Letters, 580(1), 77-81.

Chefdor, F., Héricourt, F., Koudounas, K., Carqueijeiro, I., Courdavault, V., Mascagni, F., Bertheau, L., Larcher, M., Depierreux, C., Lamblin, F., Racchi, M. L., & Carpin, S. (2018). Highlighting type A RRs as potential regulators of the dkHK1 multi-step phosphorelay pathway in *Populus*. *Plant Science*, 277, 68-78.

Chen, T. (2011). 1 - Compound yarns. In R. H. Gong (Éd.), *Specialist Yarn and Fabric Structures* (p. 1-20). Woodhead Publishing.

Cheung, J., & Hendrickson, W. A. (2010). Sensor domains of two-component regulatory systems. *Current Opinion in Microbiology*, 13(2), 116-123.

Choudhury, F. K., Rivero, R. M., Blumwald, E., & Mittler, R. (2017). Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 90(5), 856-867.

Clark, E. D. B. (1998). Refolding of recombinant proteins. *Current Opinion in Biotechnology*, 9(2), 157-163.

Colla, G., Nardi, S., Cardarelli, M., Ertani, A., Lucini, L., Canaguier, R., & Roupheal, Y. (2015). Protein hydrolysates as biostimulants in horticulture. *Scientia Horticulturae*, 196, 28-38.

Colla, G., Roupheal, Y., Canaguier, R., Svecova, E., & Cardarelli, M. (2014). Biostimulant action of a plant-derived protein hydrolysate produced through enzymatic hydrolysis. *Frontiers in Plant Science*, 5.

Craigie, J. S. (2011). Seaweed extract stimuli in plant science and agriculture. *Journal of Applied Phycology*, 23(3), 371-393.

Cronk, Q. C. B. (2005). Plant eco-devo: the potential of poplar as a model organism. *New Phytologist*, 166(1), 39-48.

Cutler, S. R., Rodriguez, P. L., Finkelstein, R. R., & Abrams, S. R. (2010). Abscisic acid: emergence of a core signaling network. *Annual Review of Plant Biology*, 61, 651-679.

D

D'Agostino, I. B., Deruère, J., & Kieber, J. J. (2000). Characterization of the response of the Arabidopsis response regulator gene family to cytokinin. *Plant Physiology*, 124(4), 1706-1717.

D'Agostino, I. B., & Kieber, J. J. (1999). Phosphorelay signal transduction: the emerging family of plant response regulators. *Trends in Biochemical Sciences*, 24(11), 452-456.

Daudu, D., Kisiala, A., Werner Ribeiro, C., Mélin, C., Perrot, L., Clastre, M., Courdavault, V.,

- Papon, N., Oudin, A., Courtois, M., Dugé de Bernonville, T., Gaucher, M., Degrave, A., Lanoue, A., Lanotte, P., Schouler, C., Brisset, M.-N., Emery, R. J. N., Pichon, O., ... Glévarec, G. (2019). Setting-up a fast and reliable cytokinin biosensor based on a plant histidine kinase receptor expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biotechnology*, *289*, 103-111.
- De Bernardez Clark, E., Schwarz, E., & Rudolph, R. (1999). Inhibition of aggregation side reactions during in vitro protein folding. *Methods in Enzymology*, *309*, 217-236.
- Deliopoulos, T., Kettlewell, P. S., & Hare, M. C. (2010). Fungal disease suppression by inorganic salts: A review. *Crop Protection*, *29*(10), 1059-1075.
- Demetzos, C. (2016). *Pharmaceutical Nanotechnology: Fundamentals and Practical Applications*. Springer.
- Deng, Y., Dong, H., Mu, J., Ren, B., Zheng, B., Ji, Z., Yang, W.-C., Liang, Y., & Zuo, J. (2010). Arabidopsis Histidine Kinase CKI1 Acts Upstream of HISTIDINE PHOSPHOTRANSFER PROTEINS to Regulate Female Gametophyte Development and Vegetative Growth[C][W]. *The Plant Cell*, *22*(4), 1232-1248.
- Desikan, R., Horák, J., Chaban, C., Mira-Rodado, V., Witthöft, J., Elgass, K., Grefen, C., Cheung, M.-K., Meixner, A., Hooley, R., Neill, S., Hancock, J., & Harter, K. (2008). The Histidine Kinase AHK5 Integrates Endogenous and Environmental Signals in Arabidopsis Guard Cells. *PLoS one*, *3*, e2491.
- Dickmann, D., & Kuzovkina, Y. (2014). *Poplars and Willows in the World* (p. 8-91).
- Ding, W.-T., Zhang, G.-C., & Liu, J.-J. (2013). 3' Truncation of the GPD1 Promoter in *Saccharomyces cerevisiae* for Improved Ethanol Yield and Productivity. *Applied and Environmental Microbiology*, *79*(10), 3273-3281.
- Djeghdir, I., Cheddor, F., Bertheau, L., Koudounas, K., Carqueijeiro, I., Lemos Cruz, P., Courdavault, V., Depierreux, C., Larcher, M., Lamblin, F., Héricourt, F., Glévarec, G., Oudin, A., & Carpin, S. (2021). Evaluation of type-B RR dimerization in poplar: A mechanism to preserve signaling specificity? *Plant Science*, *313*, 111068.
- Dobrá, J., Černý, M., Štorchová, H., Dobrev, P., Skalák, J., Jedelský, P. L., Lukšanová, H., Gaudinová, A., Pešek, B., Malbeck, J., Vanek, T., Brzobohatý, B., & Vanková, R. (2015). The impact of heat stress targeting on the hormonal and transcriptomic response in Arabidopsis. *Plant Science: An International Journal of Experimental Plant Biology*, *231*, 52-61.
- Dodd, I. c., Zinovkina, N. y., Safronova, V. i., & Belimov, A. a. (2010). Rhizobacterial mediation of plant hormone status. *Annals of Applied Biology*, *157*(3), 361-379.
- Du Jardin, P. (2012). *The Science of Plant Biostimulants – A bibliographic analysis, Ad hoc study*

report.

Du Jardin, P. (2015). Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae*, 196, 3-14.

E

Efroni, I., Han, S.-K., Kim, H. J., Wu, M.-F., Steiner, E., Birnbaum, K. D., Hong, J. C., Eshed, Y., & Wagner, D. (2013). Regulation of leaf maturation by chromatin-mediated modulation of cytokinin responses. *Developmental Cell*, 24(4), 438-445.

Erb, M., & Kliebenstein, D. J. (2020). Plant Secondary Metabolites as Defenses, Regulators, and Primary Metabolites: The Blurred Functional Trichotomy. *Plant Physiology*, 184(1), 39-52.

Eriksson, P., Alipour, H., Adler, L., & Blomberg, A. (2000). Rap1p-binding sites in the *Saccharomyces cerevisiae* GPD1 promoter are involved in its response to NaCl. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(38), 29368-29376.

Ertani, A., Cavani, L., Pizzeghello, D., Brandellero, E., Altissimo, A., Ciavatta, C., & Nardi, S. (2009). Biostimulant activity of two protein hydrolyzates in the growth and nitrogen metabolism of maize seedlings. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 172(2), 237-244.

Ertani, A., Schiavon, M., Muscolo, A., & Nardi, S. (2013). Alfalfa plant-derived biostimulant stimulate short-term growth of salt stressed *Zea mays* L. plants. *Plant and Soil*, 364(1), 145-158.

Eyheraguibel, B., Silvestre, J., & Morard, P. (2008). Effects of humic substances derived from organic waste enhancement on the growth and mineral nutrition of maize. *Bioresource Technology*, 99(10), 4206-4212.

F

Fang, S., Xue, J., & Tang, L. (2007). Biomass production and carbon sequestration potential in poplar plantations with different management patterns. *Journal of Environmental Management*, 85(3), 672-679.

Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N., Fujita, D., & Basra, S. M. A. (2009). Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agronomy for Sustainable Development*, 29(1), 185-212.

Felle, H. H. (2005). pH Regulation in Anoxic Plants. *Annals of Botany*, 96(4), 519-532.

Ferreira, C., van Voorst, F., Martins, A., Neves, L., Oliveira, R., Kielland-Brandt, M. C., Lucas, C.,

& Brandt, A. (2005). A Member of the Sugar Transporter Family, Stl1p Is the Glycerol/H⁺ Symporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, 16(4), 2068-2076.

Finkelstein, R. (2013). Abscisic Acid Synthesis and Response. *The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists*, 11, e0166.

Finkelstein, R., Reeves, W., Ariizumi, T., & Steber, C. (2008). Molecular aspects of seed dormancy. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 387-415.

Finn, R. D., Tate, J., Mistry, J., Coghill, P. C., Sammut, S. J., Hotz, H.-R., Ceric, G., Forslund, K., Eddy, S. R., Sonnhammer, E. L. L., & Bateman, A. (2008). The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research*, 36(Database issue), D281-288.

Fiorentino, N., Ventrino, V., Woo, S. L., Pepe, O., De Rosa, A., Gioia, L., Romano, I., Lombardi, N., Napolitano, M., Colla, G., & Roupael, Y. (2018). Trichoderma-Based Biostimulants Modulate Rhizosphere Microbial Populations and Improve N Uptake Efficiency, Yield, and Nutritional Quality of Leafy Vegetables. *Frontiers in Plant Science*, 9.

Fischer, B., Perry, B., Sumner, I., & Goodenough, P. (1992). A novel sequential procedure to enhance the renaturation of recombinant protein from *Escherichia coli* inclusion bodies. *Protein Engineering*, 5(6), 593-596.

Flexas, J., Bota, J., Galmés, J., Medrano, H., & Ribas-Carbó, M. (2006). Keeping a positive carbon balance under adverse conditions: responses of photosynthesis and respiration to water stress. *Physiologia Plantarum*, 127(3), 343-352.

Flexas, J., & Medrano, H. (2002). Energy dissipation in C3 plants under drought. *Functional Plant Biology: FPB*, 29(10), 1209-1215.

Foo, Y. H., Gao, Y., Zhang, H., & Kenney, L. J. (2015). Cytoplasmic sensing by the inner membrane histidine kinase EnvZ. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 118(3), 119-129.

Frewen, B. E., Chen, T. H., Howe, G. T., Davis, J., Rohde, A., Boerjan, W., & Bradshaw, H. D. (2000). Quantitative trait loci and candidate gene mapping of bud set and bud flush in populus. *Genetics*, 154(2), 837-845.

Fujii, H., Chinnusamy, V., Rodrigues, A., Rubio, S., Antoni, R., Park, S.-Y., Cutler, S. R., Sheen, J., Rodriguez, P. L., & Zhu, J.-K. (2009). In vitro reconstitution of an abscisic acid signalling pathway. *Nature*, 462(7273), 660-664.

Fujita, Y., Nakashima, K., Yoshida, T., Katagiri, T., Kidokoro, S., Kanamori, N., Umezawa, T., Fujita, M., Maruyama, K., Ishiyama, K., Kobayashi, M., Nakasone, S., Yamada, K., Ito, T., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2009). Three SnRK2 protein kinases are the main

positive regulators of abscisic acid signaling in response to water stress in Arabidopsis. *Plant & Cell Physiology*, 50(12), 2123-2132.

Fujita, Y., Yoshida, T., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2013). Pivotal role of the AREB/ABF-SnRK2 pathway in ABRE-mediated transcription in response to osmotic stress in plants. *Physiologia Plantarum*, 147(1), 15-27.

Furukawa, K., Yoshimi, A., Furukawa, T., Hoshi, Y., Hagiwara, D., Sato, N., Fujioka, T., Mizutani, O., Mizuno, T., Kobayashi, T., & Abe, K. (2007). Novel reporter gene expression systems for monitoring activation of the *Aspergillus nidulans* HOG pathway. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 71(7), 1724-1730.

G

Galperin, M. Y. (2006). Structural classification of bacterial response regulators: diversity of output domains and domain combinations. *Journal of Bacteriology*, 188(12), 4169-4182.

Galperin, M. Y. (2010). Diversity of structure and function of response regulator output domains. *Current Opinion in Microbiology*, 13(2), 150-159.

Gao, R., & Stock, A. M. (2009). Biological Insights from Structures of Two-Component Proteins. *Annual review of microbiology*, 63, 133-154.

Geiger, D., Scherzer, S., Mumm, P., Stange, A., Marten, I., Bauer, H., Ache, P., Matschi, S., Liese, A., Al-Rasheid, K. A. S., Romeis, T., & Hedrich, R. (2009). Activity of guard cell anion channel SLAC1 is controlled by drought-stress signaling kinase-phosphatase pair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(50), 21425-21430.

Georgellis, D., Kwon, O., & Lin, E. C. (2001). Quinones as the redox signal for the arc two-component system of bacteria. *Science (New York, N.Y.)*, 292(5525), 2314-2316.

Ghaemmaghami, S., Huh, W.-K., Bower, K., Howson, R. W., Belle, A., Dephoure, N., O'Shea, E. K., & Weissman, J. S. (2003). Global analysis of protein expression in yeast. *Nature*, 425(6959), 737-741.

Ghalambor, C. K., McKay, J. K., Carroll, S. P., & Reznick, D. N. (2007). Adaptive versus non-adaptive phenotypic plasticity and the potential for contemporary adaptation in new environments. *Functional Ecology*, 21(3), 394-407.

Ghanem, M. E., Albacete, A., Martínez-Andújar, C., Acosta, M., Romero-Aranda, R., Dodd, I. C., Lutts, S., & Pérez-Alfocea, F. (2008). Hormonal changes during salinity-induced leaf senescence in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Journal of Experimental Botany*, 59(11), 3039-3050.

Gianinazzi, S., Gollotte, A., Binet, M.-N., van Tuinen, D., Redecker, D., & Wipf, D. (2010). Agroecology: the key role of arbuscular mycorrhizas in ecosystem services. *Mycorrhiza*, 20(8), 519-530.

Gietz, R. D., Schiestl, R. H., Willems, A. R., & Woods, R. A. (1995). Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast (Chichester, England)*, 11(4),

Glynou, K., Ioannou, P. C., & Christopoulos, T. K. (2003). One-step purification and refolding of recombinant photoprotein aequorin by immobilized metal-ion affinity chromatography. *Protein Expression and Purification*, 27(2), 384-390.

Golldack, D., Lüking, I., & Yang, O. (2011). Plant tolerance to drought and salinity: stress regulating transcription factors and their functional significance in the cellular transcriptional network. *Plant Cell Reports*, 30(8), 1383-1391.

Guo, D., Liang, J., Qiao, Y., Yan, Y., Li, L., & Dai, Y. (2012). Involvement of G1-to-S transition and AhAUX-dependent auxin transport in abscisic acid-induced inhibition of lateral root primordia initiation in *Arachis hypogaea* L. *Journal of Plant Physiology*, 169(11), 1102-1111.

Guo, J., Yang, X., Weston, D. J., & Chen, J.-G. (2011). Abscisic Acid Receptors: Past, Present and Future. *Journal of Integrative Plant Biology*, 53(6), 469-479.

Gupta, S., & Rashotte, A. (2012). Down-stream components of cytokinin signaling and the role of cytokinin throughout the plant. *Plant cell reports*, 31, 801-812.

II

Ha, S., Vankova, R., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., & Tran, L.-S. P. (2012). Cytokinins: metabolism and function in plant adaptation to environmental stresses. *Trends in Plant Science*, 17(3), 172-179.

Halpern, M., Bar-Tal, A., Ofek, M., Minz, D., Muller, T., & Yermiyahu, U. (2015). Chapter Two - The Use of Biostimulants for Enhancing Nutrient Uptake. In D. L. Sparks (Éd.), *Advances in Agronomy* (Vol. 130, p. 141-174). Academic Press.

Hamdi, K., Brini, F., Kharrat, N., Masmoudi, K., & Yakoubi, I. (2020). Abscisic Acid, Stress, and Ripening (*TtASR1*) Gene as a Functional Marker for Salt Tolerance in Durum Wheat. *BioMed Research International*, 2020, e7876357.

Hamel, C. (2007). *Mycorrhizae in Crop Production*. CRC Press.

Harper, S., & Speicher, D. W. (2008). Expression and purification of GST fusion proteins. *Current Protocols in Protein Science, Chapter 6, Unit 6.6*.

Harris, J. M. (2015). Abscisic Acid: Hidden Architect of Root System Structure. *Plants (Basel)*,

Switzerland), 4(3), 548-572.

Hartmann, H. T., Kester, D. E., & Davies, F. T. (1990). Plant propagation. Principles and practices. *Plant Propagation. Principles and Practices., Ed. 5.*

Haswell, E. S., & Verslues, P. E. (2015). The ongoing search for the molecular basis of plant osmosensing. *The Journal of General Physiology, 145*(5), 389-394.

Hauser, F., Waadt, R., & Schroeder, J. I. (2011). Evolution of Abscisic Acid Synthesis and Signaling Mechanisms. *Current Biology, 21*(9), R346-R355.

Hejátko, J., Pernisová, M., Eneva, T., Palme, K., & Brzobohatý, B. (2003). The putative sensor histidine kinase CK11 is involved in female gametophyte development in Arabidopsis. *Molecular Genetics and Genomics: MGG, 269*(4), 443-453.

Hejátko, J., Ryu, H., Kim, G.-T., Dobesová, R., Choi, S., Choi, S. M., Soucek, P., Horák, J., Pekárová, B., Palme, K., Brzobohatý, B., & Hwang, I. (2009). The histidine kinases CYTOKININ-INDEPENDENT1 and ARABIDOPSIS HISTIDINE KINASE2 and 3 regulate vascular tissue development in Arabidopsis shoots. *The Plant Cell, 21*(7), 2008-2021.

Héricourt, F., Cheddor, F., Bertheau, L., Tanigawa, M., Maeda, T., Guirimand, G., Courdavault, V., Larcher, M., Depierreux, C., Bénédicti, H., Morabito, D., Brignolas, F., & Carpin, S. (2013). Characterization of histidine-aspartate kinase HK1 and identification of histidine phosphotransfer proteins as potential partners in a Populus multistep phosphorelay. *Physiologia Plantarum, 149*(2), 188-199.

Héricourt, F., Cheddor, F., Djeghdir, I., Larcher, M., Lafontaine, F., Courdavault, V., Auguin, D., Coste, F., Depierreux, C., Tanigawa, M., Maeda, T., Glévarec, G., & Carpin, S. (2016). Functional Divergence of Poplar Histidine-Aspartate Kinase HK1 Paralogs in Response to Osmotic Stress. *International Journal of Molecular Sciences, 17*(12), 2061.

Héricourt, F., Larcher, M., Cheddor, F., Koudounas, K., Carqueijeiro, I., Lemos Cruz, P., Courdavault, V., Tanigawa, M., Maeda, T., Depierreux, C., Lamblin, F., Glévarec, G., & Carpin, S. (2019). New Insight into HPTs as Hubs in Poplar Cytokinin and Osmosensing Multistep Phosphorelays: Cytokinin Pathway Uses Specific HPTs. *Plants, 8*(12), 591.

Hetherington, A. M. (2001). Guard Cell Signaling. *Cell, 107*(6), 711-714.

Heyl, A., Riefler, M., Romanov, G. A., & Schmölling, T. (2012). Properties, functions and evolution of cytokinin receptors. *European Journal of Cell Biology, 91*(4), 246-256.

Higuchi, M., Pischke, M. S., Mähönen, A. P., Miyawaki, K., Hashimoto, Y., Seki, M., Kobayashi, M., Shinozaki, K., Kato, T., Tabata, S., Helariutta, Y., Sussman, M. R., & Kakimoto, T. (2004). In planta functions of the Arabidopsis cytokinin receptor family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 101*(23), 8821-8826.

Hoch, J. A. (2000). Two-component and phosphorelay signal transduction. *Current Opinion in Microbiology*, 3(2), 165-170.

Hohmann, S. (2002). Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 66(2), 300-372.

Hothorn, M., Dabi, T., & Chory, J. (2011). Structural basis for cytokinin recognition by *Arabidopsis thaliana* histidine kinase 4. *Nature chemical biology*, 7(11), 766-768.

Hsing, W., & Silhavy, T. J. (1997). Function of conserved histidine-243 in phosphatase activity of EnvZ, the sensor for porin osmoregulation in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 179(11), 3729-3735.

Hutchison, C. E., Li, J., Argueso, C., Gonzalez, M., Lee, E., Lewis, M. W., Maxwell, B. B., Perdue, T. D., Schaller, G. E., Alonso, J. M., Ecker, J. R., & Kieber, J. J. (2006). The *Arabidopsis* histidine phosphotransfer proteins are redundant positive regulators of cytokinin signaling. *The Plant Cell*, 18(11), 3073-3087.

Hwang, I., Chen, H.-C., & Sheen, J. (2002). Two-component signal transduction pathways in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 129(2), 500-515.

Hwang, I., & Sheen, J. (2001). Two-component circuitry in *Arabidopsis* cytokinin signal transduction. *Nature*, 413(6854), 383-389.

I

Idris, E. E., Iglesias, D. J., Talon, M., & Borriss, R. (2007). Tryptophan-Dependent Production of Indole-3-Acetic Acid (IAA) Affects Level of Plant Growth Promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Molecular Plant-Microbe Interactions*[®], 20(6), 619-626.

Imamura, A., Kiba, T., Tajima, Y., Yamashino, T., & Mizuno, T. (2003). In vivo and in vitro characterization of the ARR11 response regulator implicated in the His-to-Asp phosphorelay signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. *Plant & Cell Physiology*, 44(2), 122-131.

Inoue, T., Higuchi, M., Hashimoto, Y., Seki, M., Kobayashi, M., Kato, T., Tabata, S., Shinozaki, K., & Kakimoto, T. (2001). Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*. *Nature*, 409(6823), 1060-1063.

Ishida, K., Niwa, Y., Yamashino, T., & Mizuno, T. (2009). A genome-wide compilation of the two-component systems in *Lotus japonicus*. *DNA Research: An International Journal for Rapid Publication of Reports on Genes and Genomes*, 16(4), 237-247.

Ishida, K., Yamashino, T., Nakanishi, H., & Mizuno, T. (2010). Classification of the genes involved in the two-component system of the moss *Physcomitrella patens*. *Bioscience*,

Biotechnology, and Biochemistry, 74(12), 2542-2545.

J

Jansson, S., & Douglas, C. J. (2007). Populus: a model system for plant biology. *Annual Review of Plant Biology*, 58, 435-458.

K

Kang, N. Y., Cho, C., & Kim, J. (2013). Inducible expression of Arabidopsis response regulator 22 (ARR22), a type-C ARR, in transgenic Arabidopsis enhances drought and freezing tolerance. *PloS One*, 8(11), e79248.

Karan, R., Singla-Pareek, S. L., & Pareek, A. (2009). Histidine kinase and response regulator genes as they relate to salinity tolerance in rice. *Functional & Integrative Genomics*, 9(3), 411-417.

Kauffman, G. L., Kneivel, D. P., & Watschke, T. L. (2007). Effects of a Biostimulant on the Heat Tolerance Associated with Photosynthetic Capacity, Membrane Thermostability, and Polyphenol Production of Perennial Ryegrass. *Crop Science*, 47(1), 261-267.

Khan, A., Sovero, V., & Gemenet, D. (2016). Genome-assisted Breeding For Drought Resistance. *Current Genomics*, 17(4), 330-342.

Khan, W., Rayirath, U. P., Subramanian, S., Jithesh, M. N., Rayorath, P., Hodges, D. M., Critchley, A. T., Craigie, J. S., Norrie, J., & Prithviraj, B. (2009). Seaweed Extracts as Biostimulants of Plant Growth and Development. *Journal of Plant Growth Regulation*, 28(4), 386-399.

Kim, J., Oh, J., & Sung, G.-H. (2016). Regulation of MAP kinase Hog1 by calmodulin during hyperosmotic stress. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1863(11), 2551-2559.

Kim, T.-H., Böhmer, M., Hu, H., Nishimura, N., & Schroeder, J. I. (2010). Guard Cell Signal Transduction Network: Advances in Understanding Abscisic Acid, CO₂, and Ca²⁺ Signaling. *Annual Review of Plant Biology*, 61(1), 561-591.

Klingler, J. P., 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.

Kondo, T., Sawa, S., Kinoshita, A., Mizuno, S., Kakimoto, T., Fukuda, H., & Sakagami, Y. (2006). A plant peptide encoded by CLV3 identified by in situ MALDI-TOF MS analysis. *Science (New York, N.Y.)*, 313(5788), 845-848.

Kooyers, N. J. (2015). The evolution of drought escape and avoidance in natural herbaceous

populations. *Plant Science: An International Journal of Experimental Plant Biology*, 234, 155-162.

Köppl, C., Lingg, N., Fischer, A., Kröß, C., Loibl, J., Buchinger, W., Schneider, R., Jungbauer, A., Striedner, G., & Cserjan-Puschmann, M. (2022). Fusion Tag Design Influences Soluble Recombinant Protein Production in *Escherichia coli*. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(14), 7678.

Krantz, M., Becit, E., & Hohmann, S. (2006). Comparative analysis of HOG pathway proteins to generate hypotheses for functional analysis. *Current Genetics*, 49(3), 152-165.

Kumar, M. N., Jane, W.-N., & Verslues, P. E. (2013). Role of the putative osmosensor *Arabidopsis* histidine kinase1 in dehydration avoidance and low-water-potential response. *Plant Physiology*, 161(2), 942-953.

Kuppu, S., Mishra, N., Hu, R., Sun, L., Zhu, X., Shen, G., Blumwald, E., Payton, P., & Zhang, H. (2013). Water-Deficit Inducible Expression of a Cytokinin Biosynthetic Gene IPT Improves Drought Tolerance in Cotton. *PLOS ONE*, 8(5), e64190.

Kweon, D.-H., Lee, D.-H., Han, N.-S., & Seo, J.-H. (2004). Solid-phase refolding of cyclodextrin glycosyltransferase adsorbed on cation-exchange resin. *Biotechnology Progress*, 20(1), 277-283.

L

Lakehal, A., & Bellini, C. (2019). Control of adventitious root formation: insights into synergistic and antagonistic hormonal interactions. *Physiologia Plantarum*, 165(1), 90-100.

Le, D. T., Nishiyama, R., Watanabe, Y., Mochida, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., & Tran, L.-S. P. (2011). Genome-wide expression profiling of soybean two-component system genes in soybean root and shoot tissues under dehydration stress. *DNA Research: An International Journal for Rapid Publication of Reports on Genes and Genomes*, 18(1), 17-29.

Lee, K. H., Piao, H. L., Kim, H.-Y., Choi, S. M., Jiang, F., Hartung, W., Hwang, I., Kwak, J. M., Lee, I.-J., & Hwang, I. (2006). Activation of Glucosidase via Stress-Induced Polymerization Rapidly Increases Active Pools of Abscisic Acid. *Cell*, 126(6), 1109-1120.

Lemanceau, P., Blouin, M., Muller, D., & Moëgne-Loccoz, Y. (2017). Let the Core Microbiota Be Functional. *Trends in Plant Science*, 22(7), 583-595.

Levitt, J. (1980). *Responses of plants to environmental stresses / J. Levitt*. (Second edition.). Academic Press.

Li, S.-M., Zheng, H.-X., Zhang, X.-S., & Sui, N. (2021). Cytokinins as central regulators during

plant growth and stress response. *Plant Cell Reports*, 40(2), 271-282.

Li, W., Herrera-Estrella, L., & Tran, L.-S. P. (2016). The Yin-Yang of Cytokinin Homeostasis and Drought Acclimation/Adaptation. *Trends in Plant Science*, 21(7), 548-550.

Lilie, H., Schwarz, E., & Rudolph, R. (1998). Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*. *Current Opinion in Biotechnology*, 9(5), 497-501.

Liu, X., Wang, Z., Wang, W., Huang, Q., Zeng, Y., Jin, Y., Li, H., Du, S., & Zhang, J. (2022). Origin and evolutionary history of *Populus* (Salicaceae): Further insights based on time divergence and biogeographic analysis. *Frontiers in Plant Science*, 13.

Liu, X., Yue, Y., Li, B., Nie, Y., Li, W., Wu, W.-H., & Ma, L. (2007). A G protein-coupled receptor is a plasma membrane receptor for the plant hormone abscisic acid. *Science (New York, N.Y.)*, 315(5819), 1712-1716.

Liu, Y. C., Machuca, M. A., Beckham, S. A., Gunzburg, M. J., & Roujeinikova, A. (2015). Structural basis for amino-acid recognition and transmembrane signalling by tandem Per-Arnt-Sim (tandem PAS) chemoreceptor sensory domains. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 71(10), 2127-2136.

Looger, L. L., Dwyer, M. A., Smith, J. J., & Hellinga, H. W. (2003). Computational design of receptor and sensor proteins with novel functions. *Nature*, 423(6936), 185-190.

M

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 (New York, N.Y.)*, 324(5930), 1064-1068.

Macková, H., Hronková, M., Dobrá, J., Turečková, V., Novák, O., Lubovská, Z., Motyka, V., Haisel, D., Hájek, T., Prášil, I. T., Gaudinová, A., Štorchová, H., Ge, E., Werner, T., Schmülling, T., & Vanková, R. (2013). Enhanced drought and heat stress tolerance of tobacco plants with ectopically enhanced cytokinin oxidase/dehydrogenase gene expression. *Journal of Experimental Botany*, 64(10), 2805-2815.

Maeda, T., Wurgler-Murphy, S. M., & Saito, H. (1994). A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature*, 369(6477), 242-245.

Mähönen, A. P., Bishopp, A., Higuchi, M., Nieminen, K. M., Kinoshita, K., Törmäkangas, K., Ikeda, Y., Oka, A., Kakimoto, T., & Helariutta, Y. (2006). Cytokinin signaling and its inhibitor AHP6 regulate cell fate during vascular development. *Science (New York, N.Y.)*, 311(5757), 94-98.

- Manabe, S., & Wetherald, R. T. (1967). Thermal Equilibrium of the Atmosphere with a Given Distribution of Relative Humidity. *Journal of Atmospheric Sciences*, 24, 241-259.
- Mascher, T. (2006). Intramembrane-sensing histidine kinases: a new family of cell envelope stress sensors in Firmicutes bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 264(2), 133-144.
- Mason, M. G., Mathews, D. E., Argyros, D. A., Maxwell, B. B., Kieber, J. J., Alonso, J. M., Ecker, J. R., & Schaller, G. E. (2005). Multiple type-B response regulators mediate cytokinin signal transduction in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 17(11), 3007-3018.
- Matsushika, A., Imamura, A., Yamashino, T., & Mizuno, T. (2002). Aberrant expression of the light-inducible and circadian-regulated APRR9 gene belonging to the circadian-associated APRR1/TOC1 quintet results in the phenotype of early flowering in Arabidopsis thaliana. *Plant & Cell Physiology*, 43(8), 833-843.
- Mattanovich, D., Branduardi, P., Dato, L., Gasser, B., Sauer, M., & Porro, D. (2012). Recombinant protein production in yeasts. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 824, 329-358.
- Maurya, S., Rai, V. H., Upasani, A., Umrao, S., Parwana, D., & Roy, R. (2022). Single-Molecule Diffusion and Assembly on Polymer-Crowded Lipid Membranes. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, 185, e64243.
- McKenney, D. W., Yemshanov, D., Fox, G., & Ramlal, E. (2004). Cost estimates for carbon sequestration from fast growing poplar plantations in Canada. *Forest Policy and Economics*, 6(3-4).
- Miermont, A., Uhlenendorf, J., McClean, M., & Hersen, P. (2011). The Dynamical Systems Properties of the HOG Signaling Cascade. *Journal of Signal Transduction*, 2011, 930940.
- Miller, C. O., Skoog, F., Okumura, F. S., Von Saltza, M. H., & Strong, F. M. (1956). Isolation, Structure and Synthesis of Kinetin, a Substance Promoting Cell Division^{1,2}. *Journal of the American Chemical Society*, 78(7), 1375-1380.
- Mira-Rodado, V. (2019). New Insights into Multistep-Phosphorelay (MSP)/ Two-Component System (TCS) Regulation: Are Plants and Bacteria that Different? *Plants (Basel, Switzerland)*, 8(12), 590.
- Mira-Rodado, V., Veerabagu, M., Witthöft, J., Teply, J., Harter, K., & Desikan, R. (2012). Identification of two-component system elements downstream of AHK5 in the stomatal closure response of Arabidopsis thaliana. *Plant Signaling & Behavior*, 7(11), 1467-1476.
- Mishra, A. K., & Singh, V. P. (2010). A review of drought concepts. *Journal of Hydrology*, 391(1), 202-216.

Mittler, R., Finka, A., & Goloubinoff, P. (2012). How do plants feel the heat? *Trends in Biochemical Sciences*, 37(3), 118-125.

Mitton, J. B., & Grant, M. C. (1996). Genetic Variation and the Natural History of Quaking Aspen: The ways in which aspen reproduces underlie its great geographic range, high levels of genetic variability, and persistence. *BioScience*, 46(1), 25-31.

Miwa, K., Ishikawa, K., Terada, K., Yamada, H., Suzuki, T., Yamashino, T., & Mizuno, T. (2007). Identification of amino acid substitutions that render the Arabidopsis cytokinin receptor histidine kinase AHK4 constitutively active. *Plant & Cell Physiology*, 48(12), 1809-1814.

Miyakawa, T., Fujita, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Tanokura, M. (2013). Structure and function of abscisic acid receptors. *Trends in Plant Science*, 18(5), 259-266.

Miyata, S., Urao, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (1998). Characterization of genes for two-component phosphorelay mediators with a single HPT domain in Arabidopsis thaliana. *FEBS Letters*, 437(1-2), 11-14.

Mizuno, T. (2004). Plant response regulators implicated in signal transduction and circadian rhythm. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(5), 499-505.

Morabito, D., Caruso, A., Carpin, S., Carli, C., Laurans, F., Depierreux, C., Kahlem, G., & Label, P. (2011). Cambial activity of Populus tremulax Populus alba clone 717-1B4 in hydroponic culture. *Canadian Journal of Forest Research*, 36.

Münch, C., & Bertolotti, A. (2010). Exposure of Hydrophobic Surfaces Initiates Aggregation of Diverse ALS-Causing Superoxide Dismutase-1 Mutants. *Journal of Molecular Biology*, 399(3-3), 512-525.

Munns, R. (2002). Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell & Environment*, 25(2), 239-250.

N

Nakashima, K., Fujita, Y., Kanamori, N., Katagiri, T., Umezawa, T., Kidokoro, S., Maruyama, K., Yoshida, T., Ishiyama, K., Kobayashi, M., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2009). Three Arabidopsis SnRK2 Protein Kinases, SRK2D/SnRK2.2, SRK2E/SnRK2.6/OST1 and SRK2I/SnRK2.3, Involved in ABA Signaling are Essential for the Control of Seed Development and Dormancy. *Plant and Cell Physiology*, 50(7), 1345-1363.

Nambara, E., & Marion-Poll, A. (2005). Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annual Review of Plant Biology*, 56, 165-185.

Nehela, Y., Taha, N. A., Elzaawely, A. A., Xuan, T. D., A. Amin, M., Ahmed, M. E., & El-Nagar, A.

(2021). Benzoic Acid and Its Hydroxylated Derivatives Suppress Early Blight of Tomato (*Alternaria solani*) via the Induction of Salicylic Acid Biosynthesis and Enzymatic and Nonenzymatic Antioxidant Defense Machinery. *Journal of Fungi*, 7(8), 663.

Nguyen, K. H., Ha, C. V., Nishiyama, R., Watanabe, Y., Leyva-González, M. A., Fujita, Y., Tran, U. T., Li, W., Tanaka, M., Seki, M., Schaller, G. E., Herrera-Estrella, L., & Tran, L. S. (2016). Arabidopsis type B cytokinin response regulators ARR1, ARR10, and ARR12 negatively regulate plant responses to drought. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(11), 3090-3095.

Nguyen, M. L., Glaes, J., Spaepen, S., Bodson, B., du Jardin, P., & Delaplace, P. (2019). Biostimulant effects of Bacillus strains on wheat from in vitro towards field conditions are modulated by nitrogen supply. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 182(3), 325-334.

Nicotra, A. B., Atkin, O. K., Bonser, S. P., Davidson, A. M., Finnegan, E. J., Mathesius, U., Poot, P., Purugganan, M. D., Richards, C. L., Valladares, F., & van Kleunen, M. (2010). Plant phenotypic plasticity in a changing climate. *Trends in Plant Science*, 15(12), 684-692.

Niinemets, Ü. (2001). Global-Scale Climatic Controls of Leaf Dry Mass Per Area, Density, and Thickness in Trees and Shrubs. *Ecology*, 82(2), 453-469.

Nikolić, N., Zorić, L., Cvetković, I., Pajević, S., Borišev, M., Orlović, S., & Pilipović, A. (2017). Assessment of cadmium tolerance and phytoextraction ability in young *Populus deltoides* L. and *Populus × euramericana* plants through morpho-anatomical and physiological responses to growth in cadmium enriched soil. *IForest - Biogeosciences and Forestry*, 10(3), 635.

Nishimura, C., Ohashi, Y., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., & Ueguchi, C. (2004). Histidine Kinase Homologs That Act as Cytokinin Receptors Possess Overlapping Functions in the Regulation of Shoot and Root Growth in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 16(6), 1365-1377.

Nishiyama, R., Watanabe, Y., Fujita, Y., Le, D. T., Kojima, M., Werner, T., Vankova, R., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., Kakimoto, T., Sakakibara, H., Schmölling, T., & Tran, L.-S. P. (2011). Analysis of cytokinin mutants and regulation of cytokinin metabolic genes reveals important regulatory roles of cytokinins in drought, salt and abscisic acid responses, and abscisic acid biosynthesis. *The Plant Cell*, 23(6), 2169-2183.

Nishiyama, R., Watanabe, Y., Leyva-Gonzalez, M. A., Ha, C. V., Fujita, Y., Tanaka, M., Seki, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., Herrera-Estrella, L., & Tran, L.-S. P. (2013). Arabidopsis AHP2, AHP3, and AHP5 histidine phosphotransfer proteins function as redundant negative regulators of drought stress response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(12), 4840-4845.

Nongpiur, R., Soni, P., Karan, R., Singla-Pareek, S. L., & Pareek, A. (2012). Histidine kinases in plants. *Plant Signaling & Behavior*, 7(10), 1230-1237.

●

Olivares, F. L., Aguiar, N. O., Rosa, R. C. C., & Canellas, L. P. (2015). Substrate biofortification in combination with foliar sprays of plant growth promoting bacteria and humic substances boosts production of organic tomatoes. *Scientia Horticulturae*, *183*, 100-108.

O'Rourke, S. M., & Herskowitz, I. (2004). Unique and Redundant Roles for HOG MAPK Pathway Components as Revealed by Whole-Genome Expression Analysis. *Molecular Biology of the Cell*, *15*(2), 532-542.

Osmolovskaya, N., Shumilina, J., Kim, A., Didio, A., Grishina, T., Bilova, T., Keltsieva, O. A., Zhukov, V., Tikhonovich, I., Tarakhovskaya, E., Frolov, A., & Wessjohann, L. A. (2018). Methodology of Drought Stress Research: Experimental Setup and Physiological Characterization. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(12), 4089.

P

Pandey, P., Ramegowda, V., & Senthil-Kumar, M. (2015). Shared and unique responses of plants to multiple individual stresses and stress combinations: physiological and molecular mechanisms. *Frontiers in Plant Science*, *6*.

Pandey, S., Nelson, D. C., & Assmann, S. M. (2009). Two Novel GPCR-Type G Proteins Are Abscisic Acid Receptors in Arabidopsis. *Cell*, *136*(1), 136-148.

Papon, N., Clastre, M., Andreu, F., Gantet, P., Rideau, M., & Crèche, J. (2002). Expression analysis in plant and cell suspensions of CrCKR1, a cDNA encoding a histidine kinase receptor homologue in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Journal of Experimental Botany*, *53*(376), 1989-1990.

Parađiković, N., Teklić, T., Svjetlana, Z., Lisjak, M., & Špoljarević, M. (2018). Biostimulants research in some horticultural plant species—A review. *Food and Energy Security*, *8*.

Pareek, A., Singh, A., Kumar, M., Kushwaha, H. R., Lynn, A. M., & Singla-Pareek, S. L. (2006). Whole-genome analysis of *Oryza sativa* reveals similar architecture of two-component signaling machinery with Arabidopsis. *Plant Physiology*, *142*(2), 380-397.

Passioura, J. (2007). The drought environment: physical, biological and agricultural perspectives. *Journal of Experimental Botany*, *58*(2), 113-117.

Patra, A. K., Mukhopadhyay, R., Mukhija, R., Krishnan, A., Garg, L. C., & Panda, A. K. (2000). Optimization of inclusion body solubilization and renaturation of recombinant human growth hormone from *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, *18*(2), 182-192.

Pavlů, J., Novák, J., Koukalová, V., Luklová, M., Brzobohatý, B., & Černý, M. (2018). Cytokinin

at the Crossroads of Abiotic Stress Signalling Pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(8), 2450.

Pekárová, B., Szmitkowska, A., Dopitová, R., Degtjarik, O., Žídek, L., & Hejátko, J. (2016). Structural Aspects of Multistep Phosphorelay-Mediated Signaling in Plants. *Molecular Plant*, 9(1), 71-85.

Peleg, Z., Reguera, M., Tumimbang, E., Walia, H., & Blumwald, E. (2011). Cytokinin-mediated source/sink modifications improve drought tolerance and increase grain yield in rice under water-stress. *Plant Biotechnology Journal*, 9(7), 747-758.

Peters, E. (2003). *Propagation of drought through groundwater systems : illustrated in the Pang (UK) and Upper-Guadiana (ES) catchments*.

Pils, B., & Heyl, A. (2009). Unraveling the evolution of cytokinin signaling. *Plant Physiology*, 151(2), 782-791.

Pischke, M. S., Jones, L. G., Otsuga, D., Fernandez, D. E., Drews, G. N., & Sussman, M. R. (2002). An Arabidopsis histidine kinase is essential for megagametogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(24), 15800-15805.

Polo, J., & Mata, P. (2017). Evaluation of a Biostimulant (Pepton) Based in Enzymatic Hydrolyzed Animal Protein in Comparison to Seaweed Extracts on Root Development, Vegetative Growth, Flowering, and Yield of Gold Cherry Tomatoes Grown under Low Stress Ambient Field Conditions. *Frontiers in Plant Science*, 8, 2261.

Poorter, H., Niklas, K. J., Reich, P. B., Oleksyn, J., Poot, P., & Mommer, L. (2012). Biomass allocation to leaves, stems and roots: meta-analyses of interspecific variation and environmental control. *New Phytologist*, 193(1), 30-50.

Posas, F., Takekawa, M., & Saito, H. (1998). Signal transduction by MAP kinase cascades in budding yeast. *Current Opinion in Microbiology*, 1(2), 175-182.

Posas, F., Wurgler-Murphy, S. M., Maeda, T., Witten, E. A., Thai, T. C., & Saito, H. (1996). Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 « two-component » osmosensor. *Cell*, 86(6), 865-875.

Pospíšilová, J., & Bařková, P. (2004). Effects of Pre-Treatments with Abscisic Acid and/or Benzyladenine on Gas Exchange of French Bean, Sugar Beet, and Maize Leaves During Water Stress and After Rehydration. *Biologia Plantarum*, 48(3), 395-399.

Puletti, N., Grotti, M., & Scotti, R. (2019). Evaluating the Eccentricities of Poplar Stem Profiles with Terrestrial Laser Scanning. *Forests*, 10(3), 239.

Q

Qi, X., Sun, Y., & Xiong, S. (2015). A single freeze-thawing cycle for highly efficient solubilization of inclusion body proteins and its refolding into bioactive form. *Microbial Cell Factories*, *14*.

Qin, H., Gu, Q., Zhang, J., Sun, L., Kuppu, S., Zhang, Y., Burow, M., Payton, P., Blumwald, E., & Zhang, H. (2011). Regulated expression of an isopentenyltransferase gene (IPT) in peanut significantly improves drought tolerance and increases yield under field conditions. *Plant & Cell Physiology*, *52*(11), 1904-1914.

R

Rafique, M., Naveed, M., Mustafa, A., Akhtar, S., Munawar, M., Kaukab, S., Ali, H. M., Siddiqui, M. H., & Salem, M. Z. M. (2021). The Combined Effects of Gibberellic Acid and Rhizobium on Growth, Yield and Nutritional Status in Chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Agronomy*, *11*(1), 105.

Rajjou, L., Belghazi, M., Huguet, R., Robin, C., Moreau, A., Job, C., & Job, D. (2006). Proteomic investigation of the effect of salicylic acid on Arabidopsis seed germination and establishment of early defense mechanisms. *Plant Physiology*, *141*(3), 910-923.

Rakhi, R. B., Nayak, P., Xia, C., & Alshareef, H. N. (2016). Novel amperometric glucose biosensor based on MXene nanocomposite. *Scientific Reports*, *6*, 36422.

Reed, R. H., Chudek, J. A., Foster, R., & Gadd, G. M. (1987). Osmotic significance of glycerol accumulation in exponentially growing yeasts. *Applied and Environmental Microbiology*, *53*(9), 2119-2123.

Reiser, V., Raitt, D. C., & Saito, H. (2003). Yeast osmosensor Sln1 and plant cytokinin receptor Cre1 respond to changes in turgor pressure. *The Journal of Cell Biology*, *161*(6), 1035-1040.

Ricci, M., Tilbury, L., Daridon, B., & Sukalac, K. (2019). General Principles to Justify Plant Biostimulant Claims. *Frontiers in Plant Science*, *10*.

Rinne, P., Welling, A., & Kaikuranta, P. (1998). Onset of freezing tolerance in birch (*Betula pubescens* Ehrh.) involves LEA proteins and osmoregulation and is impaired in an ABA-deficient genotype. *Plant, Cell & Environment*, *24*(6), 617-627.

Rivero, R. M., Kojima, M., Gepstein, A., Sakakibara, H., Mittler, R., Gepstein, S., & Blumwald, E. (2007). Delayed leaf senescence induces extreme drought tolerance in a flowering plant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(49), 19631-19636.

Robert K. Scopes. (1994). *Protein purification*. Springer-Verlag.

Rochard, J. (2023). Arido-viticulture dans le contexte de changement climatique : concept, bases pratiques et exemples des vignobles de Lanzarote et Santorin. *BIO Web of Conferences*, 56.

Rogers, P. C., & McAvoy, D. J. (2018). Mule deer impede Pando's recovery: Implications for aspen resilience from a single-genotype forest. *PLoS ONE*, 13(10), e0203619.

Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 5.

Roychoudhury, A., Paul, S., & Basu, S. (2013). Cross-talk between abscisic acid-dependent and abscisic acid-independent pathways during abiotic stress. *Plant Cell Reports*, 32(7), 985-1006.

S

Saito, H., & Posas, F. (2012). Response to hyperosmotic stress. *Genetics*, 192(2), 289-318.

Sakai, H., Honma, T., Aoyama, T., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., & Oka, A. (2001). ARR1, a transcription factor for genes immediately responsive to cytokinins. *Science (New York, N.Y.)*, 294(5546), 1519-1521.

Sakakibara, H., Taniguchi, M., & Sugiyama, T. (2000). His-Asp phosphorelay signaling: a communication avenue between plants and their environment. *Plant Molecular Biology*, 42(2), 273-278.

Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), 5463-5467.

Sarthy, A. V., Schopp, C., & Idler, K. B. (1994). Cloning and sequence determination of the gene encoding sorbitol dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 140(1), 121-126.

Schaller, G. E., Shiu, S.-H., & Armitage, J. P. (2011). Two-Component Systems and Their Co-Option for Eukaryotic Signal Transduction. *Current Biology*, 21(9), R320-R330.

Schiavon, M., Pizzeghello, D., Muscolo, A., Vaccaro, S., Francioso, O., & Nardi, S. (2010). High Molecular Size Humic Substances Enhance Phenylpropanoid Metabolism in Maize (*Zea mays* L.). *Journal of Chemical Ecology*, 36(6), 662-669.

Schultz, J., Copley, R. R., Doerks, T., Ponting, C. P., & Bork, P. (2000). SMART: a web-based tool for the study of genetically mobile domains. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 231-234.

Seddon, A. M., Curnow, P., & Booth, P. J. (2004). Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1666(1-2), 105-117.

- Shah, A., Subramanian, S., & Smith, D. L. (2022). Flavonoids and Devosia sp SL43 cell-free supernatant increase early plant growth under salt stress and optimal growth conditions. *Frontiers in Plant Science*, *13*, 1030985.
- Shankarnarayan, S., Malone, C. L., Deschenes, R. J., & Fassler, J. S. (2008). Modulation of yeast Sln1 kinase activity by the CCW12 cell wall protein. *The Journal of Biological Chemistry*, *283*(4), 1962-1973.
- Sharp, R. E., & LeNoble, M. E. (2002). ABA, ethylene and the control of shoot and root growth under water stress. *Journal of Experimental Botany*, *53*(366), 33-37.
- Sharp, R. E., Poroyko, V., Hejlek, L. G., Spollen, W. G., Springer, G. K., Bohnert, H. J., & Nguyen, H. T. (2004). Root growth maintenance during water deficits: physiology to functional genomics. *Journal of Experimental Botany*, *55*(407), 2343-2351.
- Shen, Y.-Y., Wang, X.-F., Wu, F.-Q., Du, S.-Y., Cao, Z., Shang, Y., Wang, X.-L., Peng, C.-C., Yu, X.-C., Zhu, S.-Y., Fan, R.-C., Xu, Y.-H., & Zhang, D.-P. (2006). The Mg-chelatase H subunit is an abscisic acid receptor. *Nature*, *443*(7113), 823-826.
- Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (1997). Gene Expression and Signal Transduction in Water-Stress Response. *Plant Physiology*, *115*(2), 327-334.
- Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2007). Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, *58*(2), 221-227.
- Shu, K., Liu, X.-D., Xie, Q., & He, Z.-H. (2016). Two Faces of One Seed: Hormonal Regulation of Dormancy and Germination. *Molecular Plant*, *9*(1), 34-45.
- Singh, A., Upadhyay, V., Upadhyay, A. K., Singh, S. M., & Panda, A. K. (2015a). Protein recovery from inclusion bodies of Escherichia coli using mild solubilization process. *Microbial Cell Factories*, *14*(1), 41.
- Singh, A., Upadhyay, V., Upadhyay, A. K., Singh, S. M., & Panda, A. K. (2015b). Protein recovery from inclusion bodies of Escherichia coli using mild solubilization process. *Microbial Cell Factories*, *14*(1), 41.
- Singh, D., Gupta, P., Singla-Pareek, S. L., Siddique, K. H. M., & Pareek, A. (2021). The Journey from Two-Step to Multi-Step Phosphorelay Signaling Systems. *Current Genomics*, *22*(1), 59-74.
- Singh, S. M., & Panda, A. K. (2005). Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *99*(4), 303-310.
- Singh, S. M., Upadhyay, A. K., & Panda, A. K. (2008). Solubilization at high pH results in improved recovery of proteins from inclusion bodies of E. coli. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, *83*(8), 1126-1134.

Sirichandra, C., Gu, D., Hu, H.-C., Davanture, M., Lee, S., Djaoui, M., Valot, B., Zivy, M., Leung, J., Merlot, S., & Kwak, J. M. (2009). Phosphorylation of the Arabidopsis AtrbohF NADPH oxidase by OST1 protein kinase. *FEBS Letters*, *583*(18), 2982-2986.

Skalak, J., Nicolas, K. L., Vankova, R., & Hejatko, J. (2021). Signal Integration in Plant Abiotic Stress Responses via Multistep Phosphorelay Signaling. *Frontiers in Plant Science*, *12*, 644823.

Skirycz, A., & Inzé, D. (2010). More from less: plant growth under limited water. *Current Opinion in Biotechnology*, *21*(2), 197-203.

Spollen, W. G., LeNoble, M. E., Samuels, T. D., Bernstein, N., & Sharp, R. E. (2000). Abscisic acid accumulation maintains maize primary root elongation at low water potentials by restricting ethylene production. *Plant Physiology*, *122*(3), 967-976.

Stevens, R. C., Cherezov, V., Katritch, V., Abagyan, R., Kuhn, P., Rosen, H., & Wüthrich, K. (2013). GPCR Network: a large-scale collaboration on GPCR structure and function. *Nature reviews. Drug discovery*, *12*(1), 25-34.

Stevenson, F. J. (1994). *Humus chemistry: Genesis, composition, reactions*. John Wiley & Sons.

Stock, A. M., Robinson, V. L., & Goudreau, P. N. (2000). Two-component signal transduction. *Annual Review of Biochemistry*, *69*, 183-215.

Strayer, C., Oyama, T., Schultz, T. F., Raman, R., Somers, D. E., Más, P., Panda, S., Kreps, J. A., & Kay, S. A. (2000). Cloning of the Arabidopsis clock gene TOC1, an autoregulatory response regulator homolog. *Science (New York, N.Y.)*, *289*(5480), 768-771.

Studier, F. W. (2005). Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expression and Purification*, *41*(1), 207-234.

Sugawara, H., Kawano, Y., Hatakeyama, T., Yamaya, T., Kamiya, N., & Sakakibara, H. (2005). Crystal structure of the histidine-containing phosphotransfer protein ZmHP2 from maize. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, *14*(1), 202-208.

Sugawara, H., Yamaya, T., & Sakakibara, H. (2005). Crystallization and preliminary X-ray diffraction study of the histidine-containing phosphotransfer protein ZmHP1 from maize. *Acta Crystallographica. Section F, Structural Biology and Crystallization Communications*, *61*(Pt 4), 366-368.

Suzuki, T., Miwa, K., Ishikawa, K., Yamada, H., Aiba, H., & Mizuno, T. (2001). The Arabidopsis Sensor His-kinase, AHK4, Can Respond to Cytokinins. *Plant and Cell Physiology*, *42*(2), 107-113.

Suzuki, T., Sakurai, K., Imamura, A., Nakamura, A., Ueguchi, C., & Mizuno, T. (2000). Compilation and characterization of histidine-containing phosphotransmitters implicated in His-to-Asp phosphorelay in plants: AHP signal transducers of Arabidopsis thaliana. *Bioscience*,

Biotechnology, and Biochemistry, 64(11), 2486-2489.

Swartz, J. R. (2001). Advances in Escherichia coli production of therapeutic proteins. *Current Opinion in Biotechnology*, 12(2), 195-201.

T

Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I. M., & Murphy, A. (2015). Plant physiology and development. *Plant Physiology and Development.*, Ed. 6.

Takezawa, D., Komatsu, K., & Sakata, Y. (2011). ABA in bryophytes: how a universal growth regulator in life became a plant hormone? *Journal of Plant Research*, 124(4), 437-453.

Tallaksen, L., & Lanen, H. A. J. van. (2004). *Hydrological drought. Processes and estimation methods for streamflow and groundwater*. Elsevier.

Tatebayashi, K., Tanaka, K., Yang, H.-Y., Yamamoto, K., Matsushita, Y., Tomida, T., Imai, M., & Saito, H. (2007). Transmembrane mucins Hkr1 and Msb2 are putative osmosensors in the SHO1 branch of yeast HOG pathway. *The EMBO Journal*, 26(15), 3521-3533.

TAYLOR, G. (2002). Populus: Arabidopsis for Forestry. Do We Need a Model Tree? *Annals of Botany*, 90(6), 681-689.

Thu, N. B. A., Hoang, X. L. T., Truc, M. T., Sulieman, S., Thao, N. P., & Tran, L.-S. P. (2017). Cytokinin Signaling in Plant Response to Abiotic Stresses. In *Mechanism of Plant Hormone Signaling under Stress* (p. 71-100). John Wiley & Sons, Ltd.

To, J. P. C., Haberer, G., Ferreira, F. J., Deruère, J., Mason, M. G., Schaller, G. E., Alonso, J. M., Ecker, J. R., & Kieber, J. J. (2004). Type-A Arabidopsis response regulators are partially redundant negative regulators of cytokinin signaling. *The Plant Cell*, 16(3), 658-671.

Tran, L.-S. P., Urao, T., Qin, F., Maruyama, K., Kakimoto, T., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2007). Functional analysis of AHK1/ATHK1 and cytokinin receptor histidine kinases in response to abscisic acid, drought, and salt stress in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(51), 20623-20628.

Trenberth, K. E., Dai, A., van der Schrier, G., Jones, P. D., Barichivich, J., Briffa, K. R., & Sheffield, J. (2014). Global warming and changes in drought. *Nature Climate Change*, 4(1), 17-22.

Trevisan, S., Francioso, O., Quaggiotti, S., & Nardi, S. (2010). Humic substances biological activity at the plant-soil interface: from environmental aspects to molecular factors. *Plant Signaling & Behavior*, 5(6), 635-643.

Tsumoto, K., Ejima, D., Kumagai, I., & Arakawa, T. (2003). Practical considerations in refolding

proteins from inclusion bodies. *Protein Expression and Purification*, 28(1), 1-8.

Tsunoda, Y., Sakai, N., Kikuchi, K., Katoh, S., Akagi, K., Miura-Ohnuma, J., Tashiro, Y., Murata, K., Shibuya, N., & Katoh, E. (2005). Improving expression and solubility of rice proteins produced as fusion proteins in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 42(2), 268-277.

Tuskan, G. A., Difazio, S., Jansson, S., Bohlmann, J., Grigoriev, I., Hellsten, U., Putnam, N., Ralph, S., Rombauts, S., Salamov, A., Schein, J., Sterck, L., Aerts, A., Bhalerao, R. R., Bhalerao, R. P., Blaudez, D., Boerjan, W., Brun, A., Brunner, A., ... Rokhsar, D. (2006). The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science (New York, N.Y.)*, 313(5793), 1596-1604.

U

Ueguchi, C., Sato, S., Kato, T., & Tabata, S. (2001). The AHK4 Gene Involved in the Cytokinin-Signaling Pathway as a Direct Receptor Molecule in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 42(7), 751-755.

Umezawa, T., Sugiyama, N., Mizoguchi, M., Hayashi, S., Myouga, F., Yamaguchi-Shinozaki, K., Ishihama, Y., Hirayama, T., & Shinozaki, K. (2009). Type 2C protein phosphatases directly regulate abscisic acid-activated protein kinases in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(41), 17588-17593.

Upadhyay, A. A., Fleetwood, A. D., Adebali, O., Finn, R. D., & Zhulin, I. B. (2016). Cache Domains That are Homologous to, but Different from PAS Domains Comprise the Largest Superfamily of Extracellular Sensors in Prokaryotes. *PLOS Computational Biology*, 12(4), e1004862.

Urao, T., Yakubov, B., Satoh, R., Yamaguchi-Shinozaki, K., Seki, M., Hirayama, T., & Shinozaki, K. (1999). A transmembrane hybrid-type histidine kinase in *Arabidopsis* functions as an osmosensor. *The Plant Cell*, 11(9), 1743-1754.

V

Vahisalu, T., Puzõrjova, I., Brosché, M., Valk, E., Lepiku, M., Moldau, H., Pechter, P., Wang, Y.-S., Lindgren, O., Salojärvi, J., Loog, M., Kangasjärvi, J., & Kollist, H. (2010). Ozone-triggered rapid stomatal response involves the production of reactive oxygen species, and is controlled by SLAC1 and OST1. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 62(3), 442-453.

Van Der Heijden, M. G. A., Streitwolf-Engel, R., Riedl, R., Siegrist, S., Neudecker, A., Ineichen, K., Boller, T., Wiemken, A., & Sanders, I. R. (2006). The mycorrhizal contribution to plant productivity, plant nutrition and soil structure in experimental grassland. *New Phytologist*, 172(4), 739-752.

Van Loon, A. F. (2015). Hydrological drought explained. *WIREs Water*, 2(4), 359-392.

Veerabagu, M., Kirchler, T., Elgass, K., Stadelhofer, B., Stahl, M., Harter, K., Mira-Rodado, V., & Chaban, C. (2014). The interaction of the Arabidopsis response regulator ARR18 with bZIP63 mediates the regulation of PROLINE DEHYDROGENASE expression. *Molecular Plant*, 7(10), 1560-1577.

Verslues, P. E., Agarwal, M., Katiyar-Agarwal, S., Zhu, J., & Zhu, J.-K. (2006). Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 45(4), 523-539.

W

Wadhams, G. H., & Armitage, J. P. (2004). Making sense of it all: bacterial chemotaxis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(12), 1024-1037.

Walawalkar, Y. D., Phadke, R., Noronha, S., Patankar, S., & Pillai, B. (2013). Engineering whole-cell biosensors to evaluate the effect of osmotic conditions on bacteria. *Annals of Microbiology*, 63(4), 1283-1290.

Wally, O. S. D., Critchley, A. T., Hiltz, D., Craigie, J. S., Han, X., Zaharia, L. I., Abrams, S. R., & Prithiviraj, B. (2013a). Erratum to: Regulation of Phytohormone Biosynthesis and Accumulation in Arabidopsis Following Treatment with Commercial Extract from the Marine Macroalga *Ascophyllum nodosum*. *Journal of Plant Growth Regulation*, 32(2), 340-341.

Wally, O. S. D., Critchley, A. T., Hiltz, D., Craigie, J. S., Han, X., Zaharia, L. I., Abrams, S. R., & Prithiviraj, B. (2013b). Regulation of Phytohormone Biosynthesis and Accumulation in Arabidopsis Following Treatment with Commercial Extract from the Marine Macroalga *Ascophyllum nodosum*. *Journal of Plant Growth Regulation*, 32(2), 324-339.

Wang, C., Liu, J., Wang, L., & Geng, X. (2008). Solubilization and Refolding with Simultaneous Purification of Recombinant Human Stem Cell Factor. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 144(2), 181-189.

Wang, X. F., & Zhang, D.-P. (2008). Abscisic Acid Receptors: Multiple Signal-perception Sites. *Annals of Botany*, 101(3), 311-317.

Wang, Y., Li, L., Ye, T., Lu, Y., Chen, X., & Wu, Y. (2013). The inhibitory effect of ABA on floral transition is mediated by ABI5 in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, 64(2), 675-684.

Webb, A. J., Kelwick, R., Doenhoff, M. J., Kylilis, N., MacDonald, J. T., Wen, K. Y., McKeown, C., Baldwin, G., Ellis, T., Jensen, K., & Freemont, P. S. (2016). A protease-based biosensor for the detection of schistosome cercariae. *Scientific Reports*, 6(1), 24725.

Werner, M. H., Clore, G. M., Gronenborn, A. M., Kondoh, A., & Fisher, R. J. (1994). Refolding proteins by gel filtration chromatography. *FEBS Letters*, *345*(2-3), 125-130.

Werner, T., Nehnevajova, E., Köllmer, I., Novák, O., Strnad, M., Krämer, U., & Schmölling, T. (2010). Root-specific reduction of cytokinin causes enhanced root growth, drought tolerance, and leaf mineral enrichment in *Arabidopsis* and tobacco. *The Plant Cell*, *22*(12), 3905-3920.

West, A. H., & Stock, A. M. (2001). Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends in Biochemical Sciences*, *26*(6), 369-376.

Wilhite, D., & Glantz, M. (1985). Understanding: the Drought Phenomenon: The Role of Definitions. *Water International - WATER INT*, *10*, 111-120.

Wood, J. M. (1999). Osmosensing by bacteria: signals and membrane-based sensors. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, *63*(1), 230-262.

Wuichet, K., Cantwell, B. J., & Zhulin, I. B. (2010). Evolution and phyletic distribution of two-component signal transduction systems. *Current Opinion in Microbiology*, *13*(2), 219-225.

Wullschleger, S. D., Jansson, S., & Taylor, G. (2002). Genomics and forest biology: *Populus* emerges as the perennial favorite. *The Plant Cell*, *14*(11), 2651-2655.

Wurgler-Murphy, S. M., & Saito, H. (1997). Two-component signal transducers and MAPK cascades. *Trends in Biochemical Sciences*, *22*(5), 172-176.

Y

Yakhin, O. I., Lubyantsev, A. A., Yakhin, I. A., & Brown, P. H. (2017). Biostimulants in Plant Science: A Global Perspective. *Frontiers in Plant Science*, *7*.

Yamada, H., Suzuki, T., Terada, K., Takei, K., Ishikawa, K., Miwa, K., Yamashino, T., & Mizuno, T. (2001). The *Arabidopsis* AHK4 histidine kinase is a cytokinin-binding receptor that transduces cytokinin signals across the membrane. *Plant & Cell Physiology*, *42*(9), 1017-1023.

Yancey, P. H. (2005). Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *The Journal of Experimental Biology*, *208*(Pt 15), 2819-2830.

Yang, Z., Zhang, L., Zhang, Y., Zhang, T., Feng, Y., Lu, X., Lan, W., Wang, J., Wu, H., Cao, C., & Wang, X. (2011). Highly Efficient Production of Soluble Proteins from Insoluble Inclusion Bodies by a Two-Step-Denaturing and Refolding Method. *PLoS ONE*, *6*(7), e22981.

Yonekura-Sakakibara, K., Kojima, M., Yamaya, T., & Sakakibara, H. (2004). Molecular characterization of cytokinin-responsive histidine kinases in maize. Differential ligand preferences and response to cis-zeatin. *Plant Physiology*, *134*(4), 1654-1661.

Yuan, J., Jin, F., Glatter, T., & Sourjik, V. (2017). Osmosensing by the bacterial PhoQ/PhoP two-component system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(50), E10792-E10798.

Z

Zhang, X. L., Jiang, L., Xin, Q., Liu, Y., Tan, J. X., & Chen, Z. Z. (2015). Structural basis and functions of abscisic acid receptors PYLs. *Frontiers in Plant Science*, 6.

Zhu, J.-K. (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 53, 247-273.

Zoraghi, R., Corbin, J. D., & Francis, S. H. (2004). Properties and functions of GAF domains in cyclic nucleotide phosphodiesterases and other proteins. *Molecular Pharmacology*, 65(2), 267-278.

Žunar, B., Mosrin, C., Bénédicti, H., & Vallée, B. (2022). Re-engineering of CUP1 promoter and Cup2/Ace1 transactivator to convert *Saccharomyces cerevisiae* into a whole-cell eukaryotic biosensor capable of detecting 10 nM of bioavailable copper. *Biosensors & Bioelectronics*, 214, 114502.

Zwack, P. J., & Rashotte, A. M. (2015). Interactions between cytokinin signalling and abiotic stress responses. *Journal of Experimental Botany*, 66(16), 4863-4871.

Zwieniecki, M. A., Melcher, P. J., & Michele Holbrook, N. M. (2001). Hydrogel control of xylem hydraulic resistance in plants. *Science (New York, N.Y.)*, 291(5506), 1059-1062.

AUTRES SOURCES :

Article euronews.com. (2015). 200 ans d'histoire du changement climatique. Consulté le 03/07/2018. <https://fr.euronews.com/2015/09/09/cop21>

FAO. (2020). Évaluation des ressources forestières mondiales 2020 - Principaux résultats. Consulté le 29/07/2023. <https://www.fao.org/3/nd486fr/nd486fr.pdf>

GIEC. (2021). AR6 Climate Change: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Consulté le 29/07/2023. <https://www.ipcc.ch/report/sixth-assessment-report-working-group-i/>

IGN. (2020). Les forêts en France - Statistiques et indicateurs. Consulté le 29/07/2023. https://foret.ign.fr/api/upload/IGD_2020_SYNTHESE.pdf

NCEI. NOAA. (2023). September 2023 Global Climate Report. Consulté le 16/10/23. <https://www.ncei.noaa.gov/access/monitoring/monthly-report/global/202309>

Hanae MAKHOKH

Caractérisation d'osmosenseurs de peuplier et recherche de ligands dans le but d'une application en tant que biostimulants

Résumé :

Dans le contexte de changement climatique actuel, les plantes sont soumises à une réduction de la disponibilité en eau dans le sol, ce qui génère un stress hydrique pouvant affecter leur développement. Parmi les différents mécanismes participant à la perception et la réponse à ce stress, perçu comme un stress osmotique à l'échelle cellulaire, une voie de signalisation de type Phosphorelais Multiple (MSP) semble être impliquée. Notre étude se concentre sur ce MSP osmosensing chez le peuplier, composé de trois partenaires : deux récepteurs de type histidine-aspartate kinase (HK1a et HK1b), trois protéines Histidine Phosphotransfert (HPT) et six Régulateurs de Réponse de type B (RR-B). Les deux récepteurs HK1 sont notamment caractérisés par leur domaine extracellulaire (ECD) incluant un domaine CACHE, capable de fixer de petits ligands d'après la littérature, bordés par deux domaines transmembranaires (TM1 et TM2) et une partie cytoplasmique contenant les domaines transmetteur (TD) et receveur (RD). L'objectif de la thèse visait d'une part à la caractérisation fonctionnelle et biochimique des récepteurs HK1, et d'autre part à l'identification des ligands potentiels des récepteurs HK1. Ce travail a mis en lumière le rôle des domaines CACHE et TM2 dans l'osmosensing en utilisant une approche génétique. Par ailleurs, une approche biochimique a permis la production et la solubilisation de l'ECD, ouvrant la voie à des études structurales futures. Afin d'identifier les éventuels ligands de ces récepteurs avec leur domaine CACHE, un système rapporteur fluorescent d'osmosensing a été développé en levure osmodéficente. Nous avons pu ainsi mener des criblages de molécules candidates, pour une approche ciblée, ainsi que d'extraits de peuplier, pour une approche aléatoire. Parmi les dizaines de phytoextraits testés, deux extraits foliaires semblent influencer l'activité de ces récepteurs. Sur l'hypothèse que ce type d'activité permettrait d'identifier des extraits capables d'agir comme biostimulant pour l'amélioration de la tolérance à la sécheresse, des tests sur différentes espèces végétales ont été réalisés en condition de sécheresse avec ou sans application des deux extraits sélectionnés. Les expérimentations sont encore en cours mais les résultats préliminaires semblent montrer une amélioration de la croissance et de la survie des plantes lors d'un stress hydrique. Sur la base de ces résultats prometteurs, un dépôt de brevet pour l'utilisation du système rapporteur d'osmosensing pour l'identification d'extraits aux capacités biostimulantes pour l'amélioration de la tolérance à la sécheresse des plantes est en cours.

Mots clés : peuplier, stress osmotique, MSP, histidine kinase, ligands

Characterisation of poplar osmosensors and search for ligands with a view to application as biostimulants

Summary:

In the current context of climate change, plants are facing reduced water availability in the soil, leading to water stress that can affect their development. Among the various mechanisms involved in perceiving and responding to this stress, which is perceived as osmotic stress at the cellular level, a Multiple Phosphorelay (MSP) signaling pathway appears to be involved. Our study focuses on this osmosensing MSP in poplar, composed of three partners: two histidine-aspartate kinase receptors (HK1a and HK1b), three Histidine Phosphotransfer proteins (HPT), and six Response Regulators of type B (RR- B). The two HK1 receptors are notably characterized by their extracellular domain (ECD), including a CACHE domain capable of binding small ligands according to the literature. These domains are bordered by two transmembrane domains (TM1 and TM2) and a cytoplasmic part containing transmitter (TD) and receiver (RD) domains. The objectives of the thesis were, on the one hand, to functionally and biochemically characterize the HK1 receptors, and on the other hand, to identify potential ligands for the HK1 receptors. This work highlighted the roles of the CACHE and TM2 domains in osmosensing using a genetic approach. Furthermore, a biochemical approach enabled the production and solubilization of the ECD, paving the way for future structural studies. In order to identify potential ligands for these receptors with their CACHE domain, a fluorescent osmosensing reporter system was developed in osmodeficient yeast. This allowed us to conduct screenings of candidate molecules for a targeted approach, as well as poplar extracts for a random approach. Among the dozens of phytoextracts tested, two leaf extracts appeared to influence the activity of these receptors. Based on the hypothesis that this type of activity could lead to the identification of extracts capable of acting as biostimulants to enhance drought tolerance, tests on different plant species were conducted under drought conditions with or without the application of the two selected extracts. The experiments are still ongoing, but preliminary results seem to indicate an improvement in plant growth and survival during water stress. Building upon these promising results, a patent application for the use of the osmosensing reporter system for identifying extracts with biostimulant capabilities to enhance plant drought tolerance is currently in progress.

Keywords: poplar, osmotic stress, MSP, histidine kinase, ligands

UPRES 1207 LBLGC Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures



USC 1328 INRAE Institut National de Recherche pour l'Agriculture,
l'alimentation et l'Environnement

