



Analysis of *Arabidopsis thaliana* mutants affected in water deficit tolerance

Anne Plessis

► To cite this version:

Anne Plessis. Analysis of *Arabidopsis thaliana* mutants affected in water deficit tolerance. Life Sciences [q-bio]. AgroParisTech, 2008. English. NNT : 2008AGPT0102 . pastel-00004813

HAL Id: pastel-00004813

<https://pastel.hal.science/pastel-00004813>

Submitted on 14 Apr 2009

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.

Il me paraît bien loin l'été
Mes feuilles desséchées
Ne font plus la connexion
Mais qu'a-t-il bien pu arriver ?

Emilie Simon, Fleur de Saison

Remerciements

Pas de hiérarchie dans ces remerciements, chacun ayant contribué à sa façon à ce que je parvienne dans les meilleures conditions au bout de ce travail, le moindre coup de pouce a sa propre valeur qui ne peut être comparée aux autres, impossible de remercier certains plus que d'autres ! L'ordre qui suivra n'est donc qu'une classification arbitraire.

Merci Annie pour m'avoir acceptée au Laboratoire de Biologie des Semences et dans l'équipe ABA ; merci de m'avoir confié ce projet dans lequel j'ai pu m'investir, relever des défis (comme je le dis souvent ; »A vaincre sans péril, on triomphe sans gloire... »), tester mes limites et apprendre un nombre incalculable de choses ; merci d'avoir toujours été disponible malgré les lourdes responsabilités de DU mais aussi de m'avoir laissée très rapidement une grande liberté et autonomie, je reste persuadée que ce sont les meilleures conditions possibles pour apprendre.

Merci Helen d'abord pour avoir appuyé immédiatement ma candidature pour le stage de M2 (oui, je m'en souviens encore) ; merci de m'avoir appris la rigueur et en même temps l'enthousiasme dans les manips, je pense que tu m'as communiqué un peu de ta façon de voir la science (la carto restera toujours une enquête policière dans mon esprit) ; merci aussi pour ce qu'on a partagé en dehors du cadre académique, c'est toujours plus agréable de travailler avec des gens qui sont aussi nos amis.

Pour continuer avec l'équipe ABA, merci Lucy, pour m'avoir appris le génotypage haut débit dans les règles de l'art (tes compétences pédagogiques mériteraient d'être mieux exploitées !) et m'avoir guidée patiemment pendant mes premières semaines au labo, c'est grâce à toi que j'ai pu m'adapter aussi rapidement ; merci pour ta franchise rafraîchissante (enfin, surtout quand elle s'adresse aux autres !) ; l'exemple que tu donnes de ne pas accorder d'importance au jugement des gens m'a permis de prendre un recul bienvenu.

Merci Anne pour ta présence réconfortante (un peu comme une deuxième maman) ; même si je n'ai pas vraiment eu le plaisir de travailler, travailler à côté de toi, toujours prête à rendre service ou à tendre une oreille attentive, a été bien agréable ; ton calme et ta gentillesse sont pour beaucoup dans l'atmosphère paisible du labo 262.

Merci à mes partenaires pour ce projet : Raphaël, Delphine et Viridiana. Chacun d'entre vous a apporté une précieuse contribution (jeu : amusez-vous à retrouver votre travail au milieu de la partie Résultats...). Merci pour le temps passé ensemble, chacun m'a appris une facette différente du travail en équipe. Merci, aux autres membres de l'équipe ABA pour le plaisir de travailler à leurs côtés, les anciens Valérie, Audrey, Sabine, Alexandra, Ping Hong, Mitsunori, Aiuko ; comme les nouveaux : Leslie et François (comme c'est agréable d'avoir un aussi bon élève !).

Merci au gardien de la serre 7, Mickaël, pour toutes les petites attentions dont il a fait preuve, pour avoir accepté d'abord d'apprendre à faire de nouveaux pots puis d'en avoir fait parfois des commandes gigantesques. Merci aussi aux autres serristes qui m'ont aidé, Jean-Pascal et Hervé, je n'ai eu à faire qu'aux meilleurs !

Merci à tous les autres membres du Laboratoire de Biologie des Semences, en toute impartialité le meilleur labo du monde ! Et en particulier...

Merci à Joseph, le superman de l'informatique qui vient sauver les gens (ou leur ordinateur) dès qu'il entend un appel à l'aide. J'ai bien profité (abusé?) de t'avoir juste à côté de moi, surtout ces derniers temps. Joseph, c'est comme le téléphone portable : impossible de se rappeler comment on faisait avant...

Merci à Sébastien pour avoir été mon voisin de bureau pendant 3 ans et demi (bientôt 4!), une oreille attentive surtout aux récriminations (j'en avais plus à la fin qu'au début, par ta mauvaise influence!) mais également aux questions scientifiques. Merci aussi d'avoir introduit dans le bureau 307 le jeu à la fois le plus énervant qui existe et le meilleur moyen de se défouler dans 4 m².

Merci à David pour son flegme imparable, ses blagues et son super feuilleton de bébé (la réalité dépasse la fiction!).

Merci aux autres personnes qui sont passées dans le bureau 307 en même temps que moi et qui ont contribué à la bonne ambiance qui y règne : Alexandra (encore!?), Pierre...

Merci à tous ceux qui m'ont sacrifié une partie de leur temps quand j'en avais besoin : Martine, la plus dévouée : la « maman » du labo, Bertrand, qui devine quand on a besoin de lui, Nathalie, toujours de bonne humeur, Erwana qui ne laisse personne prendre la grosse tête, Przemek, mon collègue de thèse, Loïc et Jean-Marc avec leur réserve inépuisable de sujets de discussion, Jean-Pierre, Béatrice, Fabrice, Isabelle, Christian, Christine, Sylvie, Adeline... et tous les autres qui sont partis ou toujours là.

Merci à Stéphane et Marie pour leur efficacité, leur gentillesse et leur dévouement.

Merci à Marc Jullien pour son soutien et ses recommandations élogieuses.

Merci à Olivier Loudet et Hervé Vaucheret pour les discussions enrichissantes à l'occasion de mes exposés de début et mi-thèse.

Merci à Sandrine Balzergue, Yvan Kraepiel, Bruno Sottat et Alessandra pour leurs contributions à mes expériences.

Merci à Sylvain Merlot, mon « agent de liaison » avec la caméra IR pour ses encouragements et ses conseils avisés, ainsi qu'à Jeff Leung.

Merci à Sylvie Coursol, Alain Vavasseur et Abdelhafid Bendahmane pour leur participation à mon comité de thèse.

Merci à tout le groupe des « déjeuners du mercredi », anciens du M2 et associés pour cette parenthèse du milieu de semaine requinquante.

Merci à Lara pour nos escapades à la danse du mardi soir.

Merci à Claire Cheret pour m'avoir permis de découvrir les joies de l'enseignement de la biochimie et grâce à qui le monitorat n'a pas été une charge mais un plaisir.

Merci également au CIES de Versailles pour ses formations qui ouvrent l'esprit.

Merci à l'école doctorale ABIES pour son suivi rigoureux et ses formations où on est bien nourri.

Merci à la cantine du centre INRA de Versailles pour les beignets au chocolat (pas trop souvent)...

Merci à ma maman pour sa maison pour dormir au calme le week-end, pour son écoute, son soutien, ses conseils et pour m'avoir aussi bien élevée...

Merci à mon papa pour ses encouragements et ses petits repas du samedi soir.

Merci à ma petite soeur chérie pour la cohabitation d'une année (avec son lot de chaussures passées par la fenêtre), pour après avoir fait plus de 2 h de trajet (presque) toutes les semaines pour

manger avec moi, pour les visionnages de séries télé, pour les séances de shopping sportives, tout ce qui a contribué à ce que je garde un certain équilibre psychologique pendant ces années de thèse.

Merci à Génoplante pour le financement du projet ABRUPT.

Merci à Emannuelle Jeannette, Alain Vavasseur, Montserrat Pagès et Marc Jullien pour avoir bien voulu participer à mon jury de thèse.

Table des matières

1	Introduction	1
1.1	L'acide abscissique	1
1.1.1	L'acide abscissique : dans les plantes et ailleurs	1
1.1.2	Métabolisme de l'acide abscissique	2
1.1.2.1	L'ABA : un produit de clivage des caroténoïdes	2
1.1.2.2	Catabolisme de l'ABA : deux voies d'inactivation	3
1.1.3	Rôles de l'acide abscissique	4
1.1.3.1	Une hormone majeure pour les semences	4
1.1.3.2	Un effet ambigu sur la croissance	4
1.1.3.3	L'acteur principal de la tolérance aux stress abiotiques	4
1.1.3.4	L'outsider de la réponse aux pathogènes	5
1.1.4	Quelques éléments de la signalisation de l'acide abscissique	5
1.1.4.1	La quête des récepteurs de l'ABA	5
1.1.4.1.1	FCA un médiateur de l'action de l'ABA sur la floraison	6
1.1.4.1.2	CHLH : un récepteur chloroplastique impliqué dans plusieurs mécanismes dépendants de l'ABA	6
1.1.4.1.3	Un récepteur de l'ABA couplé à une protéine G : une hypothèse à valider	7
1.1.4.2	Le métabolisme des ARNm ouvre de nouvelles perspectives	8
1.2	Les mécanismes de tolérance des plantes à la déshydratation	10
1.2.1	Perception du stress hydrique	10
1.2.2	Régulations métaboliques en réponse à la déshydratation	11
1.2.2.1	Contrôle de la teneur en ABA	11
1.2.2.2	Ajustement osmotique	12
1.2.3	La fermeture stomatique en réponse à l'ABA	12
1.2.3.1	Signalisation de la fermeture stomatique	13
1.2.3.1.1	Des sphingolipides aux ROS	13
1.2.3.1.2	Le Ca^{2+} , un acteur majeur de la signalisation	14
1.2.3.2	Les mécanismes de fermeture stomatique	14
1.2.3.2.1	L'efflux d'anions	14
1.2.3.2.2	Dépolarisation de la membrane plasmique	15

1.2.3.2.3	Efflux de K ⁺	15
1.2.3.2.4	Réorganisation du cytosquelette d'actine	15
1.2.4	Transduction du signal	17
1.2.4.1	Phosphorylations et déphosphorylations	17
1.2.4.1.1	Les kinases	17
1.2.4.1.2	Les phosphatases	18
1.2.4.2	Les phospholipides	19
1.2.4.3	Ca ²⁺	19
1.2.5	Régulations transcriptionnelles	20
1.2.5.1	Voies de régulation ABA-dépendantes	21
1.2.5.1.1	La voie des ABRE	21
1.2.5.1.2	Régulation par les MYC et MYB	22
1.2.5.1.3	Autres familles de facteurs de transcription	22
1.2.5.2	Voies de régulation ABA-indépendantes	22
1.2.5.2.1	Activation par le DRE	22
1.2.5.2.2	Autres voies ABA-indépendantes	23
1.2.5.3	Fonctions des gènes induits par la déshydratation	24
1.2.5.3.1	LEA	24
1.2.5.3.2	Aquaporines	25
1.2.5.3.3	Protéines heat-shock	25
1.2.5.3.4	Détoxification des effets des ROS	25
1.2.5.3.5	Protéases	26
1.3	Présentation du projet de thèse	26
2	Résultats	31
2.1	Introduction	31
2.2	Caractérisation de la réponse à la déshydratation des supresseurs	31
2.2.1	Les supresseurs ont une température foliaire supérieure à <i>aba3-1</i>	31
2.2.2	Tous les supresseurs sont résistants à une déshydratation progressive	32
2.2.3	Déshydratation rapide	32
2.2.4	Observation infrarouge de feuilles détachées	34
2.2.5	Réponse des stomates à l'ABA	35
2.2.6	Les supresseurs ne sont pas affectés dans la biosynthèse de l'ABA	36
2.2.7	Expression de gènes de réponse au stress hydrique	37
2.3	Caractérisation physiologique	40
2.3.1	Caractéristiques des parties aériennes	40
2.3.1.1	Croissance de la rosette	40
2.3.1.2	Croissance de la hampe florale	42
2.3.1.3	Délai de floraison	42
2.3.1.4	Tolérance des supresseurs à un pathogène	44
2.3.1.5	Sensibilité de la croissance des parties aériennes à l'ABA	46

2.3.2	Étude de la germination	46
2.3.2.1	Résistance au paclobutrazol	46
2.3.2.2	Résistance au stress salin à la germination	48
2.3.2.3	Sensibilité à l'ABA à la germination	48
2.3.3	Étude de la croissance racinaire	50
2.3.3.1	Croissance racinaire	50
2.3.3.2	Croissance des racines en réponse à des stress salin et osmotique	50
2.3.3.3	Sensibilité à l'ABA de la croissance racinaire	52
2.4	Effets des mutations de suppression en l'absence de la mutation <i>aba3-1</i>	53
2.4.1	Sélection des mutations <i>has</i> sans la mutation <i>aba3-1</i>	53
2.4.2	Caractérisation de <i>has1</i>	55
2.4.2.1	Résistance à la déshydratation	55
2.4.2.2	Sensibilité à l'ABA	55
2.4.2.3	Bilan	55
2.4.3	Caractérisation de <i>has2</i>	55
2.4.3.1	Résistance à la déshydratation	56
2.4.3.2	Sensibilité à l'ABA	56
2.4.3.3	Tolérance à un pathogène	56
2.4.3.4	Bilan	56
2.4.4	Caractérisation de <i>has3</i>	58
2.4.4.1	Résistance à la déshydratation	58
2.4.4.2	Sensibilité à l'ABA	58
2.4.4.3	Tolérance à un pathogène	58
2.4.4.4	Bilan	58
2.4.5	Caractérisation de <i>has4</i>	60
2.4.5.1	Réponse à la déshydratation	60
2.4.5.2	Sensibilité à l'ABA	60
2.4.5.3	Résistance à un pathogène	60
2.4.5.4	Bilan	60
2.5	Analyse transcriptomique	63
2.5.1	Transcriptome de <i>has1 aba3-1</i>	63
2.5.2	Transcriptome de <i>has2 aba3-1</i>	65
2.5.3	Transcriptome de <i>has3 aba3-1</i>	67
2.5.4	Transcriptome de <i>has4 aba3-1</i>	67
2.5.5	Comparaison des transcriptomes de <i>has1 aba3-1</i> , <i>has3 aba3-1</i> et <i>has4 aba3-1</i>	69
2.5.5.1	Gènes communs à <i>has1 aba3-1</i> et <i>has3 aba3-1</i>	69
2.5.5.2	Gènes communs à <i>has3 aba3-1</i> et <i>has4 aba3-1</i>	69
2.5.5.3	Gène commun à <i>has1 aba3-1</i> et <i>has4 aba3-1</i>	69
2.5.6	Bilan	71
2.6	Analyse génétique des mutations de suppression	72
2.7	Cartographie génétique des mutations de suppression	73

2.7.1	Principe de la cartographie	73
2.7.1.1	Utilisation d'une population de cartographie recombinante	73
2.7.1.2	Génotypage par des marqueurs moléculaires	75
2.7.1.3	Réduction de l'intervalle de cartographie	75
2.7.2	Cartographie du locus <i>has1</i>	77
2.7.3	Cartographie du locus <i>has2</i>	77
2.7.3.1	Phase initiale de cartographie	77
2.7.3.2	Phase de cartographie fine	77
2.7.4	Cartographie du locus <i>has3</i>	79
2.7.4.1	Phase initiale de cartographie	79
2.7.4.2	Phase de cartographie fine	79
2.7.5	Cartographie du locus <i>has4</i>	81
2.7.5.1	Phase initiale de cartographie	81
2.7.5.2	Phase de cartographie fine	82
2.8	Analyse de gènes candidats dans l'intervalle de cartographie pour le locus <i>has4</i>	84
2.8.1	Phénotypage infrarouge de mutants d'insertion dans les gènes de l'intervalle	84
2.8.2	Tri de gènes candidats selon leur fonction	84
2.8.3	Tri de gènes candidats selon leur profil d'expression	86
2.8.4	Séquençage des gènes candidats	87
2.8.5	Bilan	88
2.9	Analyse du gène At5g61140 comme gène candidat pour le locus <i>has1</i>	89
2.9.1	Étude de la mutation de At5g61140 chez <i>has1 aba3-1</i>	89
2.9.1.1	Une altération de la séquence du gène At5g61140 chez <i>has1 aba3-1</i> empêche l'expression de son ARNm complet	89
2.9.1.2	Recherche de la nature de la « coupure »	91
2.9.1.3	Liaison entre la mutation dans At5g61140 et les phénotypes de <i>has1</i> <i>aba3-1</i>	91
2.9.2	Étude des mutants d'insertion	91
2.9.2.1	Expression du gène At5g61140	92
2.9.2.2	Phénotype en thermographie infrarouge	92
2.9.2.3	Sensibilité de la croissance à l'ABA	92
2.9.2.4	Effet de l'insertion en contexte de déficience en ABA	94
2.9.3	Bilan	94
3	Discussion	97
3.1	Stratégie de sélection et d'analyse des mutants <i>has</i>	97
3.1.1	Intérêts et limites de la thermographie infrarouge	97
3.1.2	Utilisation d'un crible de suppression	98
3.1.2.1	Choix du mutant déficient en ABA	98
3.1.2.2	Intérêt de la recherche de supprimeur	98
3.1.3	Pertinence du deuxième critère de sélection	99

3.1.4	Stratégie d'identification des loci <i>has</i>	99
3.1.4.1	Réduction de l'intervalle de cartographie	99
3.1.4.2	Utilisation d'une puce à ADN	99
3.1.5	Analyse des mutations sélectionnées	100
3.1.5.1	Saturation du crible	100
3.1.5.2	Type de mutations sélectionnées	100
3.2	Analyse des mutations	101
3.2.1	Analyse de la mutation <i>has1</i>	101
3.2.1.1	La résistance à la déshydratation pourrait être dépendante des racines	101
3.2.1.2	Liaison entre la mutation de l'hélicase putative et les phénotypes de <i>has1 aba3-1</i>	101
3.2.1.3	Réponse de la croissance à la durée du jour	103
3.2.1.4	La sensibilité à l'ABA dépend de l'organe étudié	103
3.2.1.5	Recherche d'une autre origine pour l'augmentation de température foliaire	103
3.2.2	Analyse de la mutation <i>has2</i>	104
3.2.2.1	Les changements de transcriptome ont peu de conséquences phéno- typiques	104
3.2.2.2	La résistance à la déshydratation pourrait nécessiter un seuil dans l'intensité de stress	104
3.2.2.3	Recherche de gènes candidats	106
3.2.3	Analyse de la mutation <i>has3</i>	106
3.2.3.1	Des phénotypes de réponse au stress et de germination liés à une hypersensibilité à l'ABA	106
3.2.3.2	Recherche de gènes candidats	108
3.2.4	Analyse de la mutation <i>has4</i>	108
3.2.4.1	Une possible fermeture constitutive des stomates	108
3.2.4.2	Des modifications généralisées de la sensibilité à l'ABA	110
3.2.4.3	Avancement de la cartographie	110
3.2.5	Mise en évidence d'interactions entre la signalisation de l'ABA et la réponse au stress biotique	110
3.3	Conclusion et perspectives	111
3.3.1	Conclusion	111
3.3.2	Perspectives	111
4	Matériels et Méthodes	115
4.1	Matériel végétal	115
4.2	Méthodes	115
4.2.1	Manipulations du matériel végétal	115
4.2.1.1	Stérilisation des graines	115
4.2.1.2	Conditions de culture	116

4.2.1.2.1	Germination <i>in vitro</i>	116
4.2.1.2.2	Culture en serre et en chambre de culture	116
4.2.1.3	Croisements	116
4.2.2	Culture des bactéries	116
4.2.3	Tests physiologiques	117
4.2.3.1	Tests de germination	117
4.2.3.1.1	Test de résistance au paclobutrazol	117
4.2.3.1.2	Test de sensibilité à l'ABA	117
4.2.3.1.3	Test de résistance au chlorure de sodium	117
4.2.3.2	Déshydratation rapide	117
4.2.3.3	Déshydratation physiologique	117
4.2.3.4	Mesure de la teneur en ABA	118
4.2.3.5	Réponse de la croissance des rosettes à l'ABA	119
4.2.3.6	Observations par thermographie infrarouge	119
4.2.3.7	Mesure de la croissance racinaire	119
4.2.3.8	Test de résistance à un pathogène	120
4.2.4	Analyses moléculaires	121
4.2.4.1	Extraction d'ADN	121
4.2.4.1.1	ADN génomique végétal	121
4.2.4.1.2	ADN plasmidique bactérien	122
4.2.4.2	Amplification d'ADN par PCR	122
4.2.4.2.1	Oligonucléotides utilisés pour la PCR	123
4.2.4.3	Electrophorèse d'ADN	123
4.2.4.4	Quantification de l'ADN	124
4.2.4.5	Séquençage d'ADN	124
4.2.4.6	Analyse de l'expression des gènes	125
4.2.4.6.1	Extraction d'ARN pour l'analyse en RT-PCR quantitative	125
4.2.4.6.2	Extraction d'ARN pour l'analyse transcriptomique	125
4.2.4.6.3	Electrophorèse et quantification d'ARN	126
4.2.4.6.4	Transcription inverse	126
4.2.4.6.5	Quantification des ADNc par PCR quantitative	126
4.2.4.6.6	Analyse transcriptomique	128
4.2.4.7	Analyse de Southern	128
4.2.4.7.1	Amplification des fragments par PCR	128
4.2.4.7.2	Clonage des fragments	129
4.2.4.7.3	Purification des sondes	130
4.2.4.7.4	Radiomarquage des sondes	130
4.2.4.7.5	Digestion de l'ADN génomique	131
4.2.4.7.6	Transfert de l'ADN sur la membrane	131
4.2.4.7.7	Hybridation de la membrane	132
4.2.4.7.8	Autoradiographie de la membrane	132

4.2.4.8	Mise en évidence de la mutation <i>aba3-1</i> par marqueur dCAPS . . .	132
Bibliographie		135
Annexe 1		152
Annexe 2		154
Annexe 3		157

Table des figures

1.1	Formule semi-développée de l'acide abscissique	2
1.2	Biosynthèse de l'ABA	3
1.3	Schéma de la signalisation et des mécanismes de la fermeture stomatique en réponse à l'ABA.	16
1.4	Métabolisme de l'InsP3 (modifié d'après Xiong et al. (2002b)).	19
2.1	Images en thermographie infrarouge (fausses couleurs) des supprimeurs (BC0)	32
2.2	Teneur en eau des supprimeurs (BC0) après une déshydratation progressive.	33
2.3	Perte d'eau après 30 min de déshydratation rapide des rosettes des supprimeurs (BC2) coupées.	33
2.4	Image infrarouge (fausses couleurs) de feuilles détachées de <i>has1 aba3-1</i> et <i>has2 aba3-1</i> (BC0)	34
2.5	Image infrarouge (fausses couleurs) de feuilles détachées (une plante par génotype) de <i>has3 aba3-1</i> et <i>has4 aba3-1</i> (BC0).	34
2.6	Images en thermographie infrarouge (fausses couleurs) de feuilles des témoins et supprimeurs (BC2) pulvérisées avec une solution témoin ou une solution de 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ d'ABA.	35
2.7	Accumulation d'ABA des supprimeurs (BC1) après 4 h 30 de déshydratation rapide.	36
2.8	Accumulation d'ABA des supprimeurs (BC0) après une déshydratation progressive.	36
2.9	Expression des gènes de réponse au stress hydrique chez les supprimeurs (BC1) après une déshydratation à 10 % (p/p).	38
2.10	Expression des gènes de réponse au stress hydrique chez les supprimeurs (BC1) après une déshydratation rapide.	38
2.11	Diamètre maximal final de la rosette des supprimeurs (BC0) lors d'une culture dans deux chambres de culture en jour long et en jour court.	41
2.12	Hauteur finale de la hampe florale des supprimeurs (BC0) lors d'une culture en chambre de culture en jour long.	43
2.13	Nombre de jours entre le repiquage et l'apparition de la hampe florale des supprimeurs (BC1).	43
2.14	Répartition des niveaux de gravité de l'infection par <i>Erwinia chrysanthemi</i> dans des conditions tropicales dans des populations sauvage, <i>aba3-1</i> , <i>has2 aba3-1</i> et <i>has4 aba3-1</i> (BC0) et son évolution pendant 6 jours après l'inoculation.	45

2.15 Mesures biométriques avec et sans pulvérisation d'ABA des parties aériennes des supprimeurs	47
2.16 Résistance au paclobutrazol de la germination des graines des supprimeurs (BC2).	47
2.17 Résistance au stress salin de la germination des graines des supprimeurs (BC2).	49
2.18 Sensibilité à l'ABA de la germination des supprimeurs (BC2).	49
2.19 Élongation de la racine principale des supprimeurs (BC0)	51
2.20 Effet de 60 mmol.L ⁻¹ de mannitol et de 100 mmol.L ⁻¹ de NaCl sur la croissance racinaire des supprimeurs (BC0).	51
2.21 Effet d'une gamme de concentration en ABA sur la croissance de la racine principale des supprimeurs.	52
2.22 Sélection des mutations <i>has</i> sans la mutation <i>aba3-1</i>	54
2.23 Image infrarouge (fausses couleurs) de plantules <i>has1</i> de 15 jours qui ont subi une déshydratation de 8 jours.	55
2.24 Image infrarouge (fausses couleurs) de plantules <i>has2</i> de 15 jours qui ont subi une déshydratation de 8 jours.	56
2.25 Cinétique de déshydratation rapide de rosettes <i>has2</i> et <i>has2 aba3-1</i> pendant 4 h 30	57
2.26 Répartition des niveaux de gravité de l'infection par <i>Erwinia chrysanthemi</i> dans des conditions tempérées dans des populations sauvage, <i>has2</i> , <i>has3</i> et <i>has4</i> et son évolution pendant 7 jours après l'inoculation	57
2.27 Image infrarouge (fausses couleurs) de <i>has3</i>	59
2.28 Test de sensibilité à l'ABA à la germination de <i>has3</i>	59
2.29 Plantes sauvages et <i>has4</i> après une culture de 8 semaines en serre.	61
2.30 Image infrarouge (fausses couleurs) de <i>has4</i>	61
2.31 Cinétique de déshydratation rapide de <i>has4</i> pendant 50 min	61
2.32 Test de sensibilité à l'ABA à la germination de <i>has4</i>	62
2.33 Comparaison des niveaux d'expression chez <i>has2 aba3-1</i> avec ceux chez <i>aba3-1</i> rapportés à 0 % et ceux chez le sauvage rapportés à 100 % pour le groupe de gènes significativement dérégulés chez <i>has2 aba3-1</i> par rapport à <i>aba3-1</i>	66
2.34 Comparaison des niveaux d'expression chez <i>has2 aba3-1</i> avec ceux chez <i>aba3-1</i> rapportés à 0 % et ceux chez le sauvage rapportés à 100 % pour le groupe de gènes significativement dérégulés chez <i>aba3-1</i> par rapport au sauvage	66
2.35 Image infrarouge (fausses couleurs) de la sélection de plantes chaudes pour constituer la population de cartographie	74
2.36 Constitution de la population F ₂ pour la cartographie et génotypage attendu chez les mutants à des loci marqueurs lié et non lié à la mutation	74
2.37 Photographie du résultat de la migration sur un gel d'agarose du produit d'amplification PCR d'un microsatellite pour les accessions Col-0 et <i>Ler</i> et un hétérozygote au locus du marqueur.	76
2.38 Phénotypage infrarouge (image en fausses couleurs) de la descendance d'un recombinant chaud.	76
2.39 Principe de la cartographie fine	76

2.40	Cartographie du locus <i>has2</i> : réduction de l'intervalle entre F14P13 et F24K9-4 . . .	78
2.41	Cartographie du locus <i>has3</i> : réduction de l'intervalle entre msat 4.101 et msat 4.15 .	80
2.42	Cartographie du locus <i>has4</i> : réduction de l'intervalle entre msat 4.15 et F7J7	82
2.43	Cartographie du locus <i>has4</i> : réduction de l'intervalle entre F13C5-5 et F24J7-1	82
2.44	Cartographie du locus <i>has4</i> : réduction de l'intervalle entre msat SNP4 et T5K18-6 .	83
2.45	Image infrarouge (fausses couleurs) d'un mutant d'insertion dans le promoteur du gène At4g19200	88
2.46	Étude des gènes candidats situés dans l'intervalle de cartographie défini pour le locus <i>has4</i>	88
2.48	Répartition des amorces utilisées pour localiser la « coupure » dans At5g61140	90
2.47	Résultats de RT-PCR semi-quantitative pour le gène At5g61140 sur <i>has1 aba3-1</i> après 35 cycles d'amplification	90
2.49	Morphologie de <i>has1 aba3-1</i> pendant une culture en serre	90
2.50	Localisation des insertions des 3 lignées Salk étudiées et des amorces utilisées pour sélectionner les insertions et pour la RT-PCR	93
2.51	Expression du gène At5g61140 détectée par RT-PCR semi-quantitative sur les lignées d'insertion après 35 cycles d'amplification	93
2.52	Image infrarouge (fausses couleurs) de la lignée mutante d'insertion Salk 086062 . . .	93
2.53	Image infrarouge (fausses couleurs) de 086062 <i>aba3-1</i>	95
2.54	Mesures biométriques avec et sans pulvérisation d'ABA des parties aériennes des lignées Salk 086062 <i>aba3-1</i> et 116847 <i>aba3-1</i>	95
3.1	Récapitulatif des phénotypes de <i>has1 aba3-1</i> et <i>has1</i>	102
3.2	Récapitulatif des phénotypes de <i>has2 aba3-1</i> et <i>has2</i>	105
3.3	Récapitulatif des phénotypes de <i>has3 aba3-1</i> et <i>has3</i>	107
3.4	Récapitulatif des phénotypes de <i>has4 aba3-1</i> et <i>has4</i>	109
4.1	Notation des symptômes de l'infection par <i>Erwinia chrysanthemi</i>	121
4.2	Plasmide utilisé pour le clonage des fragments d'ADN génomique amplifiés par PCR	129
4.3	Montage pour le transfert de l'ADN du gel sur les membranes	131
4.4	Principe du dCAPS	132

Liste des tableaux

1.1	Mutants dont la tolérance à la déshydratation est améliorée.	29
2.1	Gènes significativement différentiellement exprimés chez <i>has1 aba3-1</i>	64
2.2	Gènes significativement différentiellement exprimés chez <i>has2 aba3-1</i> par rapport au sauvage	66
2.3	Gènes significativement différentiellement exprimés chez <i>has3 aba3-1</i>	68
2.4	Gènes significativement différentiellement exprimés chez <i>has4 aba3-1</i>	68
2.5	Gènes significativement différentiellement exprimés chez <i>has1 aba3-1</i> et <i>has3 aba3-1</i>	70
2.6	Gènes significativement différentiellement exprimés chez <i>has3 aba3-1</i> et <i>has4 aba3-1</i>	70
2.7	Gène significativement différentiellement exprimé chez <i>has1 aba3-1</i> et <i>has4 aba3-1</i>	70
2.8	Analyse de la ségrégation des loci <i>has</i>	72
2.9	Répartition des types d'ADN aux marqueurs du chromosome V testés sur 70 plantes sélectionnées pour leur phénotype chaud pour la recherche de liaison avec locus <i>has1</i>	77
2.10	Répartition des types d'ADN sur 72 plantes sélectionnées pour leur phénotype chaud aux marqueurs de l'ensemble du génome utilisés pour la recherche de liaison avec le locus <i>has2</i>	78
2.11	Répartition des types d'ADN sur les 72 plantes sélectionnées pour leur phénotype chaud aux marqueurs du chromosome III testés pour la recherche de liaison avec le locus <i>has2</i>	78
2.12	Répartition des types d'ADN sur les 94 plantes sélectionnées pour leur phénotype chaud aux marqueurs de l'ensemble du génome utilisés pour la recherche de liaison avec le locus <i>has3</i>	80
2.13	Répartition des types d'ADN sur les 94 plantes sélectionnées pour leur phénotype chaud aux marqueurs du chromosome IV pour la recherche de liaison avec le locus <i>has3</i>	80
2.14	Répartition des types d'ADN sur les 193 plantes sélectionnées pour leur phénotype chaud aux marqueurs de l'ensemble du génome utilisés pour la recherche de liaison- avec le locus <i>has4</i>	81
2.15	Répartition des types d'ADN sur 92 plantes sélectionnées pour leur phénotype chaud aux marqueurs du chromosome IV pour la recherche de liaison avec le locus <i>has4</i>	81
4.1	Oligonucléotides utilisés pour l'étude du gène At5g61140	124

4.2	Oligonucléotides utilisés pour la PCR quantitative	127
4.3	Taille des fragments d'ADNc et génomique amplifiés par les couples d'amorces utilisés pour la PCR quantitative	128
4.4	Amorces utilisées pour le dCAPS	133
5	Oligonucléotides des marqueurs microsatellites répartis sur l'ensemble du génome utilisés pour la recherche de liaison	152
6	Oligonucléotides des marqueurs microsatellites sur le bras sud du chromosome V utilisés pour la cartographie du locus <i>has1</i>	152
7	Oligonucléotides des marqueurs microsatellites situés sur le bras nord du chromosome III utilisés pour la cartographie du locus <i>has2</i>	153
8	Oligonucléotides des marqueurs microsatellites situés sur le bras sud du chromosome IV utilisés pour la cartographie du locus <i>has3</i>	153
9	Oligonucléotides des marqueurs microsatellites et SNP situés sur le bras sud du chromosome IV utilisés pour la cartographie du locus <i>has4</i>	153
11	Gènes significativement différentiellement exprimés dans la rosette chez <i>aba3-1</i> par rapport au sauvage	160

Abbréviations

A, C, G, T : adénine, cytosine, guanidine, thymidine
ABA : acide abscissique
aba : mutant de biosynthèse de l'ABA
abi : mutant insensible à l'ABA
ABRE : ABA response element
ADN : acide désoxyribonucléique
ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire
ADP : adénosine diphosphate
ARN : acide ribonucléique
ARNm : acide ribonucléique messenger
ATP : adénosine triphosphate
BSA : bovine serum albumine
CDPK : cyclin dependent protein kinase
Col-0 : accession Columbia 0
COR : cold responsive
CTAB : bromure de cetyltriméthylammonium
dCAPS : derived cleaved amplified polymorphic sequence
ddNTP : didéoxynucléotides triphosphate
dNTP : déoxynucléotides triphosphate
DO : densité optique
DRE : dehydration response element
EDTA : éthylène diamine triacétique
EF : elongation factor
EMS : ethylméthylsulfonate
ERD : early responsive to dehydration
GA : gibbérellines
GDP : guanosine diphosphate
GMP : guanosine monophosphate
H : hétérozygote Col-0/*Ler*
has : *hot ABA-deficient suppressor*
HPLC : high pressure liquid chromatography
Hsf : heat-shock factor
Hsp : heat-shock protein
IR : infrarouge
JA : acide jasmonique
LB : Luria Bertani
LC-ESI-MS-MS : liquid chromatography electrospray ionisation tandem mass spectrometry
LEA : late embryogenesis abundant
Ler : accession Landsberg *erecta*

MAPK : mitogen activated protein kinase
MYB : myéloblastose
MYC : myélocytomatose
NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
pb : paire de bases
PCR, RT-PCR : polymerase chain reaction, reverse transcriptase-PCR
pH : potentiel hydrogène
PP : protein phosphatase
RD : responsive to drought
ROS : reactive oxygen species
SSC : citrate salin standard
SDS : sodium dodécylsulfate
SNP : single nucleotide polymorphism
SnRK : SNF1-related kinase
UV : ultraviolet
WT : génotype sauvage

Chapitre 1

Introduction

Malgré les progrès fantastiques des dernières décennies en matière d'agronomie, l'actualité récente a montré qu'il n'était pas encore possible d'assurer une production agricole suffisante pour alimenter la population mondiale. La crise énergétique risque d'aggraver encore cette situation, en requérant une production agronomique à but non alimentaire pour fournir des biocarburants. Il est donc crucial d'arriver à exploiter toutes les surfaces agricoles, y compris celles où les ressources en eau sont critiques et qui ne feront qu'augmenter avec le réchauffement climatique planétaire à venir. Pour pouvoir cultiver des plantes dans un environnement pauvre en eau, il faut d'abord comprendre en quoi consiste le mécanisme de réponse des plantes à la sécheresse, ce qui permettra de pouvoir ensuite l'améliorer. Un des meilleurs outils pour disséquer les réseaux de gènes contrôlant la tolérance à la déshydratation est la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. Les études de génétique directe et inverse sur cette espèce sont facilitées par la disponibilité de l'intégralité de la séquence de son génome, de banques de mutants d'insertion et les possibilités de transformation.

Le travail accompli pendant cette thèse a pour but d'apporter de nouveaux éléments dans la liste des gènes impliqués dans la signalisation du stress hydrique et ainsi de compléter quelques parties du schéma de régulation complexe que l'on devine à partir des recherches déjà effectuées. Cette introduction présente un résumé de celles-ci, intégrant en particulier les avancées récentes, qui permet de mieux comprendre la démarche adoptée pour ce projet et d'en analyser les résultats. Afin de faciliter un peu l'appréhension de ce sujet déjà très complexe, j'ai choisi de focaliser cette introduction sur les résultats obtenus sur *Arabidopsis thaliana*.

1.1 L'acide abscissique

1.1.1 L'acide abscissique : dans les plantes et ailleurs

L'acide abscissique, ou ABA, est un sesquiterpène (figure 1.1).

Cette hormone végétale a été isolée et identifiée dans les années 1960 en parallèle par deux groupes différents. L'un d'eux l'a nommée dormine, à cause de son action sur la dormance des bourgeons du sycamore (CORNFORTH et al., 1965), tandis que l'autre l'appelait abscissine parce qu'elle participait au mécanisme d'abscission du fruit du coton (Addicott et al., 1968). Ils se sont finalement mis d'accord pour lui donner le nom d'acide abscissique.

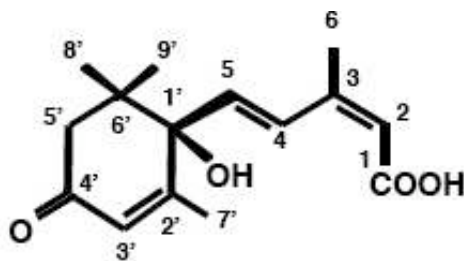


FIG. 1.1 – Formule semi-développée de l'acide abscissique

Depuis, l'acide abscissique a été identifié dans de nombreuses plantes, ce qui laisse à penser que c'est une hormone universelle chez les plantes vasculaires et les mousses. Dernièrement, une série de découvertes a montré que l'ABA avait également un rôle dans le règne animal, où ses mécanismes d'action avaient des similitudes avec ceux décrits chez les plantes, ce qui suggère que cette hormone a pu apparaître avant même la séparation entre les métazoaires et les métaphytes (Wasilewska et al., 2008).

1.1.2 Métabolisme de l'acide abscissique

1.1.2.1 L'ABA : un produit de clivage des caroténoïdes

Le précurseur de l'ABA est une molécule à 5 carbones, l'isopentenyl diphosphate (IPP), synthétisée dans le plaste à partir du glycéraldéhyde 3-phosphate et du pyruvate par la voie du méthylerythritol phosphate. Toujours dans le plaste, des additions et isomérisations successives mènent de l'IPP aux caroténoïdes, des pigments à 40 carbones (figure 1.2). Le premier d'entre eux est le phytoène qui est ensuite désaturé en lycopène. Deux cyclisations, à chaque extrémité de la molécule de lycopène permettent de produire le β -carotène, qui est hydroxylé en zéaxanthine (Liotenberg et al., 1999).

Les gènes impliqués dans la voie de biosynthèse de l'ABA en aval de la zéaxanthine ont été découverts grâce à l'étude de mutants déficients en ABA dans différentes espèces. Ainsi c'est un mutant de *Nicotiana plumbaginifolia* qui a permis d'identifier le gène *ABA2* (*ABA1* chez *Arabidopsis thaliana*) codant pour l'enzyme (zéaxanthine époxydase ou ZEP) catalysant la conversion de la zéaxanthine en violaxanthine. La transformation de la violaxanthine en xanthoxine peut se faire via la *trans*-néoxanthine ou la 9-*cis*-violaxanthine, par deux voies distinctes dont les mécanismes restent encore assez mystérieux. Néanmoins la récente identification du gène *ABA4* impliqué dans la synthèse de la *trans*-néoxanthine à partir de la violaxanthine apporte les premiers éléments d'une réponse, même si on ne sait pas encore s'il code bien pour une néoxanthine synthase (NSY) (North et al., 2007). La 9'-*cis*-néoxanthine produite à partir de la *trans*-néoxanthine et la 9-*cis*-violaxanthine sont clivées en xanthoxine (15 C) et en un apocaroténal à 25 carbones par une enzyme appelée 9-*cis* époxycaroténoïde dioxygénase (NCED), pour laquelle plusieurs gènes existent.

Les étapes suivantes se déroulent dans le cytoplasme de la cellule, en commençant par la déshydrogénation de la xanthoxine en aldéhyde abscissique, catalysée par *ABA2* chez *Arabidopsis*. C'est l'aldéhyde oxydase *AAO3* qui permet de convertir l'aldéhyde en acide abscissique (Nambara and

Marion-Poll, 2005). Un cofacteur à molybdène est nécessaire à l'activité de cette aldéhyde oxydase. La dernière étape de synthèse de ce cofacteur nécessite l'addition d'un atome de soufre par la sulfurase ABA3. L'absence de cette sulfuration chez les mutants *aba3* entraîne une déficience en ABA (Xiong et al., 2001c).

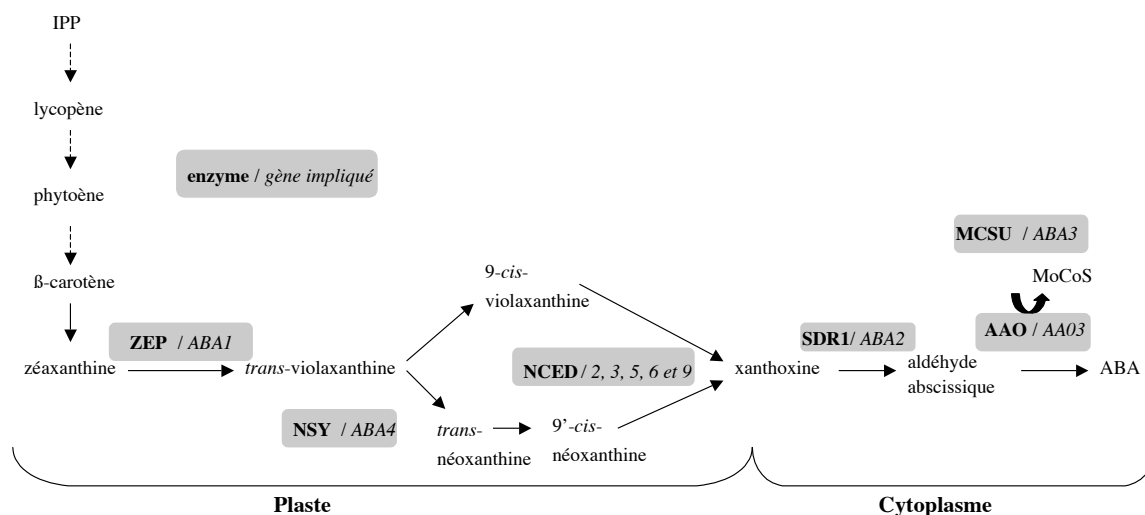


FIG. 1.2 – Biosynthèse de l'ABA, d'après Wasilewska et al. (2008) ; pour les étapes à partir de la zéaxanthine les enzymes et les gènes impliqués chez *Arabidopsis thaliana* sont indiqués. Les flèches en pointillés représentent plusieurs étapes. IPP : isopentenyl diphosphate ; ZEP : zéaxanthine époxydase ; NSY : néoxanthine synthase ; NCED : 9-*cis* époxycaroténoïde dioxygénase ; SDR : déshydrogénase à courte chaîne ; AAO : oxydase d'aldéhyde abscissique ; MoCoS : cofacteur à molybdène ; MCSU : sulfurase de cofacteur à molybdène.

1.1.2.2 Catabolisme de l'ABA : deux voies d'inactivation

L'ABA peut être catabolisé par deux processus différents : l'hydroxylation et la conjugaison.

Il existe trois voies d'hydroxylation de l'ABA, qui diffèrent par le groupement méthyl oxydé (sur les carbones 7', 8' ou 9'). La voie principale est celle de l'hydroxylation en 8' qui conduit après isomérisation à la production des acides phaséique et dihydrophaséique, les deux catabolites majeurs de l'ABA qui sont biologiquement inactifs. La réaction d'hydroxylation en 8' est catalysée par une monooxygénase à cytochrome P450 codée par les gènes *CYP707A* chez *Arabidopsis thaliana* (Nambara and Marion-Poll, 2005).

Les fonctions carboxyle et hydroxyle de l'ABA sont susceptibles d'être glycosylées. Les formes glycosylées de l'ABA sont elles aussi inactives. La plus courante d'entre elles est le glucose ester d'ABA (ABA-GE) ; il existe des indications chez plusieurs espèces que cette forme conjuguée de l'hormone serait utilisée pour le transport de l'ABA entre les différents organes de la plante (Nambara and Marion-Poll, 2005). Cette hypothèse est confortée par le fait que l'inactivation de l'ABA par glycosylation est réversible : le gène *AtBG1* (β -1,3-glucanase), identifié récemment, code pour une glucosidase capable d'hydrolyser l'ABA-GE dont l'action permet de contrôler de façon dynamique la teneur en ABA dans différentes conditions (Lee et al., 2006).

1.1.3 Rôles de l'acide abscissique

1.1.3.1 Une hormone majeure pour les semences

L'ABA commence à s'accumuler dans la graine lorsque celle-ci entame sa maturation, c'est-à-dire au moment où les cellules de l'embryon arrêtent de se multiplier pour grossir. Un premier pic d'ABA d'origine maternelle permet d'empêcher la germination de l'embryon avant que celui-ci ne soit mature. Un deuxième pic, lors duquel l'ABA est cette fois synthétisé par l'embryon, induit la dormance de la graine.

La maturation de la graine est également caractérisée par une accumulation des réserves et l'acquisition de la tolérance à la dessiccation. Ces deux processus sont principalement mis en place par l'induction de gènes, sous le contrôle de divers facteurs de transcription impliqués dans les voies de signalisation de l'ABA (ABI3 (ABA insensitive), ABI4, ABI5) et d'autres plus spécifiques de la graine (LEC1 (leafy cotyledon), LEC2, FUS3 (fusca)) (Finkelstein et al., 2002).

Un équilibre entre les effets inhibiteurs de l'ABA et les effets inducteurs des acides gibbérelliques contrôle la germination de la graine mature. Ainsi, une quantité, même faible d'ABA exogène, ou bien un inhibiteur de la synthèse des gibbérellines tel que le paclobutrazol empêchent la graine de germer (Finkelstein et al., 2008).

1.1.3.2 Un effet ambigu sur la croissance

Une concentration élevée en ABA, y compris en ABA exogène, a un effet inhibiteur sur la croissance dû à la fois à une diminution de l'extensibilité cellulaire (Kutschera and Schopfer, 1986) et à une inhibition de la division cellulaire (Liu et al., 1994). Néanmoins, le fait que les mutants déficients dans la synthèse de l'ABA présentent une croissance réduite (même en l'absence de stress hydrique) montre qu'à une plus faible concentration l'ABA a un effet positif sur la croissance (Barrero et al., 2005). Il est possible que le nanisme des plantes déficientes en ABA soit causé par une plus grande concentration en éthylène, l'accumulation de celui-ci étant en temps normal inhibée par l'ABA (Finkelstein et al., 2002).

Cette bivalence de l'effet de l'ABA est également observée en ce qui concerne la croissance racinaire. Lorsqu'il est suffisamment concentré, l'ABA joue le rôle d'antagoniste de l'auxine en inhibant l'élongation de la racine, mais à de plus faibles concentration l'ABA peut induire la croissance des racines (Himmelbach et al., 1998).

1.1.3.3 L'acteur principal de la tolérance aux stress abiotiques

La sécheresse, une forte salinité du sol et le froid sont des conditions environnementales défavorables auxquelles la plante doit s'adapter. Ce sont les stress abiotiques auxquels la plante est le plus souvent confrontée, et donc les plus étudiés. Ils conduisent tous à un déficit hydrique cellulaire, c'est pourquoi leurs voies de signalisation ont de nombreux éléments communs. En particulier, chacun d'entre eux peut provoquer l'augmentation de la teneur en ABA dans la plante : c'est l'hormone principale permettant de réguler la tolérance à ces stress. Un de ses rôles principaux est de maintenir l'homéostasie osmotique des cellules, grâce la fermeture des stomates et à l'induction de gènes de

tolérance au stress hydrique. Les mécanismes mis en jeu lors de la réponse à une déshydratation sont détaillés dans la partie 2 de cette introduction.

La réponse aux stress abiotiques est souvent considérée comme le rôle majeur de l'ABA. Cette assertion est justifiée par le fait que le phénotype principal des mutants déficients en ABA est leur sensibilité au stress hydrique (Zhu, 2002).

1.1.3.4 L'outsider de la réponse aux pathogènes

La réponse des plantes aux pathogènes est contrôlée par un réseau de signalisation complexe mettant en jeu les actions antagonistes et synergiques de trois hormones principales : l'acide salicylique (SA), l'acide jasmonique (JA) et l'éthylène. Des études récentes ont montré que l'ABA participait également aux voies de signalisation du stress biotique, mais son rôle n'a pas encore pu être défini avec précision. Face à l'attaque par de nombreux pathogènes, des mutants déficients en ABA gagnent en résistance alors qu'une augmentation de la concentration en ABA semble provoquer une plus grande sensibilité. Il semble donc que l'ABA ait un effet négatif sur la résistance au stress biotique (Mauch-Mani and Mauch, 2005). Les mécanismes de cette action restent encore mal élucidés, mais les premiers éléments de réponse montrent que l'ABA agirait de façon antagoniste sur les voies de signalisation de l'acide salicylique (Mauch-Mani and Mauch, 2005) et du méthyl-jasmonate (Anderson et al., 2004). Il apparaît de plus en plus clairement que les voies de signalisation de l'ABA et du stress biotique sont interconnectées à plusieurs niveaux : ils partagent des éléments de signalisation, tels que le facteur de transcription AtMYC2 (Anderson et al., 2004), les MAPK (mitogen-activated protein kinase) ou les dérivés actifs de l'oxygène (Fujita et al., 2006) (voir paragraphe 1.2.2) ; de plus, il existe un nombre non négligeable de gènes (dépendant du type de pathogène) répondant à la fois à l'ABA et au stress biotique. La résolution du rôle de l'ABA en réponse au stress biotique est compliquée par le fait qu'il semble dépendre du pathogène : l'effet de l'ABA sur la résistance à certains virus du tabac peut être positif (Mauch-Mani and Mauch, 2005).

1.1.4 Quelques éléments de la signalisation de l'acide abscissique

L'étude des voies de signalisation de l'ABA ne peut être dissociée des différents processus dans lesquels cette hormone est impliquée. Ainsi, ce sont les mécanismes de la germination et de la réponse au stress hydrique, et en particulier la fermeture stomatique (pour l'aspect cellulaire) qui ont permis d'avancer dans le décryptage des voies de signalisation de l'ABA. Il paraît donc difficile de traiter la tolérance des plantes à la déshydratation indépendamment de la signalisation de l'ABA (et vice-versa). C'est pourquoi la majorité des différents aspects de la signalisation de l'ABA seront explicités dans la deuxième partie de cette introduction, en liaison avec la réponse à la déshydratation, et seuls la perception de l'ABA et l'implication des régulations post-transcriptionnelles seront décrits dans les paragraphes qui suivent.

1.1.4.1 La quête des récepteurs de l'ABA

La première étape de toute voie de signalisation est la perception. Même si cette hormone a été découverte il y a plusieurs dizaines d'années, les recherches sur les mécanismes de perception de

l'ABA ont jusqu'à très récemment été peu fructueuses. Un des seuls faits établis était l'existence à la fois d'une perception intracellulaire et extracellulaire (Finkelstein et al., 2002). Cette multiplicité des types de perception a été confirmée grâce à des tests utilisant des analogues de l'ABA qui ont démontré l'existence d'une diversité de récepteurs de l'ABA, celle-ci étant probablement liée à la diversité des voies de signalisation de l'ABA (Huang et al., 2007). Une telle multiplicité de récepteurs est probablement corrélée à une redondance fonctionnelle qui expliquerait pourquoi, alors que des approches génétiques ont permis d'identifier des récepteurs pour les cytokinines (Inoue et al., 2001) et les brassinostéroïdes (Clouse et al., 1996; He et al., 2000), une telle démarche n'a jusqu'à maintenant donné aucun résultat pour l'ABA. Cela n'a pas empêché un récent bond en avant puisqu'une approche alternative, la recherche de protéines ayant une grande affinité pour l'ABA, a permis en moins de trois ans de mettre à jour trois récepteurs potentiels de l'ABA. La recherche sur la perception de l'ABA a néanmoins encore de beaux jours devant elle car de nombreuses questions concernant ces récepteurs putatifs restent posées, en particulier leur place en relation avec les éléments de la signalisation de l'ABA déjà connus et le fait qu'ils se lient à l'ABA avec une haute affinité, ce qui ne leur permet pas de distinguer les fortes concentrations en ABA (lors d'un stress) des concentrations plus faibles (en l'absence de stress) (McCourt and Creelman, 2008). Il semble par ailleurs assez certain que d'autres récepteurs restent encore à découvrir (Verslues and Zhu, 2007).

1.1.4.1.1 FCA un médiateur de l'action de l'ABA sur la floraison Une protéine nommée ABAP1 (ABA binding protein), liant l'ABA, a été identifiée grâce à un crible d'une banque d'expression d'ADNc de l'orge par un anticorps anti-idiotypique d'un anticorps anti-ABA (Razem et al., 2006). Le plus proche homologue chez *Arabidopsis* du gène *ABAP1* est *FCA*. La protéine FCA est une protéine nucléaire capable de se lier à l'ARN impliquée dans la régulation de la floraison. En association avec une autre protéine, FY, elle réprime l'accumulation de son propre ARNm, ainsi que celui du gène *FLC* (flowering locus C), un facteur de transcription réprimant la transition florale. *In vitro*, FCA se lie fortement à l'ABA et l'ABA inhibe l'interaction entre FCA et FY, même si les sites de liaison de FY et de l'ABA sur FCA ne sont pas exactement les mêmes. Cela explique pourquoi l'ABA exogène inhibe la floraison : il empêche le complexe FCA-FY de se former ce qui augmente la quantité d'ARNm de *FLC*. On comprend également mieux pourquoi les mutants déficients en ABA présentent une floraison précoce. Le mutant *fca-1* n'est pas affecté dans la fermeture stomatique, ni à la germination (mais un peu dans son architecture racinaire) et le gène *FCA* ne semble pas participer aux voies de signalisation dans lesquelles les gènes *ABI* (voir paragraphe 1.2.4) sont impliqués, ce qui paraît indiquer que ce récepteur de l'ABA joue un rôle dans une voie de signalisation distincte de celles liées à la tolérance au stress hydrique et à la germination.

1.1.4.1.2 CHLH : un récepteur chloroplastique impliqué dans plusieurs mécanismes dépendants de l'ABA Ce récepteur a été identifié chez *Arabidopsis* à cause de sa similitude à une protéine liant l'ABA purifiée à partir de feuilles de *Vicia faba* (Shen et al., 2006). Le gène *CHLH* (chélatase H) code pour une protéine chloroplastique, la sous-unité H de la Mg-chélatase, déjà connue pour être impliquée dans la biosynthèse de la chlorophylle et dans la signalisation entre le plaste et le noyau. La liaison de la protéine CHLH à l'ABA a été démontrée *in vitro* et

possède les caractéristiques d'une liaison récepteur-ligand. Des sous-expresssurs de *CHLH* montrent un phénotype d'insensibilité à l'ABA à la germination, dans le processus d'arrêt de croissance post-germinatif impliquant l'ABA et dans la fermeture stomatique, tandis que des surexpresssurs sont hypersensibles à l'ABA pour ces mêmes mécanismes, ce qui suggère que CHLH est un régulateur positif dans la signalisation de l'ABA. Ce rôle de CHLH dans la signalisation de l'ABA semble indépendant de son activité dans la synthèse de la chlorophylle. Même si les caractéristiques de la protéine CHLH et les phénotypes des plantes affectées dans l'expression du gène sont en adéquation avec sa fonction de récepteur de l'ABA, il reste à déterminer comment une protéine chloroplastique peut interagir avec les autres éléments connus des voies de signalisation de l'ABA.

1.1.4.1.3 Un récepteur de l'ABA couplé à une protéine G : une hypothèse à valider

Le système d'un récepteur membranaire couplé à une protéine G formée de trois sous-unités, G_α , G_β et G_γ , est décrit assez généralement dans la signalisation hormonale des animaux. Dans ce modèle, la liaison du ligand au domaine extracellulaire du récepteur provoque le démantèlement de la protéine G en G_α et un complexe G_β/G_γ et la libération d'un GDP. La transduction du signal est assurée par les sous-unités libérées de la protéine G.

En l'absence d'une autre piste pour un récepteur extracellulaire de l'ABA, il était intéressant de voir si ce système était également utilisé pour la perception de cette hormone. La seule sous-unité G_α identifiée chez *Arabidopsis* a été nommée GPA1 (G protein α -subunit). L'étude de GPA1 et d'un potentiel récepteur associé, GCR1 (G protein coupled receptor), a montré que les deux protéines interagissaient et étaient impliquées dans la signalisation de l'ABA pour la germination et dans les cellules de garde mais aucun résultat n'a montré un rôle de récepteur pour GCR1 (Pandey et al., 2006).

Il a fallu attendre qu'un autre récepteur couplé à GPA1 soit identifié pour franchir le pas (Liu et al., 2007). D'après les auteurs, GCR2 est une protéine transmembranaire dont le gène présente une homologie avec les récepteurs couplés à une protéine G, interagissant *in vitro* et *in vivo* avec GPA1 et liant l'ABA avec les mêmes caractéristiques qu'un récepteur. De plus la liaison de l'ABA à GCR2 provoque la dissociation du complexe GPA1/GCR2, en correspondance avec le modèle des protéines G. Les mutants affectés dans le gène *GCR2* ont des phénotypes d'insensibilité partielle à l'ABA à la germination, lors de la croissance et pour le fonctionnement des stomates, tandis que des surexpresssurs ont les phénotypes d'hypersensibilité correspondants. Toutes ces données semblent indiquer que GCR2 est un récepteur extracellulaire de l'ABA, excepté que les mutants *gcr2* montrent une sensibilité résiduelle à l'ABA, ce que les auteurs attribuent à une redondance fonctionnelle avec deux homologues de *GCR2*. Pourtant, la communauté scientifique ne semble pas entièrement convaincue. D'abord, il semble que la séquence de *GCR2* soit plus proche de celle d'une lanthionine synthase que de celle d'un récepteur couplé à une protéine G (Verslues and Zhu, 2007). Mais surtout, une autre équipe a démontré que ni *GCR2* ni ses deux homologues n'étaient impliqués dans la signalisation de l'ABA pour la germination (Guo et al., 2008). La validité de GCR2 en tant que récepteur extracellulaire de l'ABA n'est donc pas encore reconnue.

1.1.4.2 Le métabolisme des ARNm ouvre de nouvelles perspectives

Depuis le début des années 2000, une nouvelle catégorie de gènes impliqués dans la signalisation de l'ABA a pris une ampleur grandissante : ce sont les régulateurs post-transcriptionnels. Une bonne illustration est le premier récepteur à l'ABA identifié : FCA (voir paragraphe 1.1.4.1.1), qui agit sur la stabilité des ARNm.

Le complexe de liaison à la coiffe des ARNm semble être un des éléments du métabolisme des ARNm qui participe à la réponse à l'ABA. En effet, une mutation dans l'un ou l'autre des gènes codants pour une de ses sous-unités, CBP80 (cap binding protein) ou CBP20, confère une hypersensibilité à l'ABA à la germination et au niveau des stomates et une meilleure résistance à la déshydratation (Hugouvieux et al., 2001; Papp et al., 2004).

De façon inattendue, le mutant *sad1* (supersensitive to ABA and drought), affecté dans une protéine Lsm pouvant avoir un rôle dans l'épissage, l'exportation ou le décoiffage des ARNm, est également hypersensible à l'ABA mais présente une mauvaise tolérance à la déshydratation, et une accumulation accrue d'ABA (Xiong et al., 2001b). Le mutant *ahg2-1* (ABA hypersensitive germination) est lui aussi hypersensible à l'ABA et montre une accumulation accrue de l'hormone et en plus surexprime des gènes de réponse à l'ABA et aux stress abiotiques. La fonction du gène *AHG2* est un peu plus claire que celle de *SAD1*, c'est une ribonucléase spécifique des poly-A probablement impliquée dans la dégradation des ARNm (Nishimura et al., 2005).

Un autre mutant de réponse à l'ABA, *lba1* (low level β -amylase), est affecté dans la dégradation des ARNm (Yoine et al., 2006). Ce mutant est, comme les précédents, hypersensible à l'ABA à la germination, mais aussi au glucose ; il présente une floraison précoce et sa croissance est sensible aux jours courts. Le gène *LBA1* code pour une hélicase à ARN UPF1 qui permet la dégradation d'ARN par NMD (nonsense-mediated RNA decay). Une autre hélicase à ARN impliquée dans la signalisation de l'ABA a été identifiée : il s'agit de LOS4 (low expression of osmotically responsive genes), une hélicase à DEAD-box permettant l'export d'ARNm (Gong et al., 2005). Le mutant *los4-2* est hypersensible à l'ABA et à la chaleur mais plus résistant au froid et au gel, il fleurit précocement et est insensible à la vernalisation en jour court. Deux autres hélicases à DEAD-box participent à la réponse à plusieurs stress abiotiques (par des voies dépendantes et indépendantes de l'ABA) et à l'ABA, elles ont été nommées STRS1 et 2 (stress response suppressor) ; leur fonction précise est encore inconnue (Kant et al., 2007).

La régulation post-transcriptionnelle par les microARN participe également à la signalisation de l'ABA. Une mutation dans le gène *HYL1* (hyponastic leaves), codant pour une protéine se liant aux ARN double brin impliquée dans le métabolisme des microARN, provoque une hypersensibilité à l'ABA (Han et al., 2004). De plus, l'expression du microARN 159 est induit par l'ABA, et il est capable de cliver les ARNm de deux facteurs de transcription MYB, identifiés comme des régulateurs positifs de la réponse à l'ABA (Reyes and Chua, 2007).

Notons que les mutants dans les gènes précédemment décrits ont en commun de présenter des phénotypes pléiotropiques (germination, floraison, fermeture stomatique, tolérance aux stress abiotiques, croissance) souvent liés à une sensibilité modifiée à l'ABA.

Une explication possible pour l'importance du contrôle post-transcriptionnel dans la signalisation

de l'ABA est que celle-ci s'appuyant sur un réseau complexe requérant des changements sévères dans l'expression de nombreux gènes, et donc une régulation fine du traitement des ARNm, un défaut dans ce processus a de grandes chances d'affecter la réponse à l'ABA (Hirayama and Shinozaki, 2007).

1.2 Les mécanismes de tolérance des plantes à la déshydratation

Les principales conséquences d'une déshydratation sur une plante sont un stress osmotique et un stress oxydatif : un déficit en eau conduit à une plus grande concentration des solutés dans le cytoplasme et à la production de dérivés actifs de l'oxygène (ou ROS pour reactive oxygen species) principalement au niveau du chloroplaste. Ces deux types de stress endommagent les protéines et les structures cellulaires. La première réaction de la plante est d'empêcher ces dommages, d'abord en essayant de conserver au maximum son eau grâce à la fermeture des stomates, puis en optimisant l'apport en eau par une augmentation de la taille de son système racinaire ; au niveau cellulaire, un ajustement osmotique est mis en place, ainsi que des moyens de contrôler et réparer les dommages induits par le stress. Enfin, un arrêt de la croissance des parties végétatives permet probablement d'économiser les ressources de la plante pour optimiser les processus de réponse et de récupération à la fin du stress.

D'un point de vue temporel, la signalisation du stress commence par sa perception, puis des changements de concentration en Ca^{2+} et l'accumulation de messagers (parmi lesquels on peut inclure l'ABA) induisent des cascades de phosphorylation/déphosphorylation qui modulent l'action de facteurs de transcription pour aboutir à des changements d'expression des gènes de réponse au stress (Xiong et al., 2002b).

1.2.1 Perception du stress hydrique

Plusieurs stimuli physico-chimiques sont associés à une déshydratation (changements d'osmolarité dans le sol, d'humidité relative de l'air...). Il est probable qu'il existe des senseurs permettant de détecter chacune de ces différentes composantes, l'hypothèse d'un unique senseur est donc peu envisagée (Xiong et al., 2002b).

Comme la perception des différents types de stress hydrique (froid, salin, déshydratation) induit un afflux d'ions Ca^{2+} dans les cellules, les canaux de transport du Ca^{2+} font de bons candidats comme senseurs, mais aucun n'a pour l'instant été identifié comme tel.

Chez la levure, l'histidine kinase transmembranaire SNL1 (suppressor of nup116-C lethal) joue le rôle d'osmosenseur dans un système à deux composants qui permet de déclencher une cascade de phosphorylations (Posas et al., 1996). L'histidine kinase AtHK1 d'*Arabidopsis* est capable de compléter des mutations dans *SLN1* et d'activer une MAPK impliquée dans la cascade de phosphorylation suivant la perception d'un stress osmotique par la levure, ce qui suggère qu'AtHK1 possède une fonctionnalité d'osmosenseur. De plus, chez *Arabidopsis*, l'expression d'*AtHK1* est plus importante dans les racines et est induite par des changements d'osmolarité (Urao et al., 1999). Une étude récente a montré qu'AtHK1 intervenait dans une voie ABA-dépendante de la signalisation du stress osmotique et avait un rôle dans la maturation de la graine (pendant laquelle elle acquiert une tolérance à la dessiccation), elle interviendrait notamment dans la régulation de la biosynthèse de l'ABA (Wohlbach et al., 2008). AtHK1 est donc un bon candidat pour assurer le rôle d'osmosenseur dans une voie ABA-dépendante, mais il reste encore à déterminer à quels composants elle transmet le signal perçu.

1.2.2 Régulations métaboliques en réponse à la déshydratation

1.2.2.1 Contrôle de la teneur en ABA

L'accumulation d'ABA dans la plante induite par une déshydratation est due à la fois à une augmentation de sa biosynthèse et à des modifications dans son catabolisme, régulé par le stress de façon plus subtile qu'un simple ralentissement de la dégradation.

La plupart des gènes de biosynthèse de l'ABA à partir des caroténoïdes sont induits par la déshydratation. L'étude de l'expression du gène *ABA2* codant pour la ZEP chez *N. Plumbaginifolia* a montré qu'il était induit dans les racines par un stress osmotique (Audran et al., 1998). Les gènes *AtAA03* et *AtABA3* sont également plus exprimés en conditions de stress osmotique (Xiong et al., 2001c), mais ce n'est pas le cas pour *AtABA2* (Cheng et al., 2002). L'étape la plus importante pour augmenter la biosynthèse de l'ABA semble être le clivage des caroténoïdes. Chez *Arabidopsis*, le gène *NCED3* paraît crucial dans cette étape limitante lors d'une déshydratation : il est plus fortement induit que les autres *NCED* en réponse à ce stress (Tan et al., 2003) et sa surexpression augmente nettement la biosynthèse de l'ABA et la tolérance à la déshydratation tandis que sa sous-expression a l'effet inverse (Iuchi et al., 2001). Si l'on sait que le clivage des caroténoïdes est une étape essentielle de la régulation de la biosynthèse de l'ABA en réponse à la déshydratation, on peut se demander quel dérivé de la néoxanthine est préférentiellement utilisé dans cette situation, la 9'-*cis*-néoxanthine, ou bien la 9-*cis*-violaxanthine. Une première réponse a été fournie suite à l'identification du gène *ABA4* impliqué dans la synthèse de la *trans*-néoxanthine à partir de la violaxanthine (North et al., 2007) : le fait que des teneurs en ABA significativement réduites aient été mesurées chez le mutant *aba4* déshydraté, alors qu'en conditions normales elles sont très proches de celles du sauvage, montre que la voie de biosynthèse de l'ABA passant par la *trans*-néoxanthine est utilisée pour l'accumulation d'ABA en réponse à une déshydratation. Un candidat pour la régulation de la biosynthèse de l'ABA en réponse à la déshydratation est le gène *XERICO* (Ko et al., 2006). Il est induit par les stress salin et osmotique, et sa surexpression augmente et accélère l'induction du gène *NCED3* en conditions de stress hydrique, ce qui cause une augmentation de la teneur en ABA dans la plante et une meilleure résistance à la déshydratation.

L'accumulation d'ABA ne résultant pas seulement d'une biosynthèse accrue, il semblerait logique que les différentes voies de son catabolisme soient inhibées par une déshydratation. Ce n'est pourtant pas nécessairement le cas : en effet, lorsque la teneur en ABA augmente, celle en acide phaséique également (Nambara and Marion-Poll, 2005) et les *CYP707A* responsables de l'hydroxylation de l'ABA sont induites par la déshydratation et l'ABA (Saito et al., 2004). Une étude plus précise du gène *CYP707A3* a montré qu'il codait pour l'hydroxylase majeure de la voie d'hydroxylation de l'ABA en réponse au stress, que son induction par une déshydratation était lente et qu'il répondait aussi à une réhydratation (Umezawa et al., 2006). Ceci suggère que l'hydroxylation est la voie qui permet d'inactiver l'ABA accumulé à la fin de la déshydratation. D'un autre côté, la remobilisation d'ABA glycosylé pourrait contribuer à l'augmentation rapide de la teneur en ABA lors d'une déshydratation chez *Arabidopsis* : il a en effet été montré qu'une déshydratation induisait rapidement la polymérisation de la β -glucosidase AtBG1, ce qui permettait d'augmenter sa capacité à transformer les stocks d'ABA conjugué inactif en ABA actif (Lee et al., 2006), même si ces stocks

ne sont pas assez importants pour expliquer à eux seuls le pic de teneur en ABA.

Une nouvelle technique permettant de visualiser les stocks d'ABA actif par l'expression de luciférase dans la plante a montré que lors d'une déshydratation du sol, l'ABA s'accumulait au niveau des feuilles et non des racines. Il semblerait que contrairement à l'idée communément admise qu'une déshydratation perçue par les racines y induit une accumulation d'ABA ensuite transporté vers les parties végétatives, se serait un signal hydraulique venant des racines qui provoquerait l'augmentation des teneurs en ABA des feuilles (Christmann et al., 2005, 2007). L'hypothèse d'une synthèse d'ABA dans les feuilles est confortée par une étude des sites de biosynthèse de l'ABA en conditions de déshydratation, utilisant des anticorps contre NCED3, ABA2 et AAO3, qui a détecté ces enzymes exclusivement dans les cellules du parenchyme vasculaire (Endo et al., 2008).

1.2.2.2 Ajustement osmotique

Afin de se protéger contre un stress osmotique, les plantes synthétisent en grande quantité des solutés compatibles : ce sont des molécules non toxiques qui s'accumulent majoritairement dans le cytoplasme et qui n'interfèrent pas avec le métabolisme normal. Leur rôle principal est de préserver la turgescence de la cellule en maintenant une osmolarité intracellulaire égale à l'osmolarité cellulaire, ce qui évite un efflux d'eau de la cellule, mais ils ont aussi d'autres fonctions de protection pour la cellule.

L'accumulation de sucres tels que le saccharose, le tréhalose, des hexoses, des oligosaccharides de la famille du raffinose et des polyols est obtenue le plus souvent par une hydrolyse accrue de l'amidon. En plus de leur rôle d'osmolytes, les sucres pourraient protéger des macromolécules, stabiliser les structures membranaires en interagissant avec les groupements polaires des phospholipides et lutter contre les effets des ROS. Il est également possible qu'ils participent au phénomène de vitrification des cellules.

Un autre soluté compatible majeur est la proline. Cet acide aminé est synthétisé à partir du glutamate et s'accumule en conditions de stress osmotique (Delauney et al., 1993). La proline a probablement de nombreuses fonctions dans la protection de la cellule contre les effets du stress osmotique, telles que la stabilisation des structures cellulaires, la prévention des effets des ROS et elle pourrait même participer à la signalisation du stress (Nanjo et al., 1999).

Enfin, certaines amines telles que la spermidine, la putrescine, la spermine et la glycine bêtaïne (celle-ci n'étant pas synthétisée par *Arabidopsis*) sont également utilisées comme osmolytes. Comme les composés précédemment décrits, leur rôle ne se limite probablement pas à celui de solutés compatibles, mais leurs autres propriétés permettant de lutter contre les effets du stress osmotique ne sont pas encore bien documentées (Seki et al., 2007).

1.2.3 La fermeture stomatique en réponse à l'ABA

Les stomates, situés sur l'épiderme des plantes, sont constitués de deux cellules de garde entourant un pore microscopique, l'ostiole. Leur rôle est de permettre l'entrée de dioxyde de carbone utilisé par la photosynthèse et de laisser sortir de l'eau sous forme de vapeur (phénomène de transpiration) et le dioxygène produit par la photosynthèse. L'ouverture des stomates doit être subtilement

régulée afin d'assurer un approvisionnement suffisant en dioxyde de carbone tout en s'adaptant aux conditions de disponibilité hydrique en minimisant la perte en eau lorsque c'est nécessaire, c'est pourquoi les cellules de garde qui contrôlent la taille de l'ostiole sont capables de répondre de façon dynamique et rapide à toute une série de stimuli en relation avec la photosynthèse et les ressources en eau, tels que la lumière, la concentration en dioxyde de carbone, le déficit de vapeur d'eau, le contenu en eau du sol et l'ABA (Nilson and Assmann, 2007).

Le changement de taille de l'ostiole est provoqué par une augmentation/diminution de la turgescence des cellules de garde dues à des afflux/efflux d'eau. Ces derniers résultent de variations de pression osmotique causées par des entrées/sorties d'osmolytes de la cellule. Ainsi, l'ouverture des stomates en réponse à la lumière est provoquée par une entrée de K^+ , d'anions et de saccharose, tandis que leur fermeture en réponse à l'ABA est due à une sortie d'anions et de K^+ .

Étant donné que la conservation des ressources en eau de la plante lors d'un stress hydrique est principalement due à la fermeture des stomates par l'intermédiaire de l'ABA, ce processus sera le seul décrit ici. Il met en jeu un réseau de plus de 40 composants déjà identifiés (enzymes, protéines de signalisation, transporteurs membranaires, messagers secondaires) avec de nombreuses interactions croisées (Li et al., 2006b). Il n'est pas possible d'en décrire ici l'intégralité, c'est pourquoi seuls les résultats les plus importants et les mieux validés, provenant de l'étude de plusieurs plantes modèles pour l'étude des stomates, seront présentés ici. Néanmoins, on peut distinguer des étapes majeures dans ce mécanisme, dont les acteurs principaux seront détaillés dans la suite : l'ABA régule l'activité de kinases et phosphatases, induit la production de ROS et provoque des pics de concentration en Ca^{2+} cytosolique ($[Ca^{2+}]_{cyt}$) qui ont pour effet d'inhiber des pompes à proton membranaires et des canaux d'entrée de K^+ et d'activer des canaux de sortie d'anions. L'efflux d'anions provoque alors une dépolarisation de la membrane plasmique qui active des canaux de sortie de potassium, aboutissant à la fermeture du stomate (Schroeder et al., 2001). L'essentiel des événements et des acteurs de la fermeture stomatique en réponse à l'ABA, ainsi que leurs relations, sont résumés dans la figure 1.3.

1.2.3.1 Signalisation de la fermeture stomatique

1.2.3.1.1 Des sphingolipides aux ROS Les sphingolipides semblent jouer un rôle en amont dans la voie de signalisation de l'ABA conduisant à la fermeture des stomates grâce à la production d'acide phosphatidique. En effet, l'ABA active la sphingosine kinase, qui produit la sphingosine-1-phosphate (Coursol et al., 2003). Celle-ci agit en amont de GPA1 et GCR1 (voir paragraphe 1.1.4.1) pour induire la fermeture stomatique (Pandey et al., 2006). Dans les cellules de garde, GCR1 pourrait être un régulateur négatif de l'activité de GPA1 (Pandey et al., 2004), qui interagit avec la phospholipase $D\alpha 1$ ($PLD\alpha 1$) (Mishra et al., 2006). L'acide phosphatidique produit par la $PLD\alpha 1$ inhibe l'activité de la PP2C (proteine phosphatase 2C de sérine/thréonine) ABI1 (Zhang et al., 2004). Cette phosphatase semble jouer un rôle clé dans la signalisation de l'ABA dans les cellules de garde. Elle participe à une boucle de régulation avec les ROS puisqu'elle est inactivée par l'eau oxygénée (et par extension les ROS) (Meinhard and Grill, 2001) mais est elle-même capable d'inhiber la production de ROS (Murata et al., 2001). Son partenaire dans cette boucle semble être

la kinase à sérine/thréonine OST1 (open stomata) (aussi appelée SnRK2E (SNF1 related kinase) ou SnRK2-6) activée par l'ABA et capable d'activer la synthèse de ROS (Mustilli et al., 2002; Yoshida et al., 2002). En effet, chez le mutant dominant *abi1-1* l'activation par l'ABA d'OST1 est supprimée et il a été montré que le domaine II de la partie C-terminale d'OST1 interagissait avec ABI1 dans un test de double-hybride chez la levure (Yoshida et al., 2006a), ce qui suggère la possibilité que OST1 soit un substrat de ABI1.

1.2.3.1.2 Le Ca^{2+} , un acteur majeur de la signalisation Deux mécanismes sont responsables de l'augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$: l'afflux de cet ion depuis l'extérieur et la libération de stocks intracellulaires.

L'accumulation de ROS, produits par les NADPH oxydases dont les sous-unités sont codées par les gènes *AtRbohD* et *AtRbohF* (respiratory burst oxidase homologue), est majoritairement responsable de l'activation des canaux d'entrée de Ca^{2+} situés sur la membrane plasmique (Kwak et al., 2003). La farnesyltransférase ERA1 (enhanced response to ABA) paraît être un régulateur négatif des canaux de la membrane plasmique d'entrée du Ca^{2+} puisque le mutant *era1-2* montre une plus forte augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ en réponse à l'ABA, liée à une plus grande sensibilité à l'ABA des canaux plasmiques du Ca^{2+} (Allen et al., 2002). Les intermédiaires de cette action ne sont pas encore connus, mais il semble que la phosphatase 2C ABI2 ait un rôle.

Le relargage du Ca^{2+} intracellulaire est déclenché par plusieurs messagers secondaires. L'un d'eux est l'inositol 1,4,5-triphosphate (InsP3) qui est produit en réponse à l'ABA par la phospholipase C (PLC), elle-même activée par le Ca^{2+} (Hunt et al., 2003). Un autre inositol, le myo-inositol hexakisphosphate (InsP6) semble impliqué dans la libération du Ca^{2+} vacuolaire (Lemtiri-Chlieh et al., 2003). Un canal vacuolaire de sortie lente du Ca^{2+} , impliqué dans la fermeture stomatique, a été découvert : il s'agit de TPC1 (two-pore channel 1) qui est activé par une augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ (Peiter et al., 2005).

1.2.3.2 Les mécanismes de fermeture stomatique

1.2.3.2.1 L'efflux d'anions Le calcium est responsable de l'activation de canaux de sortie d'anions dépendants du voltage (Hedrich et al., 1990), dont il existe deux types, un qui est activé transitoirement et désactivé rapidement (canaux de type R) et un autre qui est activé lentement et de façon continue (canaux de type S) (Schroeder and Keller, 1992). Quatre-vingt dix pourcents du K^+ qui sort des cellules de garde provient de stocks vacuolaires ; il est libéré à travers des canaux indépendants du voltage activés par l'augmentation de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ (Ward and Schroeder, 1994).

Deux protéines kinases dépendantes du calcium (CDPK), CPK3 et 6, ont été identifiées pour leur rôle dans la fermeture stomatique : elles sont impliquées dans l'activation des canaux de sortie d'anions de type S. Elles pourraient permettre un « priming » de senseurs de Ca^{2+} en réponse à l'ABA qui les préparerait à répondre à l'augmentation de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ (Mori et al., 2006).

ABI1 a une influence sur les canaux de sortie d'anions puisque chez le mutant dominant *abi1-1* l'efflux d'anions et la fermeture stomatique en réponse à l'ABA sont supprimés (Pei et al., 1997)

Une protéine membranaire ayant des similitudes avec un transporteur de dicarboxylate/ acide malique de champignon et bactérie, SLAC1 (slow anion channel associated) est impliquée dans les

courants de sortie lente d'anions en réponse en particulier à l'ozone, l'ABA (Vahisalu et al., 2008) et au dioxyde de carbone (Negi et al., 2008) et a de forte chance d'être un des principaux canaux anioniques des stomates.

Les transporteurs ABC (ATP-binding cassette) pourraient être impliqués dans l'activation de canaux de transport ionique. Deux d'entre eux, AtMRP4 et 5 (multidrug resistance protein) participent à la régulation stomatique (Klein et al., 2004). En particulier, le mutant *mrp5-1* est insensible à l'ABA pour la fermeture stomatique (Klein et al., 2003). AtMRP5 est localisée dans la membrane plasmique et semble avoir un rôle dans l'activation des canaux de type S de sortie d'anions et des canaux calciques membranaires (Suh et al., 2007).

1.2.3.2.2 Dépolarisation de la membrane plasmique Les pompes à protons H^+ -ATPase, situées sur la membrane plasmique, participent à l'ouverture des stomates induite par la lumière. Chez *Vicia Faba*, l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_{cyt}$ inhibe ces pompes à protons (Kinoshita et al., 1995) ainsi que des canaux d'entrée du K^+ (Schroeder and Hagiwara, 1989), qui sinon empêcheraient la dépolarisation de la membrane. Des mutations dans la H^+ -ATPase AHA1 causant une activation constitutive de la pompe rendent les stomates insensibles à l'ABA et à une hyperpolarisation de la membrane plasmique. AHA1 semble faire partie d'une des voies de fermeture stomatique en réponse à l'ABA, devant être inhibée pour permettre la dépolarisation de la membrane (Merlot et al., 2007).

1.2.3.2.3 Efflux de K^+ Une dépolarisation de la membrane plasmique entre -60 mV et au moins -40 mV provoque un courant de sortie de K^+ (Schroeder et al., 1987); les canaux responsables de cette sortie sont appelés canaux de rectification (de sortie de K^+) ou canaux K^+_{out} . Ces canaux sont insensibles à l'augmentation de $[Ca^{2+}]_{cyt}$ (Schroeder and Hagiwara, 1989), mais nécessitent une alcalinisation du cytoplasme pour être activés (Blatt and Armstrong, 1993). Le gène *AtGORK* (gated outward rectifying K^+ channel) a été identifié comme codant pour un des canaux K^+_{out} : il provoque des courants sortants de K^+ en réponse à une dépolarisation dans un oocyte de *Xenopus* (Ache et al., 2000). Son rôle de canal sortant de potassium en réponse à l'ABA a également été prouvé dans les cellules de garde d'*Arabidopsis* (Hosy et al., 2003).

Un courant transitoire de sortie de K^+ a été caractérisé; il est induit rapidement par la dépolarisation, mais inhibé par l'élévation de la $[Ca^{2+}]_{cyt}$ et l'alcalinisation du cytoplasme (Pei et al., 1998).

1.2.3.2.4 Réorganisation du cytosquelette d'actine L'organisation des filaments d'actine semble être liée à l'état d'ouverture du stomate : dans les stomates ouverts, les filaments d'actine sont répartis sur un anneau préférentiellement dans la partie corticale du cytoplasme, tandis que dans les stomates fermés, ils sont distribués régulièrement selon un schéma aléatoire. Le passage de l'un à l'autre de ces états serait facilité par une dépolymérisation de l'actine (Gao et al., 2008). Dans les cellules de garde, l'activité de la guanosine triphosphatase AtRac1 est inhibée par l'ABA, ce qui provoque une réorganisation du cytosquelette d'actine (Lemichez et al., 2001); ce phénomène est également induit par l'augmentation de $[Ca^{2+}]_{cyt}$ et implique l'action d'une kinase (Hwang and Lee, 2001); il semble nécessaire à la fermeture des stomates en réponse à l'ABA et est inhibé par

ABI1 qui agit sur AtRac1 (Lemichez et al., 2001).

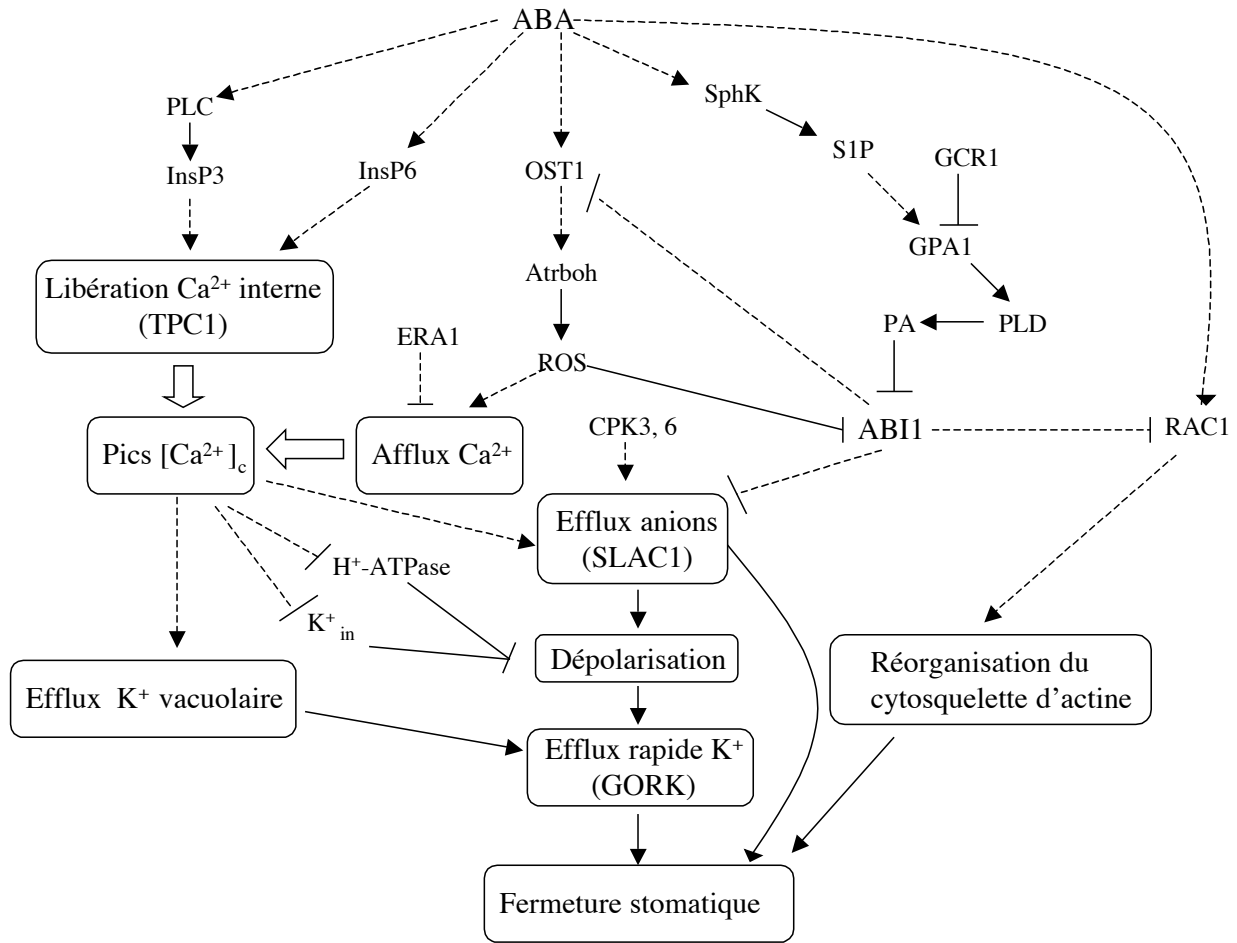


FIG. 1.3 – Schéma de la signalisation et des mécanismes de la fermeture stomatique en réponse à l'ABA, modifié d'après Li et al. (2006b). Les flèches en trait plein indiquent les interactions/rerelations directes et celles en pointillés les interactions/rerelations indirectes. InsP3 : inositol-1,4,5-phosphate ; InsP6 myo-inositol hexakinophosphate ; PA : acide phosphatidique ; PLC : phospholipase C ; PLD : phospholipase D ; ROS : dérivés actifs de l'oxygène ; S1P : sphingosine-1-phosphate ; SphK : sphingosine kinase.

1.2.4 Transduction du signal

Le mécanisme de fermeture des stomates est un modèle très utilisé pour étudier les différents acteurs des voies de signalisation de l'ABA et de la réponse à la déshydratation. Si toutes les familles d'éléments de signalisation intervenant dans la transduction du signal dans la plante entière sont également impliquées dans la fermeture des stomates en réponse à l'ABA, certains aspects et acteurs plus particuliers n'y sont pas retrouvés et sont décrits dans la section qui suit, en parallèle avec les résultats déjà présentés dans la section précédente.

1.2.4.1 Phosphorylations et déphosphorylations

Plusieurs familles de kinases et phosphatases semblent être impliquées dans la réponse à la déshydratation. Leur rôle, s'il est difficilement contestable, n'est pour l'instant pas encore très bien caractérisé ; en effet, les substrats de ces enzymes sont le plus souvent inconnus.

1.2.4.1.1 Les kinases Les cascades de MAPK forment des modules de signalisation souvent identifiés chez les eucaryotes. Elles fonctionnent par chaînes de trois, qui se phosphorylent l'une l'autre : une MAPKK kinase phosphoryle sur un résidu sérine ou thréonine une MAPK kinase qui phosphoryle une MAP kinase sur une thréonine et une tyrosine de sa boucle d'activation. Cela provoque généralement la translocation de la MAPK vers le noyau ou simplement son déplacement à un autre endroit du cytoplasme, où elle phosphorylera des protéines spécifiques. En amont de cette cascade, on trouve souvent d'autres kinases ou des protéines G (Bartels and Sunkar, 2005). Après des recherches de similarités de séquences, il a été déterminé que le génome d'*Arabidopsis* contenait 20 gènes de MAPK, 10 gènes de MAPKK et 60 gènes de MAPKKK (Bartels and Sunkar, 2005), ce qui indique de probables interconnexions des cascades, et que par exemple une même MAPK pourrait répondre à plusieurs stimuli différents via des MAPKKK différentes. Plusieurs MAP kinases sont régulées, entre autres stress, par la déshydratation : *AtMEKK1* (MEK kinase) et *AtMPK3* voient leur expression induite (Mizoguchi et al., 1996), *AtMPK4* et *AtMPK6* sont activées post-transcriptionnellement. Une kinase de sérine/thréonine nommée OX1 est induite par des stress générateurs de ROS et également activée par les ROS ; elle est requise pour l'activation de *AtMPK3* et *AtMPK6* (Rentel et al., 2004). Des travaux sur la catalase (les catalases permettent l'élimination de l'eau oxygénée) *CAT1* apportent une confirmation du rôle d'*AtMPK6* (et plus généralement des cascades de MAPK) en liaison avec les ROS : *AtMEK1* (MAP kinase/ERK kinase), *AtMKK1* et *AtMPK6* participent à l'induction par une voie ABA-dépendante de cette catalase (Xing et al., 2007, 2008).

D'autres kinases que les MAPK ont un rôle à la fois dans la réponse à une déshydratation et à d'autres stress : *ADR1* (activated disease resistance) présente des homologies avec une sérine/thréonine kinase et est connue pour son rôle dans la réponse aux stress biotiques, mais elle est aussi impliquée dans la tolérance à la déshydratation en liaison avec *ABI1* (Chini et al., 2004).

Une famille de kinases identifiée chez la levure a été baptisée SNF-1 pour sucrose-nonfermenting ; elles sont activées par phosphorylation sur une sérine ou une thréonine. Des kinases proches de celles-ci existent chez les plantes : ce sont les SnRK (SNF-1 related), classées en trois familles, SnRK1,

2 et 3. Leurs fonctions ne sont pas encore connues, mais chez plusieurs espèces de plantes, on en trouve qui sont activées par un stress osmotique. Parmi les mieux caractérisées se trouvent OST1 (voir paragraphe 1.2.3.1) et son homologue chez *Vicia Faba* AAPK (ABA-activated serine-threonine protein kinase) (Bartels and Sunkar, 2005). Chez *Arabidopsis*, trois SnRK2 : OST1 qui est activée par l'ABA, SnRK2.2 et SnRK2.3, induites par de l'ABA exogène (Boudsocq et al., 2004), et une autre induite par un stress osmotique indépendamment de l'ABA sont capables de phosphoryler *in vitro* un motif du sous-domaine C de certains facteurs de transcription bZIP (basic leucine-zipper), tels que AREB1/ABF2, AREB2/ABF4 et ABI5 qui sont impliqués dans l'induction de gènes en réponse à l'ABA (voir paragraphe 1.2.5.1.1) (Furihata et al., 2006).

Le rôle des kinases dépendantes du Ca^{2+} (CDPK) sera décrit plus en détail dans le paragraphe 1.2.4.3.

1.2.4.1.2 Les phosphatases Il existe deux groupes importants de phosphatases : les phosphatases de phosphoprotéines ou PPases qui déphosphorylent des sérines et des thréonines et les phosphatases de phosphotyrosines ou PTPases. Il y a quatre familles de PPases : PP1, PP2A, PP2B et PP2C, et trois de PTPases : celles qui sont similaires à des récepteurs, les intracellulaires et celles présentant une double-spécificité (Bartels and Sunkar, 2005).

D'après des résultats obtenus chez la levure, les PTPases se situent souvent en amont de cascades de MAPK, qui en retour induisent leur expression, formant ainsi une boucle de régulation négative (Bartels and Sunkar, 2005). Une PTPase putative, AtPTP1 est induite par un stress salin (Xu et al., 1998), et peut inhiber complètement l'activité de AtMPK4 en la déphosphorylant (Huang et al., 2000). Deux phosphatases à double spécificité, dont le rôle n'est pas encore clair, sont impliquées dans la signalisation de l'ABA : IBR5 (indol-3-butyric acid response) (Monroe-Augustus et al., 2003) et PHS1 (propyzamide hypersensitive), un régulateur négatif de l'ABA (Quettier et al., 2006).

Les PP2C sont les phosphatases les plus représentées dans le génome d'*Arabidopsis* avec environ 70 gènes. Certaines sont impliquées dans la signalisation de l'ABA. En particulier ABI1 et ABI2, deux PP2C homologues semblent être des régulateurs négatifs de la réponse à l'ABA dans les graines et à l'état végétatif (Leung et al., 1997), mais leurs substrats sont pour l'instant inconnus. Elles sont en particulier nécessaires à la fermeture des stomates en réponse à l'ABA, un mécanisme dans lequel elles semblent avoir des rôles différents (voir paragraphe 1.2.3). ABI1 peut interagir avec un facteur de transcription à homéodomaine induit par l'ABA, AtHB6 (homeobox protein). L'expression de gènes contrôlés par AtHB6 est supprimée chez le mutant *abi1-1*, ce qui indique qu'ABI1 intervient en amont d'AtHB6 (Himmelbach et al., 2002). Une autre PP2C semble être un régulateur négatif des voies de signalisation de l'ABA. HAB1 présente des homologies avec ABI1 et ABI2, son expression est induite par de l'ABA exogène et le mutant *hab1-1* semble surtout affecté au niveau de la graine (Saez et al., 2004) ; néanmoins, une étude du double mutant *abi1-2 hab1-1* a montré que ces deux phosphatases agissent en coordination pour réguler négativement la réponse à l'ABA aussi bien au niveau graine que végétatif (y compris les stomates) (Saez et al., 2006). AtPP2CA a été identifiée car une mutation dans son gène provoquait une hypersensibilité à l'ABA à la germination (mais pas pour d'autres réponses à l'ABA). Cette phosphatase semble être la plus active des PP2C connues dans la graine (Yoshida et al., 2006b). Sa régulation paraît impliquer

ABH1 (voir paragraphe 1.1.4.2), mais pas via un contrôle de l'épissage (Kuhn et al., 2006).

Deux PP2A ont été identifiées comme participant aux réponses à l'ABA : RCN1 (roots curl in NPA) qui est un régulateur positif de la signalisation de l'ABA et PP2Ac-2. Le mutant *pp2ac-2* est hypersensible à l'ABA pour la majorité des processus dans lesquels il est impliqué, ce qui indique que PP2Ac-2 doit contrôler négativement la signalisation de l'ABA (Pernas et al., 2007).

1.2.4.2 Les phospholipides

Les phospholipides contenus dans les membranes sont une source de multiples molécules de signalisation. On l'a déjà vu dans les cellules de garde où l'InsP3, l'InsP6 et l'acide phosphatidique sont des acteurs majeurs de la fermeture des stomates en réponse à l'ABA.

L'InsP3 et l'acide phosphatidique, ont également un rôle en réponse à la déshydratation dans le reste de la plante. La PLC produit l'InsP3 à partir de phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP2), lui-même produit par une phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase (PIP5K). Lors d'un stress osmotique, la quantité d'InsP3 de la plante entière augmente de façon rapide (DeWald et al., 2001) ; on observe aussi une élévation de la quantité de PIP2 (DeWald et al., 2001) et d'ARNm de PIPK5 (Mikami et al., 1998). L'InsP3 est catabolisé en inositol par une inositol polyphosphate 1-phosphatase, FRY1 (FIERY1) (figure 1.2.4.2). Une mutation dans *FRY1* provoque une surexpression de gènes de réponse à l'ABA et au stress, ainsi qu'une hypersensibilité à l'ABA et au stress au niveau de la graine et du développement de la plantule (Xiong et al., 2001a).

L'acide phosphatidique (PA) intervient également dans la réponse à la déshydratation en dehors des stomates. Une autre PLD que celle caractérisée dans les cellules de garde est impliquée dans la synthèse de PA à partir des phospholipides membranaires dans la plante entière. AtPLD δ est induite par la déshydratation et le stress salin et est fortement exprimée dans les feuilles, les cotylédons et les tissus vasculaires ; l'accumulation de PA en réponse à la déshydratation est significativement diminuée dans des plantes n'exprimant pas AtPLD δ .

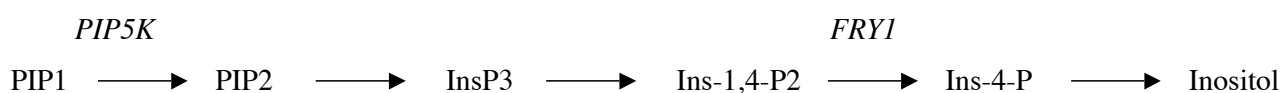


FIG. 1.4 – Métabolisme de l'InsP3 (modifié d'après Xiong et al. (2002b)). PIP1 : phosphatidylinositol-4-phosphate ; PIP2 : phosphatidylinositol-4,5-phosphate ; InsP3 : inositol-1,4,5-phosphate ; Ins-1,4-P2 : inositol-1,4-phosphate ; Ins-4-P : inositol-4-phosphate ; *PIP5K* : phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase ; *FRY1* : *FIERY1*.

1.2.4.3 Ca^{2+}

Le calcium est un messenger secondaire majeur de la signalisation du stress hydrique, et pas uniquement dans les stomates (Knight, 2000). Il est probable que les mécanismes aboutissant à l'augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ soient assez semblables dans les cellules de garde et dans les autres cellules. Comme plusieurs pics de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ sont détectés lors d'un stress hydrique, il est possible

que la perception même du stress provoque le premier pic, qui serait responsable en particulier de l'accumulation d'ABA (Xiong et al., 2002b). Il semblerait que des données importantes du signal véhiculé par le Ca^{2+} soient « codées » dans la cinétique, l'amplitude et la durée des pics, que l'on appelle « signature du calcium », et doivent être traduites par les effecteurs en aval (Hong-Bo et al., 2008), qui peuvent être plusieurs types de protéines : CDPK, calmodulines, CBL (calcineurines-B like)... La signalisation par le Ca^{2+} semblant être plus spécifiquement sollicitée dans la plante entière pour le stress salin que pour la déshydratation, elle sera peu développée ici (en particulier la voie des SOS (salt overly sensitive) régulant l'homéostasie du sodium ne sera pas abordée).

Les CDPK sont des kinases dépendantes du Ca^{2+} . Plusieurs d'entre elles sont induites par un stress osmotique (Bartels and Sunkar, 2005). Chez *Arabidopsis*, la mutation de certaines CDPK empêche l'induction par le stress de gènes rapporteurs (Sheen, 1996).

Les calmodulines sont des protéines capables de lier le Ca^{2+} et dont l'activité est induite par une augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ et résulte dans l'activation de kinases. Une calmoduline d'*Arabidopsis* qui a été étudiée est AtCP1 (Ca^{2+} binding protein), qui est induite par un stress salin (Jang et al., 1998). Une protéine avec 49 % d'homologie avec une calmoduline nommée AtCML9 est induite par des stress abiotiques et l'ABA et des mutants KO (knock-out) pour ce gène présentent une hypersensibilité à l'ABA et à un stress salin (Magnan et al., 2008). Une protéine capable de se lier aux calmodulines, AtCaMBP25, a également été identifiée; elle est induite par un stress salin ou une déshydratation et sa surexpression augmente la sensibilité à des stress osmotiques, ce qui laisse penser que c'est un régulateur négatif de ce type de stress (Perruc et al., 2004).

Chez les animaux et les levures, la calcineurine est une phosphatase dépendant du Ca^{2+} ou de calmodulines qui joue un rôle important en aval de ces messagers secondaires. Aucun véritable homologue de la calcineurine n'a été identifié chez les plantes, mais une protéine montrant des similitudes avec la sous-unité B de la calcineurine (CBL pour calcineurin-B like), AtCBL1, est induite par la déshydratation et le froid et semble être un régulateur positif de différents stress abiotiques, en particulier en contribuant à la régulation de facteurs de transcription de réponse précoce au stress ABA-indépendants (Kudla et al., 1999; Albrecht et al., 2003). Une autre CBL, CBL9, est impliquée à la fois dans la signalisation et la régulation de la biosynthèse de l'ABA (Pandey et al., 2004). Ces deux CBL peuvent se lier à la kinase de type SnRK3 CIPK23 (CBL-interacting protein kinase 23) qui en retour phosphoryle le transporteur de potassium AKT1, régulant ainsi l'apport en K^+ et peut-être même la fermeture stomatique (Xu et al., 2006; Li et al., 2006a). Elles interagissent également avec une autre kinase, CIPK1, avec pour résultat de l'amener à la membrane plasmique, un mécanisme pouvant être en liaison avec la signalisation de l'ABA (mais pas seulement puisque CBL1 a une action ABA-indépendante) étant donné que le mutant *cipk1* est hypersensible à l'ABA (D'Angelo et al., 2006).

1.2.5 Régulations transcriptionnelles

La technique de puce à ADN a permis de faire de grandes avancées dans la recherche de gènes induits par des stress abiotiques, déjà commencée grâce aux analyses de northern et de RT-PCR quantitative. L'analyse simultanée de 7000 gènes a ainsi pu mettre en avant les chevauchements entre

les groupes de gènes induits par les différents stress abiotiques (froid, déshydratation et salinité), montrant par exemple que la moitié des gènes induits par la déshydratation le sont aussi par un stress salin, mais que les gènes induits par le froid sont eux assez spécifiques de ce stress. Cette étude a pu aussi classer les gènes en fonction de leur cinétique d'induction, qui peut être soit rapide et transitoire, surtout pour des facteurs de régulation du stress, soit lente et progressive, pour des gènes permettant l'adaptation au stress (LEA (late embryogenesis abundant proteins), ajustement osmotique, détoxification) (Seki et al., 2002). Enfin, on s'aperçoit que si certains des gènes induits par ces stress répondent à l'ABA, ce n'est pas le cas de tous, il y a donc à la fois des voies de signalisation dépendant de l'ABA et d'autres indépendantes (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2006).

1.2.5.1 Voies de régulation ABA-dépendantes

1.2.5.1.1 La voie des ABRE Un grand nombre de gènes induits par l'ABA ont dans leur promoteur une séquence proche de celles des G-box (des éléments de régulation en *cis* impliqués en particulier dans l'induction par les conditions environnementales) appelée ABRE pour ABA responsive element. Cette séquence joue un rôle majeur dans l'induction des gènes en réponse à l'ABA (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2006). Comme pour la G-Box, l'activation de la transcription d'un gène par un seul ABRE n'est pas possible, elle nécessite l'existence d'un complexe de réponse à l'ABA formé d'un ABRE et d'au moins un élément de couplage, de séquence souvent proche de celle d'un ABRE (cela peut même être un ABRE).

Des facteurs de transcription bZIP sont capables d'activer la transcription du gène *RD29B* (responsive to drought), majoritairement induit par l'ABA et dont le promoteur contient deux ABRE responsables de sa réponse à la déshydratation. Ces bZIP sont nommés AREB pour ABA Responsive Element Binding proteins ou ABF pour ABRE Binding Factors (Uno et al., 2000; Choi et al., 2000). Ils fonctionnent d'une manière dépendante de l'ABA puisque leur capacité d'activation est réduite chez les mutants *aba2* et *abi1* et augmentée chez le mutant hypersensible à l'ABA *era1* (Uno et al., 2000). AREB1/ABF2 et AREB2/ABF4 sont induits par l'ABA, la déshydratation et le stress salin, tout comme ABF3, un autre bZIP se liant aux ABRE (Choi et al., 2000). L'implication d'AREB1/ABF2, AREB2/ABF4 et ABF3 dans la signalisation de l'ABA et la réponse à la déshydratation a été confirmée par les phénotypes de plantes qui les surexprimaient : leur sensibilité à l'ABA était altérée, elles étaient plus résistantes à la déshydratation et montraient une surexpression de certains gènes de réponse aux stress hydriques (Kim et al., 2004; youn Kang et al., 2002).

Un groupe de bZIP homologues aux AREB/ABF a été défini et contient 13 membres (Jakoby et al., 2002). Parmi eux *AREB1/ABF2*, *AREB2/ABF4* et *ABF3* sont exprimés dans les tissus végétatifs mais pas dans la graine, tandis que deux autres membres de la famille des AREB/ABF, *ABI5* et *EEL* (enhanced Em level), sont exprimés dans la graine pendant la maturation et/ou la germination (Finkelstein and Lynch, 2000; Lopez-Molina and Chua, 2000).

La phosphorylation d'AREB1/ABF2 et AREB2/ABF4 par une kinase dépendant de l'ABA semble être importante pour leur activité (Uno et al., 2000), ce qui pourrait expliquer qu'elles soient peu actives dans le mutant *aba2*. Dans des conditions de croissance normales, la surexpres-

sion d'AREB1/ABF4 ne provoque pas l'induction des gènes que ce facteur de transcription régule. Par contre, la surexpression d'une forme constitutivement activée de la protéine amène une hypersensibilité à l'ABA, une résistance à la déshydratation améliorée et une forte induction de plusieurs gènes de réponse à l'ABA et à la déshydratation (Fujita et al., 2005). Cette phosphorylation pourrait être due à des SnRK2 (voir paragraphe 1.2.4.1.1).

1.2.5.1.2 Régulation par les MYC et MYB L'expression de certains gènes induits par l'ABA n'est pas régulée par des ABRE. C'est le cas en particulier de *RD22* dont l'induction par l'ABA est due à la liaison sur deux sites de son promoteur d'un facteur de transcription MYC (rd22BP1 pour rd22 binding protein) et d'un MYB (AtMYB2). Ils participent à la régulation d'autres gènes de réponse à l'ABA et leur surexpression provoque une hypersensibilité à l'ABA. Le rôle de ces deux facteurs de transcription est probablement lié à la réponse à long terme à la déshydratation car ils sont synthétisés tardivement à la suite de l'accumulation d'ABA (Abe et al., 1997, 2003). Il est possible qu'ils interviennent également dans un cross-talk entre la signalisation de l'ABA, de l'acide jasmonique et de la lumière (Boter et al., 2004; Yadav et al., 2005).

1.2.5.1.3 Autres familles de facteurs de transcription En dehors des bZIP, des MYC et des MYB, on trouve d'autres facteurs de transcriptions jouant un rôle dans la signalisation ABA-dépendante de la déshydratation. *RD26*, de la famille NAC (pour NAM, ATAF1,2, CUC2) est induit par l'ABA, la déshydratation et le stress salin et induit l'expression de gènes de réponse à l'ABA et aux stress hydriques (Fujita et al., 2004). La famille des HD-ZIP (homéodomain leucine zipper) contient plusieurs facteurs de transcription induits par une déshydratation : AtHB6, AtHB7 et AtHB12. AtHB6 est un régulateur négatif de la signalisation de l'ABA qui peut interagir avec ABI1 (Himmelbach et al., 2002), tandis que les deux autres semblent être impliqués dans l'inhibition de la croissance pendant un stress hydrique (Olsson et al., 2004). Enfin, deux facteurs de transcription de la famille AP2 (apetala), ABR1 (ABA repressor) et AtERF7 (ethylene response factor), paraissent réguler négativement la signalisation de l'ABA (Pandey et al., 2005; Song et al., 2005). AtERF7 se lie à une boîte GCC et inhibe la transcription. Elle interagit avec la kinase PKS3 (SOS2-like protein kinase) (qui régule les réponses globales à l'ABA) qui est capable de la phosphoryler, ce qui pourrait constituer un moyen de réguler son activité. Sa surexpression provoque une hypersensibilité des stomates à l'ABA (Song et al., 2005).

1.2.5.2 Voies de régulation ABA-indépendantes

1.2.5.2.1 Activation par le DRE Le gène *RD29A* est induit à la fois par l'ABA, la déshydratation et le froid ; le fait qu'il soit encore induit par ces deux stress dans des mutants déficients ou insensibles à l'ABA indique qu'il est régulé par des des voies ABA-dépendantes et indépendantes (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 1992). Son promoteur contient la séquence de 9 pb TACC-GACAT appelée DRE (dehydration response element) qui permet l'induction rapide du gène par le froid et la déshydratation indépendamment de l'ABA (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 1994). Suite à cette découverte, des séquences de DRE ont été trouvées dans de nombreux gènes induits par des stress abiotiques. Une recherche en simple-hybride dans la levure d'ADNc se liant au DRE

a permis d'identifier deux facteurs de transcription contenant un domaine EREBP (ethylene responsive factor binding protein)/AP2 (identifié chez d'autres facteurs de transcription), DREB1A et DREB2A (DRE binding protein), capables d'activer la transcription de gènes dont les promoteurs contiennent un DRE (Liu et al., 1998).

DREB1A appartient à une famille de facteurs de transcription dont trois, DREB1B, A, et C sont codés dans cet ordre par des gènes consécutifs du chromosome IV. Ces trois gènes sont induits par le froid mais pas par un stress osmotique (Shinwari et al., 1998) et ce sont des acteurs majeurs du contrôle de l'expression de gènes de réponse au froid (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2006). Par contre trois autres membres de cette famille semblent avoir un rôle un peu différent. DREB1D est induit par une déshydratation et sa surexpression rend la plante plus tolérante à la fois à la sécheresse et au gel (Haake et al., 2002). DREB1E et F sont eux induits par un stress salin et la surexpression de DREB1E augmente la résistance à une forte salinité; de façon inattendue, une mutation dans les gènes correspondants provoque une déficience en gibbérellines (Magome et al., 2004).

Parallèlement à l'identification de DREB2A, la recherche de protéines capables de se lier au DRE et induites par une déshydratation a permis de découvrir un de ses homologues, DREB2B. Ces deux facteurs de transcription sont induits de la même façon par une déshydratation et un stress salin. La surexpression de *DREB2A* ne provoque qu'un léger retard de développement, n'amène qu'une légère surexpression du gène marqueur *RD29A*, et n'améliore pas la résistance à la déshydratation ce qui peut être expliqué par la nécessité d'une modification post-traductionnelle (une phosphorylation par exemple) pour son activité (Liu et al., 1998). La présence d'une région de régulation négative de l'activité de DREB2A pourrait également être la cause de l'absence de phénotype des surexprimeurs : en effet la délétion de cette région de la protéine la rend constitutivement active, et la surexpression de la protéine résultante induit l'expression de gènes de réponse à la déshydratation (et à la chaleur) et rend la plante plus résistante à la déshydratation (Sakuma et al., 2006b,a). Récemment, deux protéines interagissant avec DREB2A, DRIP1 et DRIP2, ont été découvertes. ce sont des ubiquitines ligases qui semblent réguler négativement la stabilité de DREB2A dans le noyau par une ubiquitination qui la dirigerait vers le protéasome 26S (Qin et al., 2008). Suite au séquençage du génome d'*Arabidopsis*, six autres protéines présentant des similarités avec DREB2A et B, dont le rôle n'est pas encore clair, ont été identifiées (Sakuma et al., 2002).

1.2.5.2.2 Autres voies ABA-indépendantes Les DREB ne sont pas les seuls types de facteurs de transcription à réguler la signalisation du stress hydrique indépendamment de l'ABA, puisqu'il existe des gènes qui ne sont pas ou peu induits par l'ABA et dont le promoteur ne contient pas de DRE. L'un d'entre eux est *ERD1* (early responsive to dehydration) (voir paragraphe 1.2.5.3). En plus d'être induit par une déshydratation, il est aussi exprimé lors de la sénescence (Nakashima et al., 1997). Deux régions du promoteur de *ERD1* sont responsables de son induction par la déshydratation, dont une séquence proche de celle de liaison des facteurs de transcription MYC (Simpson et al., 2003). Trois facteurs de transcription de la famille NAC, assez similaires à des MYC, ANAC019, ANAC055 et ANAC072 sont capables de se lier à la région du promoteur de *ERD1* ressemblant à la séquence de liaison des MYC. Ils sont induits par la déshydratation, le

stress salin et l'ABA et leur surexpression provoque une meilleure résistance à la déshydratation et l'expression de certains gènes de réponse au stress hydrique, mais pas *ERD1* (Tran et al., 2004). L'induction de *ERD1* nécessite en fait l'activité d'un autre facteur de transcription répondant à la déshydratation et le stress salin, de la famille ZFHD (zinc finger homeodomain), nommé ZFHD1 qui se lie à l'autre domaine du promoteur de *ERD1* nécessaire à son induction par la déshydratation. ZFHD1 et les NAC se liant au promoteur de *ERD1* interagissent dans un test de double-hybride chez la levure (Tran et al., 2007a).

1.2.5.3 Fonctions des gènes induits par la déshydratation

Les analyses transcriptionnelles de plantes soumises à un stress hydrique est utile non seulement pour comprendre les voies de régulation des gènes de réponse (voir section 1.2.5), mais aussi pour connaître le type de gènes induits par ces stress et les mécanismes impliqués dans la résistance au stress. Elles ont permis de voir que deux types de gènes étaient induits : ceux qui codent pour des protéines permettant de lutter contre les effets du stress : pour mettre en place l'ajustement osmotique, protéger les protéines et les structures cellulaires, détoxifier la cellule ; et ceux qui codent pour les protéines de régulation du signal tels que les facteurs de transcription, les kinases et phosphatases, les enzymes impliquées dans le métabolisme des phospholipides (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2006). Parmi ces derniers, les plus étudiés ont été décrits plus haut, ce paragraphe ne traitera donc que du premier groupe de gènes.

Les puces à ADN ont également permis de constater que les gènes induits diffèrent énormément selon le type de déshydratation/stress osmotique appliqué. Ainsi, sur 806 gènes testés lors de trois stress hydriques différents (des plantules de trois semaines stressées *in vitro* sur du papier filtre sec, des plantules poussées quatre semaines en hydroponie baignées dans une solution de mannitol ou des plantes poussées sur terreau dont l'arrosage est arrêté) seuls 27 gènes sont induits en commun et 3 réprimés (Bray, 2004).

1.2.5.3.1 LEA Les protéines LEA sont les protéines majoritaires des embryons matures. Elles sont en général induites dans les parties végétatives par un stress osmotique, pendant lequel, comme dans l'embryon, leur accumulation en réponse à l'ABA est corrélé avec l'acquisition de la tolérance à la dessiccation (Bartels and Sunkar, 2005). Ce sont la plupart du temps des protéines petites et hydrophyles, résistantes à la chaleur. Chez plusieurs espèces, leur surexpression confère une meilleure résistance à la déshydratation ou au froid. L'étude de 51 gènes de LEA d'*Arabidopsis* a montré que beaucoup d'entre eux avaient une séquence de régulation ABRE dans leur promoteur. Un tiers se présentait comme des répétitions en tandem et 43 % faisaient partie d'une paire d'homologues, ce qui montre l'avantage évolutif qu'elles apportent. La classification des LEA a longtemps été discutée, mais récemment, elles ont été regroupées en 9 groupes sur la base de leurs similitudes de séquence. Le groupe le plus important est LEA-4, dont les protéines pourraient former des dimères capables de séquestrer des ions ; les déhydrines sont également bien représentées et sont soupçonnées de jouer un rôle dans la préservation des protéines et des structures membranaires ; le groupe LEA-5 pourrait intervenir dans la liaison ou le remplacement de l'eau (Hundertmark and Hinch, 2008; Bartels and Sunkar, 2005).

1.2.5.3.2 Aquaporines Les aquaporines sont des canaux spécifiques de passage de l'eau situés sur les membranes plasmiques ou vacuolaires. Elles facilitent l'équilibre osmotique en permettant un transport de l'eau additionnel à la diffusion à travers les membranes (Kjellbom et al., 1999). Elles font partie de la famille des MIP (major intrinsic proteins) et sont divisées en deux groupes les TIP (tonoplast intrinsic proteins) dans la membrane vacuolaire et les PIP (plasma membrane intrinsic proteins). *Arabidopsis* compte dans son génome au moins 30 aquaporines, dont certaines, telles que RD28 (Yamaguchi-Shinozaki et al., 1992), sont induites par différents types de stress hydrique tandis que d'autres sont réprimées, une régulation qui permettrait de jouer sur les flux d'eau entre différents types de cellules afin d'optimiser son utilisation pendant le stress (Bartels and Sunkar, 2005; Alexandersson et al., 2005). Ainsi, l'exposition des racines d'*Arabidopsis* à un stress salin, provoque des changements d'expression et de localisation cellulaire des aquaporines, PIP1, PIP2, TIP1;1 et TIP2;1, montrant l'importance des aquaporines dans le transport de l'eau au niveau des racines en cas de stress hydrique (Boursiac et al., 2005).

1.2.5.3.3 Protéines heat-shock Étant donné qu'un déficit cellulaire en eau cause la dénatura-tion de certaines protéines, la présence de chaperones permettant de les structurer et de les assembler correctement, est essentielle à la mise en place de la tolérance au stress. Le rôle de certaines protéines heat-shock (Hsp) est de ce type. Il a en particulier été prouvé qu'elles étaient capables *in vitro* de contribuer à faire reprendre à des protéines dénaturées leur configuration native et d'empêcher leur aggrégation sous l'effet de la chaleur (Lee et al., 1995). Chez *Arabidopsis*, le rôle de plusieurs Hsp dans la réponse à un stress osmotique a été démontré. AtHsp17.6A et AtHsfA2 sont induites par un stress osmotique et leur surexpression confère une meilleure résistance à ce stress (Ogawa et al., 2007; Sun et al., 2001).

1.2.5.3.4 Détoxification des effets des ROS Un des effets de l'accumulation de ROS dans les cellules est une production accrue d'aldéhydes qui sont hautement réactifs et toxiques à faibles concentrations (Bartels and Sunkar, 2005). Les aldéhydes déshydrogénases (ALDH) catalysent la transformation des aldéhydes en acides carboxyliques, contribuant ainsi à la détoxification de la cellule. Chez *Arabidopsis*, ALDH3I1, ALDH3H1 et ALDH7B4 sont induites par la déshydratation, le stress salin et l'ABA (Kirch et al., 2005). La surexpression de ALDH3I1 (chloroplastique) et ALDH7B4 (cytoplasmique) apportent une meilleure tolérance au stress osmotique et une diminution de la teneur en eau oxygénée, alors que des lignées KO de ces gènes sont plus sensibles à une déshydratation et un stress salin (Kotchoni et al., 2006; Sunkar et al., 2003).

Les peroxiredoxines permettent de détoxifier les peroxides (eau oxygénée, hydroperoxydes...) en les réduisant en alcool. Elle permettent ainsi de protéger l'ADN, les membranes, et certaines enzymes (Lim et al., 1993). Lors de la recherche de gènes différentiellement exprimés lors d'un stress froid ou d'une déshydratation, la peroxiredoxine TPX1 (thioredoxin dependent peroxidase) a été identifiée (Seki et al., 2001). D'autres protéines, telles que les thioredoxines ou les sulfoxides reductases, sont impliquées dans la détoxification des effets des ROS, mais si certaines sont induites par une déshydratation, leur rôle dans la tolérance à ce stress reste encore à étudier (Bartels and Sunkar, 2005).

1.2.5.3.5 Protéases Une augmentation de la protéolyse lors d'un stress hydrique pourrait permettre d'éliminer les protéines endommagées par le déficit en eau et les ROS et/ou de remobiliser de l'azote (Bartels and Sunkar, 2005). Plusieurs protéases d'*Arabidopsis* sont induites par une déshydratation (Seki et al., 2002; Koizumi et al., 1993). Une des plus étudiées est celle codée par le gène *ERD1*, la sous-unité régulatrice ATPase d'une protéase chloroplastique, qui pourrait participer à la dégradation de protéines chloroplastiques (Nakashima et al., 1997). Une autre protéase chloroplastique, AtDegP2, est induite par une déshydratation et un stress salin. Elle est impliquée dans le clivage de la protéine D1 photo-endommagée (Haussühl et al., 2001).

1.3 Présentation du projet de thèse

Avec le séquençage du génome d'*Arabidopsis*, il est devenu possible d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans les mécanismes de tolérance à la déshydratation des plantes (perception, ajustement osmotique, phosphorylation/déphosphorylation etc) par la recherche de gènes homologues à ceux déjà connus, dans la même espèce, chez d'autres plantes ou chez les levures. Mais cette méthode limite la découverte des pans de signalisation spécifiques aux plantes et qui restent mal élucidés. Nombre de gènes ont aussi été découverts grâce à leur régulation transcriptionnelle par la déshydratation, à l'aide d'analyses de northern ou de puces à ADN. Toutefois, cette méthode à grande échelle n'est pas d'une grande précision et ne permet pas de repérer des gènes légèrement induits ou réprimés. De plus, c'est une approche qui ne donne pas d'indication sur la fonction du gène dans le mécanisme de réponse à la déshydratation dans le cas où il n'est pas annoté et qui laisse de côté des gènes non régulés transcriptionnellement. Pour identifier d'autres gènes, la recherche de mutants reste incontournable. Les cribles sélectifs peuvent être basés sur la réponse à l'ABA, ou bien directement sur un aspect de la réponse à la déshydratation. La sensibilité à l'ABA à la germination et la dérégulation de gènes rapporteurs ont constitué des méthodes efficaces d'isolement de mutants. Deux gènes essentiels dans la signalisation de l'ABA et du stress hydrique, *ABI1* et *ABI2*, ont été identifiés grâce à leur insensibilité à l'ABA à la germination (Koornneef et al., 1984). Les gènes *ERA1* (Cutler et al., 1996) et *ABH1* (Hugouvieux et al., 2001) ont été découverts à la suite de cribles de germination où des mutants hypersensibles à l'ABA étaient recherchés. Afin de détecter des mutations affectant l'expression des gènes de réponse à la déshydratation (ainsi qu'au froid et au stress salin), un crible utilisant le gène rapporteur LUC (luciférase de luciole), sous le contrôle du promoteur du gène *RD29A* (voir paragraphe 1.2.5.2.1) a permis de visualiser *in vivo* l'activité du promoteur (Ishitani et al., 1997). Cette technique a ainsi conduit à l'identification de mutations provoquant l'expression constitutive, diminuée ou augmentée de la luciférase. Parmi eux, *fiery1* (voir paragraphe 1.2.4.2), *los4* (voir paragraphe 1.1.4.2) et un autre mutant affecté dans le métabolisme des ARN, *fry2* (Xiong et al., 2002a).

Assez peu de mutants avec une tolérance à la déshydratation améliorée ont été isolés. Les principaux sont résumés dans le tableau 1.1. Un moyen possible pour en trouver de nouveaux est d'utiliser la thermographie infrarouge. Comme l'imagerie par luminescence, cette technique est non-destructive et utilisable à haut débit. Elle permet de visualiser la transpiration des feuilles, qui dépend en particulier de l'ouverture stomatique. Les premiers cribles réalisés par thermographie

infrarouge sur *Arabidopsis*, ont consisté à sélectionner des mutants « froids » dont la fermeture stomatique était défaillante. Certains étaient mutés dans des gènes de biosynthèse de l'ABA (*ABA1*, *ABA2*, *ABA3*), tandis que deux autres étaient affectés dans la réponse de la fermeture stomatique à l'ABA, sans que leur sensibilité à l'ABA au niveau de la graine soit affectée (Merlot et al., 2002). Ces deux mutants, appelés *OST1* et *OST2* (codant pour AHA1), sont des composants de la signalisation de l'ABA dans les stomates (voir paragraphe 1.2.3). Cette méthode est donc efficace pour identifier de nouveaux gènes impliqués dans la réponse au stress hydrique.

Comme ce crible n'a pas détecté de mutants avec une température foliaire plus élevée que le sauvage, cette technique ne semblait pas adaptée à la recherche de plantes dont les stomates sont plus fermés que ceux du sauvage. Un moyen de contourner ce problème a été de mettre en place un crible basé sur la même technique mais utilisant une population de plantes déficientes en ABA. En effet, les faibles teneurs en ABA de ces plantes ne suffisent pas à induire la fermeture stomatique lors d'un stress hydrique, ce qui leur confère une température foliaire plus basse (à cause de l'évaporation accrue) que des plantes sauvages, c'est pourquoi elles sont appelées « froides ». Le principe du crible a alors été de rechercher des plantes « chaudes » dont la température foliaire revenait à une valeur proche de celle du sauvage, c'est-à-dire dont la mutation supprimerait l'effet de la déficience en ABA sur la fermeture stomatique. Une telle recherche de supresseurs offre d'autant plus de chances de découvrir de nouveaux gènes que l'effet de leur mutation pourrait être visible seulement chez une plante déficiente en ABA et oriente la recherche vers des gènes impliqués dans la signalisation de l'ABA. Les mutants « chauds » ainsi identifiés devraient être plus tolérants au stress hydrique, du fait soit d'une accumulation d'ABA accrue, soit d'une sensibilité plus grande à l'ABA.

Le mutant déficient en ABA *aba3-1* a été choisi pour la mutagenèse. En effet, il s'agit d'un mutant obtenu par mutagenèse à l'EMS, pour lequel la déficience en ABA en l'absence de stress est moindre comparée aux autres mutants affectés dans des enzymes de biosynthèse. Néanmoins sa production d'ABA est nettement plus faible que le sauvage en conditions de stress hydrique (Xiong et al., 2001c). La synthèse résiduelle d'ABA pourrait être due au fait que la mutation *aba3-1* résulte d'une substitution d'acide aminé (G3707A, changement d'une glycine en position 469 en acide glutamique) et n'abolit pas totalement l'activité de la protéine. Par rapport aux mutations plus sévères, elle permet un meilleur développement des plantes et facilite ainsi leur culture. De plus la présence de faibles teneurs en ABA paraissait favorable à la recherche de mutations de suppression induisant une plus grande sensibilité à l'hormone.

La recherche de mutants supresseurs chauds par thermographie infrarouge parmi 40000 plantes M₂ issues de la mutagenèse d'*aba3-1* a permis la sélection de 17 mutants. Sept d'entre eux ont de plus montré une meilleure tolérance qu'*aba3-1* à une déshydratation progressive, mesurée par la teneur résiduelle en eau des plantes après un arrêt d'arrosage. Notre objectif était de discriminer les mutants dont la température foliaire plus élevée est due à une meilleure fermeture stomatique et non à un autre changement physiologique. De plus l'étude a été centrée sur quatre mutants récessifs dont la cartographie semblait plus aisée que celle de mutants dominants/semi-dominants.

L'objectif de ma thèse était de caractériser ces quatre mutants dans leur développement, leur réponse à l'ABA et à différents stress liés à l'ABA afin de mieux comprendre comment leur mutation les rend plus tolérants à la déshydratation. Parallèlement, j'ai avancé dans la cartographie de leur

mutation, afin de pouvoir identifier les gène mutés et procéder à leur étude.

Mutant	Fonction du gène muté	N° ATG	Référence	Sensibilité à l'ABA
<i>mrp5</i>	ABC-transporteur	At1g04120	Klein et al. (2003)	Insensibilité des cellules de garde
<i>pp2ac</i>	sous-unité catalytique d'une PP2A	At1g10430	Pernas et al. (2007)	Hs des racines, graines, gènes
<i>lew1</i>	<i>Cis</i> -prényltransférase	At1g11755	Zhang et al. (2008)	
<i>ahk3</i>	Histidine kinase	At1g27320	Tran et al. (2007b)	Hs des gènes de réponse
<i>cipk23</i>	Kinase	At1g30270	Cheong et al. (2007)	Hs des cellules de garde
<i>gcr1</i>	Récepteur couplé à une protéine G	At1g48270	Pandey and Assmann (2004)	Hs des racines, gènes, cellules de garde
<i>abh1</i>	Protéine de liaison à la coiffe des ARNm	At2g13540	Hugouvieux et al. (2001)	Hs des graines, cellules de garde
<i>pub23</i>	Ubiquitine ligase E3 à U-box	At2g35930	Cho et al. (2008)	
<i>rop10</i>	Petite GPase Rho	At3g48040	Zheng et al. (2002)	Hs des racines, graines, cellules de garde
<i>pub22</i>	Ubiquitine ligase E3 à U-box	At3g52450	Cho et al. (2008)	
<i>lew2</i>	Cellulose synthase	At4g18780	Chen et al. (2005)	
<i>abo1</i>	Sous-unité d'une histone acétyltransférase	At5g13680	Chen et al. (2006)	Hs des cellules de garde, de la croissance
<i>ahk2</i>	Histidine kinase	At5g35750	Tran et al. (2007b)	Hs des gènes de réponse
<i>era1</i>	Sous-unité β de farnésyl transférase	At5g40280	Cutler et al. (1996)	Hs des graines, cellules de garde
<i>cpb20</i>	Protéine de liaison à la coiffe des ARNm	At5g44200	Papp et al. (2004)	Hs des graines, cellules de garde

TAB. 1.1 – Mutants dont la tolérance à la déshydratation est améliorée. Hs : hypersensibilité. lew : leaf wilting ; pub : plant U-box ; abo : ABA overly sensitive ; rop : rho-related protein from plants.

Chapitre 2

Résultats

2.1 Introduction

Nous avons comparé les caractéristiques phénotypiques des quatre mutants supprimeurs, appelés *has* (*hot ABA-deficient suppressors*) *aba3-1* au mutant *aba3-1* et au sauvage. Cette analyse avait pour but de comprendre comment les mutations de suppression affectaient la température foliaire et la résistance à la déshydratation, mais également de classer les supprimeurs pour établir un ordre de priorité en vue de la cartographie. Plusieurs types de phénotypes ont été examinés : d'abord différents aspects de la réponse à la déshydratation et ensuite la physiologie de base (croissance, floraison et germination), la réponse à d'autres types de stress hydrique ainsi que la sensibilité à l'ABA dans divers tissus. Pour évaluer l'effet des mutations de suppression lorsque l'ABA est synthétisé normalement, des plantes portant les mutations de suppression en l'absence de la mutation *aba3-1* ont été sélectionnées et la rémanence des différents phénotypes des mutants *has aba3-1* a été étudiée. Une analyse transcriptomique des supprimeurs a été menée pour guider la cartographie et évaluer l'effet des mutations de suppression au niveau moléculaire. La plupart des analyses a été effectuée sur les mutants originaux (notés BC0) puis certaines ont été confirmées après un (BC1) ou deux rétrocroisements (BC2) avec *aba3-1*.

2.2 Caractérisation de la réponse à la déshydratation des supprimeurs

2.2.1 Les supprimeurs ont une température foliaire supérieure à *aba3-1*

Tous les supprimeurs ont une température foliaire supérieure à celle d'*aba3-1* en conditions de déshydratation obtenue sur des plantules cultivées en pot 12 à 15 jours après une déshydratation de 5 à 8 jours à 25°C et 50 % d'humidité relative avec un arrosage minimal (figure 2.1). La différence de température entre les supprimeurs et *aba3-1* dépend des conditions d'observation : elle est parfois peu visible et d'autres fois les supprimeurs sont même plus chauds que le sauvage, en fonction de l'état de déshydratation du pot.

On ne peut pas comparer les supprimeurs entre eux sur les images présentées car elles repré-

sentent des températures mesurées dans des conditions de déshydratation différentes. Néanmoins, à la suite de nombreuses séries d'observation, il est apparu que les deux supresseurs les plus chauds sont *has3 aba3-1* et *has4 aba3-1*. La différence entre *has4 aba3-1* et *aba3-1* peut être très importante dans certaines conditions de déshydratation. *has3 aba3-1* reste nettement plus chaud que *aba3-1* de façon plus indépendante de l'intensité de la déshydratation. *has1 aba3-1* et *has2 aba3-1* montrent une différence de température avec *aba3-1* un peu moins élevée que les deux autres supresseurs. Cette différence reste néanmoins claire excepté lorsque la déshydratation appliquée est trop faible : il devient alors plus difficile des les différencier nettement d'*aba3-1*.

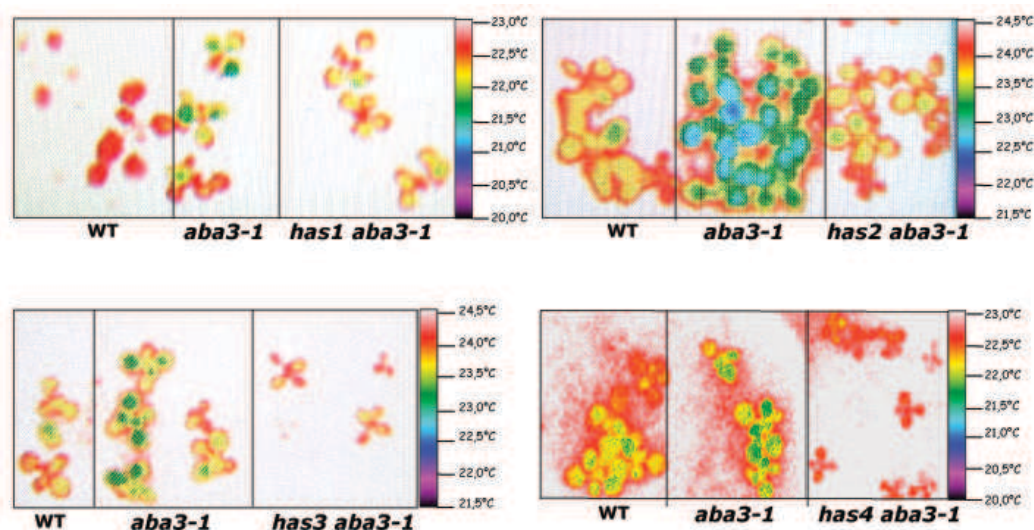


FIG. 2.1 – Images en thermographie infrarouge (fausses couleurs) des supresseurs (BC0) ; plantules de 12 à 15 jours après une déshydratation de 5 à 8 jours.

2.2.2 Tous les supresseurs sont résistants à une déshydratation progressive

Le deuxième critère de sélection des supresseurs, après l'augmentation de la température foliaire, est une réduction de la perte en eau par rapport à *aba3-1* après une déshydratation progressive. Celle-ci est effectuée sur des plantes cultivées une semaine *in vitro* puis 3 semaines en serre, par un arrêt d'arrosage de 7 jours. Les résultats présentés dans la figure 2.2 montrent qu'à l'issue d'une telle déshydratation tous les supresseurs ont une teneur relative en eau supérieure à celle d'*aba3-1*, et même supérieure à celle du sauvage pour *has1 aba3-1* et *has3 aba3-1* en accord avec une amélioration de la tolérance à la sécheresse par les mutations aux loci *has*.

2.2.3 Déshydratation rapide

La transpiration accrue du mutant *aba3-1* est aussi mesurable lorsque des rosettes coupées des racines sont soumises à une déshydratation rapide sous une hotte à flux laminaire. La fermeture stomatique en réponse à ce type de déshydratation est évaluée par la quantité d'eau perdue (c'est-à-dire la perte de poids) après 30 min de déshydratation (figure 2.3). Seuls *has2 aba3-1* et *has4 aba3-1* semblent perdre significativement moins d'eau qu'*aba3-1*, tandis que les différences entre les deux autres supresseurs et *aba3-1* ne sont pas significatives.

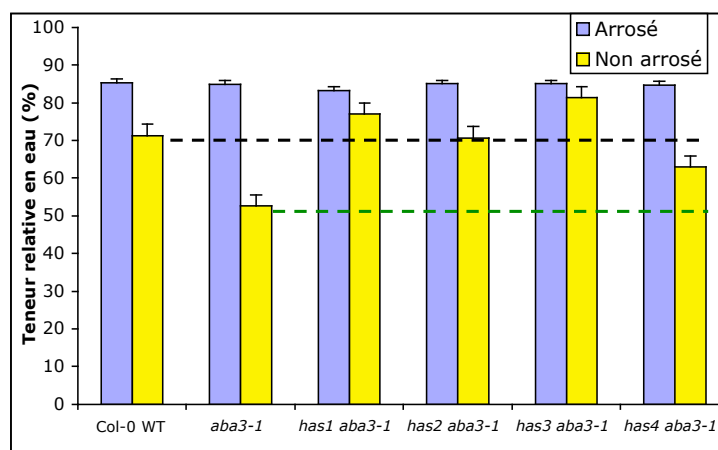


FIG. 2.2 – Teneur en eau des supprimeurs (BC0) après une déshydratation progressive. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard pour 4 répétitions.

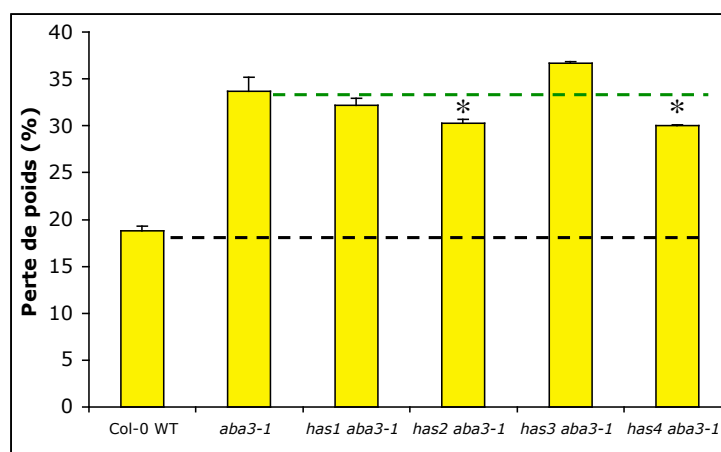


FIG. 2.3 – Perte d'eau après 30 min de déshydratation rapide des rosettes des supprimeurs (BC2) coupées. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard pour 4 répétitions. Test T de Student réalisé pour les supprimeurs par rapport à *aba3-1* ; * : $p < 0,05$.

2.2.4 Observation infrarouge de feuilles détachées

Pour visualiser la fermeture des stomates en réponse immédiate à un stress au niveau des parties aériennes il est possible d'observer en thermographie infrarouge une feuille qui vient d'être coupée d'une plante bien arrosée. La feuille est exposée face abaxiale, où la densité stomatique est la plus grande, sur le dessus devant l'objectif et sa température est mesurée pendant plusieurs minutes. Avec cette méthode, pendant les premières minutes, la différence entre le sauvage et *aba3-1* est encore plus importante que lorsque l'on observe des plantules déshydratées dans un pot. Il est apparu que les feuilles détachées des supprimeurs *has1 aba3-1* et *has2 aba3-1* avaient une température similaire à celles d'*aba3-1*, tandis que celles de *has3 aba3-1* et *has4 aba3-1* montraient une température plus proche de celle des feuilles sauvages (fig 2.4, 2.5). Les deux supprimeurs présentant des feuilles détachées chaudes sont ceux qui ont le phénotype de température foliaire élevée de plantules déshydratées le plus clair.

Pour *has4 aba3-1*, ces résultats sont cohérents avec la perte d'eau réduite en déshydratation rapide. Par contre on aurait attendu que *has2 aba3-1* ait des feuilles détachées chaudes et non *has3 aba3-1*. Ces différences peuvent s'expliquer par les deux échelles de temps distinctes utilisées pour ces deux expériences : 30 minutes pour la déshydratation rapide et moins de 5 minutes pour les observations infrarouge. Il est possible que le processus permettant à *has2 aba3-1* de mieux conserver son eau se mette en place après plus de 5 minutes de déshydratation et que la plus grande température foliaire de *has3 aba3-1* reflète une augmentation de la fermeture stomatique transitoire ou contrebalancée par un autre phénomène plus tardif en déshydratation rapide.

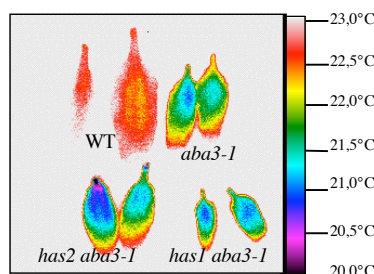


FIG. 2.4 – Image infrarouge (fausses couleurs) de feuilles détachées de *has1 aba3-1* et *has2 aba3-1* (BC0)

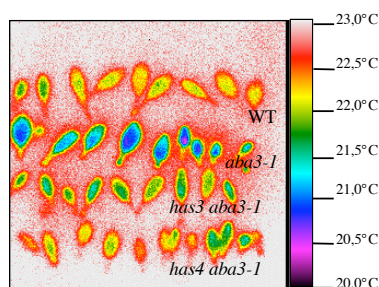


FIG. 2.5 – Image infrarouge (fausses couleurs) de feuilles détachées (une plante par génotype) de *has3 aba3-1* et *has4 aba3-1* (BC0).

2.2.5 Réponse des stomates à l'ABA

Afin de tester la réponse de la fermeture stomatique à l'ABA, la technique de thermographie infrarouge de feuilles détachées a été utilisée. Deux plantes bien arrosées de chaque génotype ont été pulvérisées avec une solution d'ABA à $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ et deux autres avec une solution de même composition sans ABA [éthanol 0,1 % (v/v)] 45 minutes avant les observations. Pour une lignée donnée, deux feuilles de chacune des quatre plantes ont été prélevées en même temps et la température des feuilles pulvérisées avec de l'ABA est comparée à celles des feuilles pulvérisées avec la solution témoin; une photographie est prise moins d'une minute après le prélèvement (figure 2.6) (à cause d'un problème technique, la comparaison à l'échelle de température habituelle n'est pas possible, néanmoins les photos ont toutes été prises avec la même échelle et sont donc comparables). L'effet de l'ABA est visible sur les deux témoins, sauvage et *aba3-1*. Le même effet se retrouve chez *has1 aba3-1* et *has2 aba3-1* qui semblent répondre à l'ABA à peu près comme les témoins. Par contre chez *has3 aba3-1*, la différence de température entre les feuilles pulvérisées par la solution témoin et l'ABA paraît plus élevée que chez les témoins. A l'inverse, pour *has4 aba3-1* aucune réponse à l'ABA n'est observée, soit parce que les stomates de ce suppressor ne répondent pas à l'ABA, soit parce que ses stomates ne peuvent pas se fermer davantage. La température des feuilles non traitées de *has3 aba3-1* est similaire à celles d'*aba3-1*, en contraste avec les résultats présentés dans la figure 2.5. Cette différence est peut-être due à un enroulement des feuilles qui a contribué à empêcher l'évaporation de la solution pulvérisée. Néanmoins, ces résultats sont préliminaires et devront être confirmés sur un plus grand nombre de plantes et de feuilles avec des mesures de température qui permettront de montrer si ces observations sont statistiquement significatives. Ils pourront également être confirmés par des mesures de conductance stomatique et d'ouverture stomatique en réponse à l'ABA sur des pelures d'épiderme.

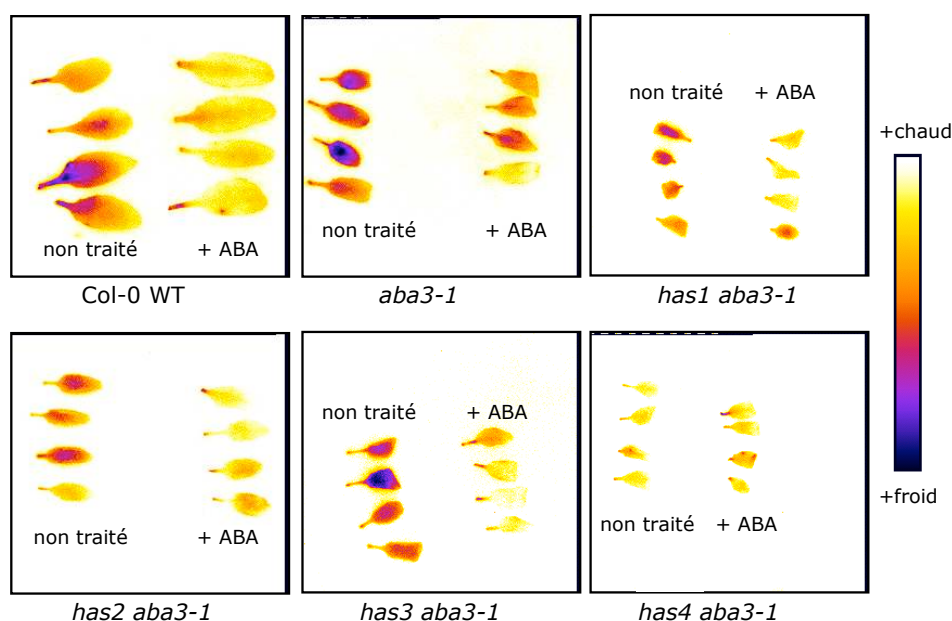


FIG. 2.6 – Images en thermographie infrarouge (fausses couleurs) de feuilles des témoins et suppressors (BC2) pulvérisées avec une solution témoin ou une solution de $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ d'ABA.

2.2.6 Les supprimeurs ne sont pas affectés dans la biosynthèse de l'ABA

La résistance accrue des supprimeurs à la déshydratation pourrait être expliquée par une meilleure accumulation de l'ABA, c'est pourquoi des dosages d'ABA ont été effectués sur des plantes ayant subi les deux types de déshydratations décrites au dessus. Une déshydratation rapide de 4 h 30 provoque une élévation importante de la teneur en ABA : celle-ci augmente d'un facteur 17 chez le sauvage et 10 chez *aba3-1* (figure 2.7), alors qu'une déshydratation progressive provoque une multiplication par 5 de la teneur en ABA chez le sauvage et par 3 chez *aba3-1* (figure 2.8). Le stress rapide permet de voir une plus grande différence entre le sauvage et *aba3-1* puisque le rapport entre leur concentrations respectives en ABA après la déshydratation est de plus de 8, alors qu'il n'est que de 2,5 pour la déshydratation physiologique. Malgré ces différences, pour aucune des deux déshydratation, un des supprimeurs ne semble accumuler plus d'ABA qu'*aba3-1*.

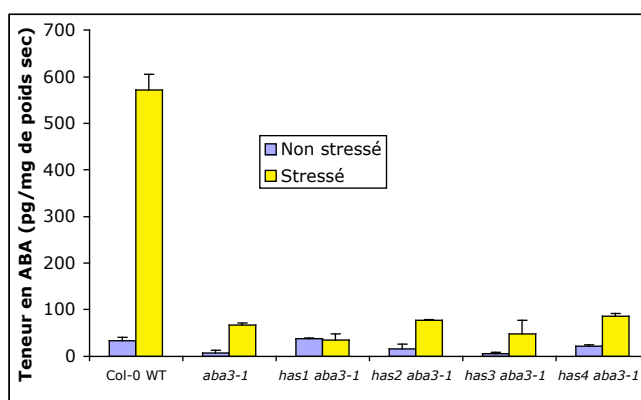


FIG. 2.7 – Accumulation d'ABA des supprimeurs (BC1) après 4 h 30 de déshydratation rapide. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard pour 2 répétitions.

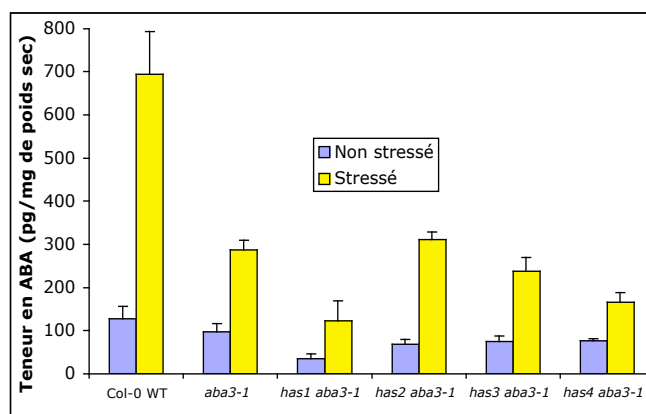


FIG. 2.8 – Accumulation d'ABA des supprimeurs (BC0) après une déshydratation progressive. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard pour 3 répétitions.

2.2.7 Expression de gènes de réponse au stress hydrique

Comme les mutants suppresseurs n'accumulent pas davantage d'ABA qu'*aba3-1*, il est possible qu'ils soient affectés dans la signalisation de l'ABA et/ou du stress hydrique. Afin de tester cette hypothèse au niveau moléculaire, l'expression de quatre gènes de réponse au stress hydrique a été mesurée. Ils ont été choisis pour les différentes voies de régulation impliqués dans leur induction (voir introduction 2.5). *RD29B* est le gène de référence pour l'étude de la régulation via les ABRE et semble contrôlé majoritairement par l'ABA. Le promoteur de *RD22* contient des séquences reconnues par deux facteurs de transcription MYC et MYB, impliqués dans l'induction dépendante de l'ABA de gènes exprimés tardivement en réponse à la déshydratation. L'expression de *RD29A* est régulée par des voies dépendantes et indépendantes de l'ABA. Son promoteur comporte un élément de régulation en *cis* DRE, impliqué dans l'induction de gènes de réponse au stress hydrique indépendante de l'ABA. *ERD1* est également induit par une voie indépendante de l'ABA, distincte de celle mettant en jeu les DRE. *Cor15A* est principalement induit par le froid, mais aussi par l'ABA et la déshydratation (Baker et al., 1994) ; son promoteur contient un DRE (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2006).

Des rosettes de trois semaines ont été soumises à deux déshydratations différentes :

- une déshydratation modérée jusqu'à 10 % de perte du poids total suivie de 4 h d'incubation dans un tube fermé à l'obscurité (déshydratation à 10 %), ce qui produit un stress qui n'évolue pas sur une période donnée
- une déshydratation rapide de 4 h 30 sous une hotte à flux laminaire (déshydratation rapide) qui induit un stress croissant avec une perte en eau qui augmente durant le stress

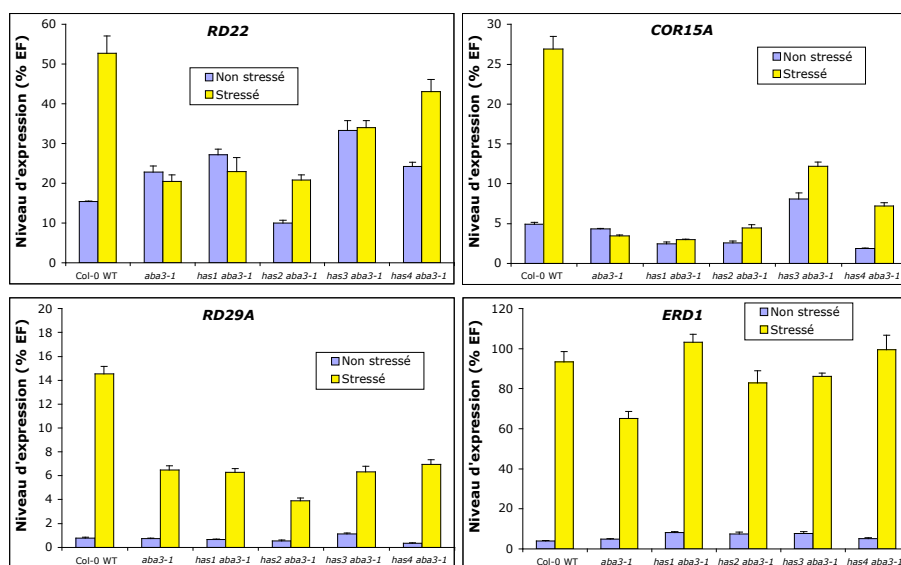


FIG. 2.9 – Expression des gènes de réponse au stress hydrique chez les suppresseurs (BC1) après une déshydratation à 10 % (p/p). Les barres d'erreur représentent l'erreur standard sur 3 répétitions de la PCR quantitative.

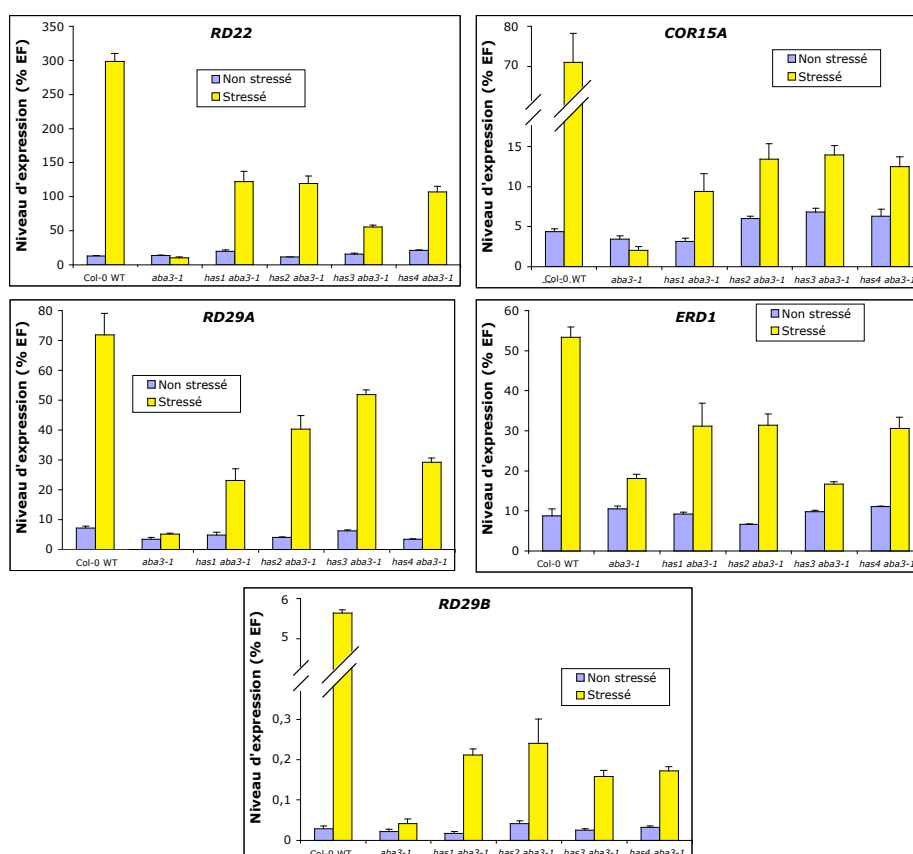


FIG. 2.10 – Expression des gènes de réponse au stress hydrique chez les suppresseurs (BC1) après une déshydratation rapide. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard sur 3 répétitions de la PCR quantitative.

L'analyse de l'expression du gène *RD29B*, qui est très peu exprimé, n'a pu être faite que pour la déshydratation rapide. En effet, les niveaux d'expression de ce gène dans les plantes non stressées sont tellement faibles qu'ils n'ont pas toujours pu être mesurés avec une bonne précision.

Il apparaît clairement que les gènes étudiés sont induits de façon différente selon le type de déshydratation. Lors de la déshydratation à 10 %, les gènes *RD22* et *COR15A* sont assez peu induits chez le sauvage (respectivement x3 et x5) et pas du tout chez *aba3-1*, alors que l'expression de *RD29A* et *ERD1* est multipliée par 20 chez le sauvage et près de 10 chez *aba3-1*. A l'inverse, la déshydratation rapide provoque chez le sauvage une forte induction de *RD22* (x20) et *COR15A* (x10) et une induction plus modérée de *RD29A* (x10) et *ERD1* (x6). Cette déshydratation se distingue par le fait que les gènes de réponse à la déshydratation sont pas ou peu induits chez *aba3-1*.

Les différences d'expression des gènes marqueurs entre *aba3-1* et les supresseurs semble dépendre plus du type de déshydratation subie par les plantes que du gène étudié. Le supresseur *has1 aba3-1* a un profil d'expression des gènes de réponse à la déshydratation assez similaire à *aba3-1*, excepté pour *ERD1* exprimé au même niveau que le sauvage, lors de la déshydratation à 10 %. Par contre, après la déshydratation rapide, tous les gènes marqueurs ont un niveau d'expression intermédiaire entre le sauvage et *aba3-1*. Pour *has2 aba3-1*, le niveau de réponse des gènes marqueurs varie selon la déshydratation et non selon le gène : ils sont tous induits comme ou légèrement plus que chez *aba3-1* lors de la déshydratation à 10 % et ont tous un niveau d'expression intermédiaire entre le sauvage et *aba3-1* dans des conditions de déshydratation rapide. Après les déshydratations rapide et à 10 % de *has3 aba3-1*, les gènes marqueurs ont un niveau d'expression similaire ou un peu plus élevé que chez *aba3-1* (excepté *RD29A* en déshydratation rapide où la différence est plus nette). *has4 aba3-1* montre une meilleure induction par rapport à *aba3-1* pour la majorité des gènes pour les deux déshydratations, le seul gène pour lequel la différence avec *aba3-1* est peu importante étant *RD29A*, ainsi que *RD29B* pour la déshydratation rapide. D'après les résultats obtenus avec la déshydratation rapide, il semble que la réponse à l'ABA au niveau transcriptionnel est partiellement rétabli chez les supresseurs en conditions de stress. Cela indique que la voie de signalisation de l'ABA peut fonctionner avec des quantités d'ABA réduites. L'ensemble de ces mesures devra être répété afin de confirmer ces résultats.

2.3 Caractérisation physiologique

Même si les supresseurs ont été sélectionnés sur leur réponse à la déshydratation, il est probable que ce ne soit pas leur seul phénotype. Ils peuvent également être affectés dans leur développement, et dans leur réponse à d'autres stress. Ainsi, le mutant *aba3-1* montre des différences développementales avec le sauvage. Il présente une stature réduite au niveau de la rosette, de la hampe et de l'appareil racinaire, ainsi qu'une floraison précoce et ces différences sont compensées partiellement par un apport d'ABA exogène. Il est possible que certains de ces phénotypes soient en partie supprimés chez les supresseurs, de la même façon que la résistance à la déshydratation est améliorée, ou bien que les mutations de suppression aient par un autre biais une influence sur ces paramètres. Il est aussi possible que la réponse à d'autres types de stress impliquant l'ABA, comme le stress salin, ou le stress biotique, soit affectée.

Il a été évoqué dans le paragraphe 2.2.7 la possibilité que les supresseurs soient affectés dans la signalisation de l'ABA. L'induction par la déshydratation plus marquée chez les supresseurs que chez *aba3-1* de gènes marqueurs par des voies dépendantes de l'ABA (*RD22*, *COR15A* et *RD29B*) lors d'une déshydratation rapide ne provoquant qu'une faible accumulation d'ABA chez *aba3-1* et les supresseurs (figure 2.7) suggère que des voies de signalisation de l'ABA sont affectées par les mutations de suppression. Pour confirmer cette hypothèse, les réponses à l'ABA des supresseurs ont été testées, en liaison avec les caractéristiques physiologiques étudiées.

2.3.1 Caractéristiques des parties aériennes

2.3.1.1 Croissance de la rosette

Le diamètre maximal (c'est-à-dire la plus grande longueur entre les extrémités de deux feuilles opposées) de la rosette est mesuré à la fin de la croissance de celle-ci. Il varie selon la durée du jour, lorsque les plantes poussent dans une chambre de culture en jour court (8 h de jour) ou en jour long (16 h de jour) (figure 2.11).

La croissance dans une chambre de culture en jour long permet de voir la meilleure différence de stature entre le sauvage et *aba3-1*, ce sont donc des conditions où l'effet de la déficience en ABA sur la croissance de la rosette est plus important. C'est d'ailleurs dans ces conditions que l'on observe des différences de taille nettes entre *aba3-1* et la majorité des supresseurs : *has1 aba3-1*, *has2 aba3-1* et *has3 aba3-1* sont un peu plus grands, tandis que *has4 aba3-1* est plus petit. Les jours courts sont plus favorables pour la croissance des deux témoins et des supresseurs, mais moins à la détection de différence de taille entre les supresseurs et *aba3-1*. Dans ces conditions, seul *has4 aba3-1* montre une différence de taille avec *aba3-1* significative : il est, encore plus clairement qu'en jour long, plus petit.

La plus nette différence de taille entre les trois plus grands supresseurs et *aba3-1* en jour long pourrait être due à un impact plus fort de la déficience en ABA sur la croissance, qui rendrait mieux visible l'effet des mutations de suppression. Il est aussi possible que les conditions de jour long augmentent les conséquences des mutations de suppression sur la croissance de la rosette indépendamment de l'ABA.

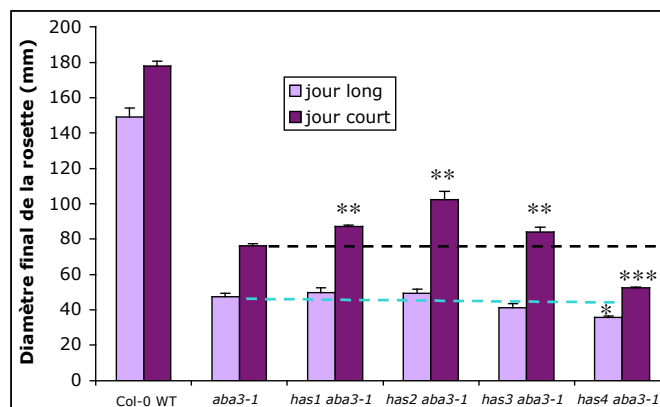


FIG. 2.11 – Diamètre maximal final de la rosette des supresseurs (BC0) lors d'une culture dans deux chambres de culture en jour long et en jour court. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard pour 4 répétitions. Test T de Student réalisé pour les supresseurs par rapport à *aba3-1* ; * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$.

2.3.1.2 Croissance de la hampe florale

Des mesures de la hauteur de la hampe florale principale en fin de croissance de la plante ont été effectuées sur la même culture que pour le diamètre de la rosette dans une chambre de culture en jour long, présenté au dessus (figure 2.12). Pour ce caractère, le nanisme d'*aba3-1* est retrouvé dans une mesure moindre que pour la rosette. L'augmentation de taille par rapport à *aba3-1* observé pour la rosette dans ces mêmes conditions n'est pas toujours conservé pour la hampe. En effet, seul *has3 aba3-1* montre une hampe principale d'une hauteur significativement plus élevée que celle d'*aba3-1*, tandis que pour les autres la légère différence observée n'est pas significative. *has3 aba3-1* n'était pourtant pas le supprimeur avec la plus grande rosette des trois plus grands qu'*aba3-1*. Il semble que les mutations de suppression affectent plus la croissance de la rosette que celle de la hampe florale.

2.3.1.3 Délai de floraison

Un autre paramètre physiologique affecté par la déficience en ABA est le délai avant la floraison. Celle-ci a été datée par l'apparition de la hampe florale (hauteur entre 0,5 et 1 cm) (figure 2.13) lors d'une culture en serre. Le mutant *aba3-1* fleurit 2 jours plus tôt que le sauvage. Ce phénotype est encore plus marqué chez *has1 aba3-1* qui fleurit deux jours plus tôt qu'*aba3-1*. La floraison précoce induite par la déficience en ABA disparaît très clairement chez *has3 aba3-1* qui fleurit encore un jour plus tard que le sauvage.

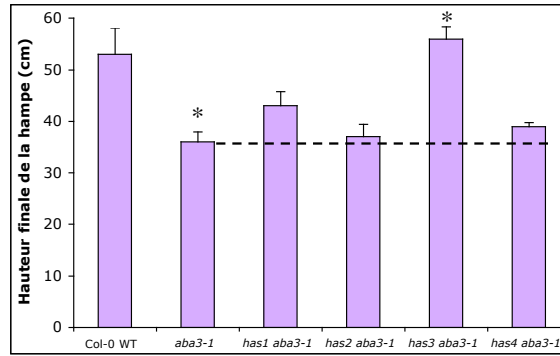


FIG. 2.12 – Hauteur finale de la hampe florale des supresseurs (BC0) lors d’une culture en chambre de culture en jour long. Les barres d’erreur représentent l’erreur standard pour 4 répétitions. Test T de Student réalisé pour les supresseurs par rapport à *aba3-1* ; * : $p < 0,05$.

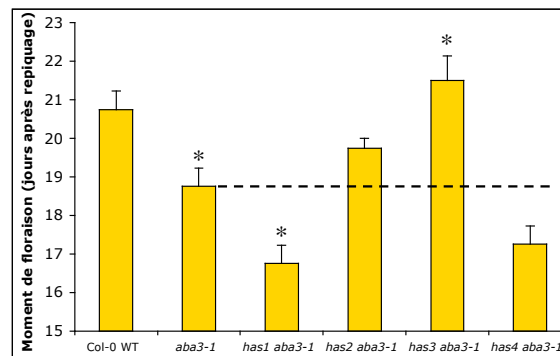


FIG. 2.13 – Nombre de jours entre le repiquage et l’apparition de la hampe florale des supresseurs (BC1). Les barres d’erreur représentent l’erreur standard pour 4 répétitions. Test T de Student réalisé pour *aba3-1* par rapport au sauvage et pour les supresseurs par rapport à *aba3-1* ; * : $p < 0,05$.

2.3.1.4 Tolérance des supresseurs à un pathogène

De nombreuses études récentes ont montré le rôle de l'ABA dans la réponse aux pathogènes. Notamment, les mutants déficients en ABA se sont révélés plus résistants que le sauvage. En collaboration avec le laboratoire des Interactions Plante Pathogènes d'AgroParisTech, nous avons donc étudié si les mutations de suppression affectaient la réponse à un pathogène. Une infection par la bactérie *Erwinia chrysanthemi* a été réalisée sur *has2 aba3-1* et *has4 aba3-1* (figure 2.14) ; les deux autres supresseurs n'ont pas pu être testés à cause de problèmes de croissance. Comme attendu, *aba3-1* résiste mieux que le sauvage à la bactérie : plus de plantes avec une infection limitée à la moitié de la feuille inoculée sont dénombrées à partir du deuxième jour, et une plus petite proportion de plantes montre une pourriture systémique à l'issue de l'expérience chez le mutant. La résistance est faible chez *has2 aba3-1*, puisque le nombre de plantes atteintes de pourriture systémique aux jours 2, 3 et 6 est quasiment le même que chez le sauvage, mais les plantes restantes sont moins atteintes par l'infection que chez le sauvage. *has4 aba3-1* ne montre aucun signe de la résistance que pourrait lui conférer sa déficience en ABA : dès le premier jour, les plantes montrent des symptômes plus graves que les témoins et au troisième jour, plus de plantes montrent les symptômes les plus graves que chez le sauvage. Ainsi chez au moins deux supresseurs, la suppression du phénotype de sensibilité au stress hydrique s'accompagne de la suppression de la tolérance aux pathogènes, illustrant l'effet antagoniste de l'ABA sur ces mécanismes et le rôle possible des gènes *has* dans cette signalisation.

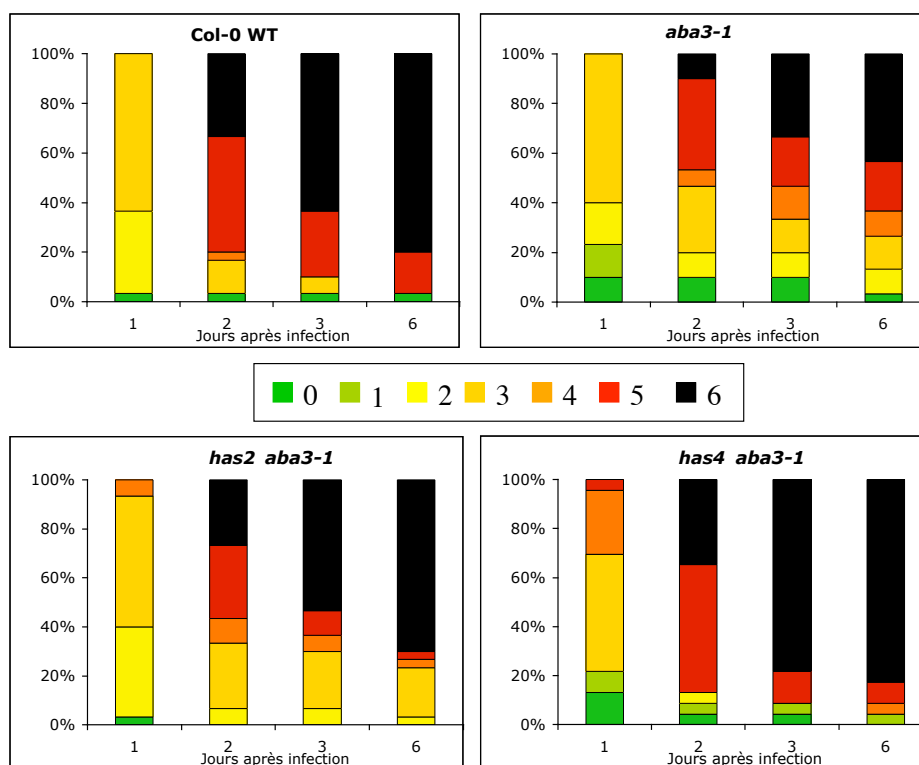


FIG. 2.14 – Répartition des niveaux de gravité de l'infection par *Erwinia chrysanthemi* dans des conditions tropicales dans des populations sauvage, *aba3-1*, *has2 aba3-1* et *has4 aba3-1* (BC0) et son évolution pendant 6 jours après l'inoculation. Les notes correspondent aux états de la plante suivants : 0 : pas de symptôme ; 1 : la macération est limitée au point d'infection ; 2 : la macération déborde du point d'infection ; 3 : la macération atteint la moitié du limbe ; 4 : la macération atteint la totalité du limbe ; 5 : la macération atteint la totalité de la feuille (limbe + pétiole) ; 6 : pourriture molle systémique.

2.3.1.5 Sensibilité de la croissance des parties aériennes à l'ABA

L'effet de l'ABA sur la croissance est double : c'est un facteur positif de la croissance en l'absence de stress puisque quand il est en trop faible concentration, comme chez *aba3-1*, la stature de la plante est réduite, mais à fortes concentrations exogènes ou quand il s'accumule en réponse à un stress, il inhibe la croissance. Pour déterminer la réponse des mutants suppresseurs à l'ABA, nous avons choisi de mesurer l'effet sur la croissance de la rosette des suppresseurs de pulvérisations d'ABA à $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (figure 2.15). Les mesures de diamètre de rosette ont été effectuées en serre et celles de hauteur de la hampe dans une chambre de culture en jour long. L'ABA exogène inhibe légèrement la croissance de la rosette du sauvage et très peu celle de sa hampe mais compense partiellement la réduction de stature d'*aba3-1* causée par sa déficience en ABA, induisant l'augmentation du diamètre de sa rosette de 50 % et la hauteur de sa hampe de 20 %.

Aucun effet de compensation n'est observé pour *has1 aba3-1*, au contraire, la croissance de sa rosette et de sa hampe sont même légèrement inhibées. Il est difficile de déterminer si cette réponse est due à une insensibilité à l'ABA ou bien à une hypersensibilité qui annulerait l'effet de la compensation chez un mutant déficient en ABA par une amplification de l'effet inhibiteur. L'ABA n'a pas un effet significativement différent d'*aba3-1* sur la croissance de la hampe de *has2 aba3-1* mais l'effet de compensation du diamètre de la rosette est un peu moindre que chez *aba3-1*. Cela pourrait s'expliquer par une perte de sensibilité à l'hormone. Un peu comme *has1 aba3-1*, *has3 aba3-1* montre une réponse réduite à l'ABA, particulièrement pour la croissance de la hampe. *has4 aba3-1* se distingue par le fait que sa croissance est plus fortement compensée par l'ABA qu'*aba3-1*. Cet effet pourrait s'expliquer par une hypersensibilité à l'ABA.

2.3.2 Étude de la germination

2.3.2.1 Résistance au paclobutrazol

L'ABA étant un inhibiteur de la germination, la déficience en ABA d'*aba3-1* réduit son besoin en gibbérellines pour activer la germination, qui peut être mis en évidence par la résistance à un inhibiteur de la synthèse de l'acide gibbérannique (GA) comme le paclobutrazol, qui empêche la germination du sauvage. Les résultats de la germination des suppresseurs sur une gamme de concentrations en paclobutrazol sont présentés sur la figure 2.16. La sensibilité du sauvage à l'inhibiteur est visible à partir d'un seuil de $3.10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ de paclobutrazol à partir duquel quasiment plus une seule graine ne germe, alors que le pourcentage de germination d'*aba3-1* est toujours supérieur à 70 %. La sensibilité à l'inhibiteur est évaluée par leur germination sur $10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ et $3.10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de paclobutrazol. L'inhibition de la germination de *has2 aba3-1* ne paraît pas significative. *has1 aba3-1* et *has4 aba3-1* semblent un peu plus sensibles qu'*aba3-1*, tandis que *has3 aba3-1* est nettement plus sensible que le sauvage à $10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ de paclobutrazol et ne germe plus à la plus forte concentration. Ces résultats devront être confirmés par une analyse de la dormance des graines.

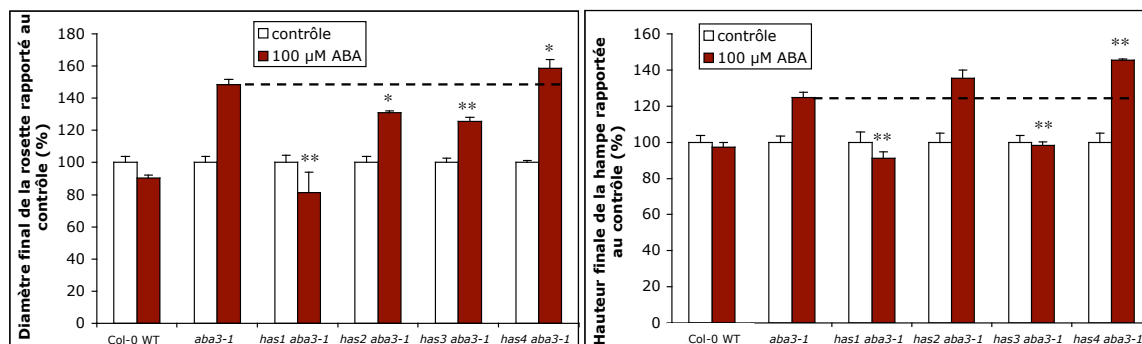


FIG. 2.15 – Mesures biométriques avec et sans pulvérisation d'ABA à $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ du diamètre final de la rosette lors d'une culture en serre (suppresseurs BC1) et de la hauteur finale de la hampe des suppresses (BC0) en chambre de culture en jour long. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard pour 3 à 4 répétitions. Test T de Student réalisé pour les suppresses par rapport à *aba3-1* ; * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$.

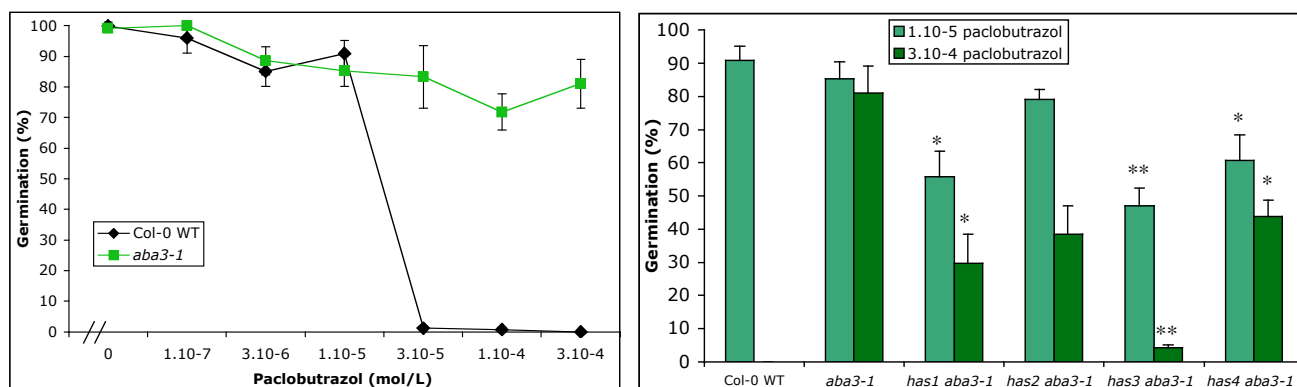


FIG. 2.16 – Résistance au paclobutrazol de la germination des graines des suppresses (BC2). Les barres d'erreur représentent l'erreur standard pour 3 répétitions. Test T de Student réalisé pour les suppresses par rapport à *aba3-1* ; * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$.

2.3.2.2 Résistance au stress salin à la germination

Un stress salin inhibe la germination par un processus faisant intervenir l'ABA ce qui explique qu'un mutant déficient en ABA tel qu'*aba3-1* germe mieux que le sauvage sur de fortes concentrations en sel. Comme pour le paclobutrazol, la résistance d'*aba3-1* à l'effet inhibiteur du chlorure de sodium est claire (figure 2.17). Alors que le taux de germination du sauvage commence à diminuer à partir de 150 mmol.L⁻¹ de NaCl pour atteindre 20 % à une concentration de 250 mmol.L⁻¹, la germination du mutant déficient en ABA se maintient au dessus de 85 % jusqu'à 200 mM de NaCl et n'atteint que 65 % à 250 mmol.L⁻¹. Cette fois-ci, *has3 aba3-1* est nettement plus sensible que le sauvage puisque moins de la moitié de ses graines germe dès 50 mmol.L⁻¹ et plus aucune à 250 mmol.L⁻¹. *has2 aba3-1* montre un profil de germination en réponse au sel assez similaire à celui du sauvage, tandis que *has1 aba3-1* et *has4 aba3-1* semblent encore un peu plus sensibles.

2.3.2.3 Sensibilité à l'ABA à la germination

Le rétablissement de la sensibilité (éventuellement partielle) des supresseurs au paclobutrazol et au stress salin pourrait s'expliquer par une plus grande sensibilité à l'ABA au niveau de la graine. En effet, si une mutation de suppression affecte les voies impliquées dans ces processus de contrôle de la germination par l'ABA, le supresseur correspondant pourrait ne plus germer aussi bien qu'*aba3-1* dans ces conditions. Pour vérifier cette hypothèse un test de germination sur différentes concentrations en ABA a été réalisé (figure 2.18). La sensibilité à l'ABA de la germination du sauvage et d'*aba3-1* est pratiquement la même ; *aba3-1* apparaît très légèrement plus sensible, ce qui pourrait être un mécanisme de compensation de sa déficience en ABA. *has2 aba3-1* a un profil de germination quasiment similaire à *aba3-1*, tandis que *has1 aba3-1* et *has4 aba3-1* sont un peu plus sensibles et *has3 aba3-1* beaucoup plus sensible. Les légers phénotypes de sensibilité aux inhibiteurs de germination de *has2 aba3-1* ne semblent donc pas être dus à un changement de sensibilité à l'ABA, mais pour les trois autres supresseurs cette sensibilité paraît corrélée à une plus grande sensibilité à l'ABA.

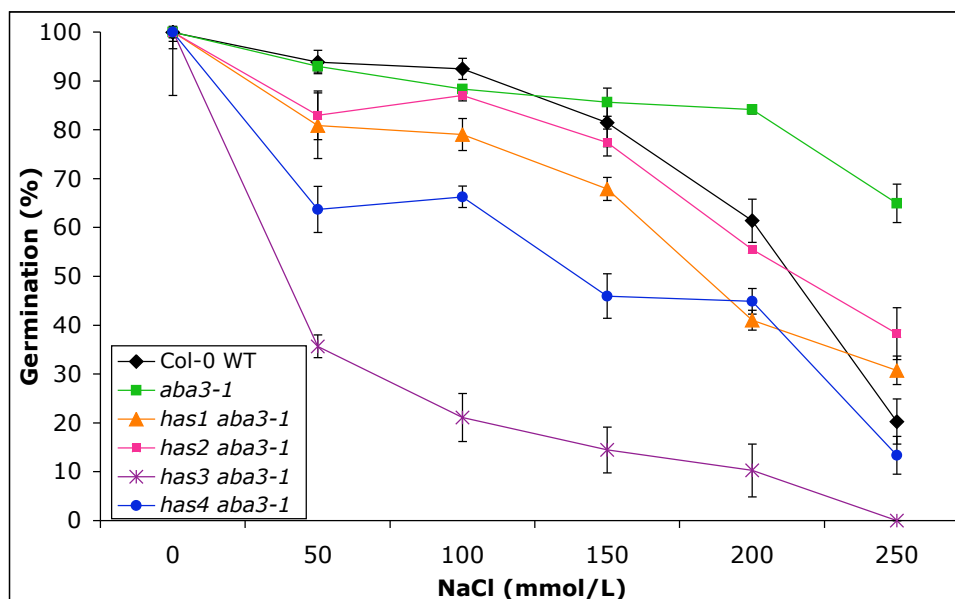


FIG. 2.17 – Résistance au stress salin de la germination des graines des supresseurs (BC2). Les barres d'erreur représentent l'erreur standard pour 3 répétitions.

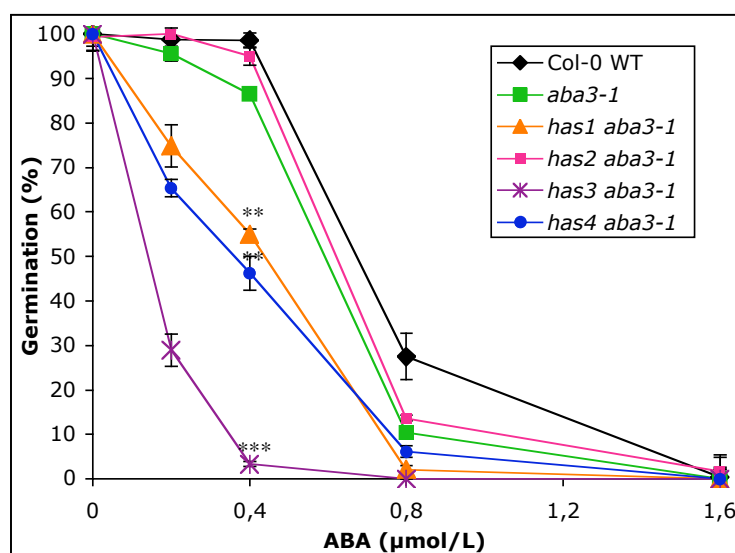


FIG. 2.18 – Sensibilité à l'ABA de la germination des supresseurs (BC2). Les barres d'erreur représentent l'erreur standard pour 3 répétitions. Test T de Student réalisé pour les supresseurs par rapport à *aba3-1* ; ** : $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

2.3.3 Étude de la croissance racinaire

2.3.3.1 Croissance racinaire

La croissance racinaire est un paramètre important de la réponse à la déshydratation, puisque le développement de l'appareil racinaire est une des réponses à un stress hydrique. L'élongation de la racine principale des supprimeurs a été mesurée à l'occasion de plusieurs tests de sensibilité des racines. Les résultats de trois expériences indépendantes ont été regroupés afin de calculer une moyenne globale. Étant donné que les conditions de ces trois tests étaient un peu différentes, la longueur atteinte par la racine principale des témoins n'était pas la même pour les trois tests, c'est pourquoi, pour pouvoir les comparer, les mesures d'élongation ont été normalisées par la valeur obtenue pour le témoin *aba3-1*, les résultats sont donc donnés en pourcentage de la longueur racinaire d'*aba3-1* (figure 2.19). Seul *has2 aba3-1* a une racine principale un peu plus longue qu'*aba3-1*, tandis que *has1 aba3-1* et *has4 aba3-1* ont une racine plus courte. Il n'y a pas de différence significative de longueur de racine entre *has3 aba3-1* et *aba3-1*.

2.3.3.2 Croissance des racines en réponse à des stress salin et osmotique

Afin de voir si la réponse à d'autres types de stress hydrique que la déshydratation était affectée chez les supprimeurs, la croissance de leur racine principale sur des milieux hypersalin (100 mmol.L⁻¹ de NaCl) ou hyperosmotique (60 mmol.L⁻¹ de mannitol) a été mesurée et étant donné que les racines des supprimeurs sont de taille variable (voir 2.3.3.1) l'effet du stress a été évalué par le calcul du pourcentage de croissance par rapport au contrôle (figure 2.20). Tous les génotypes semblent répondre de façon similaire au stress osmotique induit par le mannitol. Le stress salin inhibe à peu près de la même manière le sauvage, *aba3-1*, *has2 aba3-1* et *has3 aba3-1*, mais *has1 aba3-1* et *has4 aba3-1* paraissent nettement plus sensibles que les témoins à 100 mmol.L⁻¹ de NaCl. Ces deux supprimeurs sont donc affectés dans la réponse de la croissance racinaire à un stress salin.

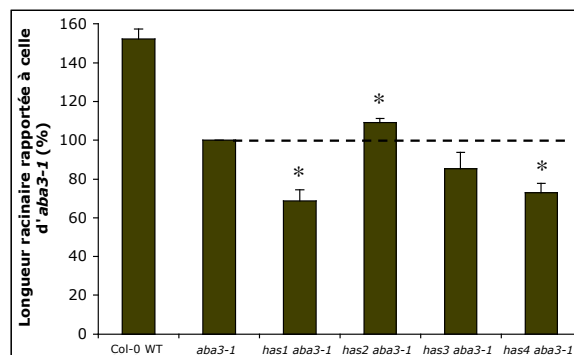


FIG. 2.19 – Élongation de la racine principale des suppresseurs (BC0) rapportée à la longueur de la racine principale d'*aba3-1*, calculée comme la moyenne des moyennes obtenues sur 3 expériences indépendantes. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard pour les moyennes des 3 expériences. Test T de Student réalisé sur les 3 moyennes pour les suppresseurs par rapport à *aba3-1* ; * : $p < 0,05$.

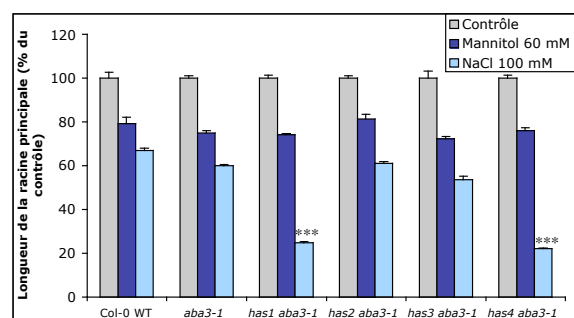


FIG. 2.20 – Effet de 60 mmol.L⁻¹ de mannitol et de 100 mmol.L⁻¹ de NaCl sur la croissance racinaire des suppresseurs (BC0). Les barres d'erreur représentent l'erreur standard pour 4 à 12 répétitions. Test T de Student réalisé pour les suppresseurs par rapport à *aba3-1* ; *** : $p < 0,001$.

2.3.3.3 Sensibilité à l'ABA de la croissance racinaire

L'ABA suffisamment concentré inhibe la croissance racinaire. L'effet de différentes concentrations en ABA sur l'élongation de la racine principale a été mesuré en pourcentage de la croissance sur milieu dépourvu d'ABA (figure 2.21). Une faible concentration en ABA ($0,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$) compense partiellement la longueur réduite de la racine principale d'*aba3-1* et modifie peu la taille de la racine du sauvage, tandis que de plus fortes concentrations (3 et $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$) inhibent la croissance racinaire de ces deux témoins. Le suppresseur *has3 aba3-1* montre peu de différences de réponse à l'ABA avec *aba3-1*. Par contre, *has1 aba3-1* et *has4 aba3-1* montrent une sensibilité à l'ABA très réduite, puisque leur longueur racinaire est quasiment inchangée sur $0,1$ et $3 \mu\text{mol.L}^{-1}$ d'ABA. Inversement, *has2 aba3-1* paraît avoir une sensibilité à l'ABA accrue, puisque la compensation de l'élongation racinaire à faible concentration en ABA est nettement supérieure à celle d'*aba3-1*. Lorsque ces résultats sont comparés à ceux de l'inhibition de la croissance racinaire par un stress salin, il apparaît que les deux suppresseurs ayant une sensibilité réduite à l'ABA sont ceux qui étaient plus sensibles au NaCl, tandis que *has3 aba3-1* qui avait la même sensibilité au stress salin qu'*aba3-1* a également la même sensibilité à l'ABA. Ces données indiquent un effet positif de l'ABA endogène sur la croissance racinaire, qui expliquerait la longueur réduite de la racine d'*aba3-1* (voir figure 2.19). Cette hypothèse est également cohérente avec le fait que s'ils sont moins sensibles à l'ABA, *has1 aba3-1* et *has4 aba3-1* aient une racine principale moins longue qu'*aba3-1*.

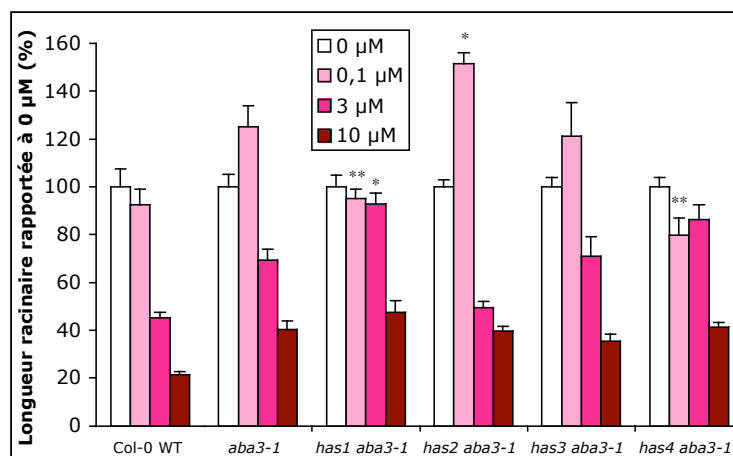


FIG. 2.21 – Effet d'une gamme de concentration en ABA sur la croissance de la racine principale des suppresseurs (BC0). Les barres d'erreur représentent l'erreur standard pour 4 à 8 répétitions. Test T de Student réalisé pour les suppresseurs par rapport à *aba3-1* ; * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$.

2.4 Effets des mutations de suppression en l'absence de la mutation *aba3-1*

Les mutations de suppression ont été sélectionnées parce qu'elles permettaient de supprimer certains effets d'une déficience en ABA sur la température foliaire et la résistance à une déshydratation progressive. Selon la fonction du gène muté, il est possible que la mutation ait des conséquences similaires lorsque la biosynthèse de l'ABA est restaurée, ou bien que certains effets (voire tous) ne soient visibles qu'en présence de la mutation *aba3-1*. Afin de voir dans quel cas peuvent être placées les mutations de suppression étudiées et également pour mieux comprendre certains phénotypes en les dissociant de l'effet de la déficience en ABA, des plantes portant chacune des mutations de suppression et le gène *ABA3* sauvage, à l'état homozygote, ont été sélectionnées et étudiées en fonction des phénotypes déjà connus des supresseurs. Pour l'instant, seule une étude préliminaire, reposant sur la température foliaire, la réponse à la déshydratation rapide, la sensibilité à l'ABA de la germination, la sensibilité au stress biotique ainsi qu'une observation qualitative des rosettes, a pu être menée.

2.4.1 Sélection des mutations *has* sans la mutation *aba3-1*

Une vingtaine de plantes F₂ issues du croisement entre chacun des supresseurs et le sauvage ont été testées avec un marqueur dCAPS qui détecte la présence de la mutation *aba3-1*. La descendance des plantes hétérozygotes pour *aba3-1* a été observée en thermographie infrarouge. Seules les plantes F₂ portant la mutation de suppression à l'état homozygote (elles sont récessives, voir section 2.6) peuvent avoir une descendance à 100 % chaude. En effet, les autres ont 1/4 de descendants homozygotes *aba3-1* qui sont tous (si la plante mère était homozygote sauvage au locus de la mutation de suppression) ou aux 3/4 (si la plante mère était hétérozygote au locus de la mutation de suppression) froids (figure 2.22). Les descendants d'une plante F₂ homozygote pour la mutation de suppression repérée de cette façon sont alors testés par le marqueur dCAPS afin de sélectionner les plantes homozygotes sauvages au locus *ABA3*.

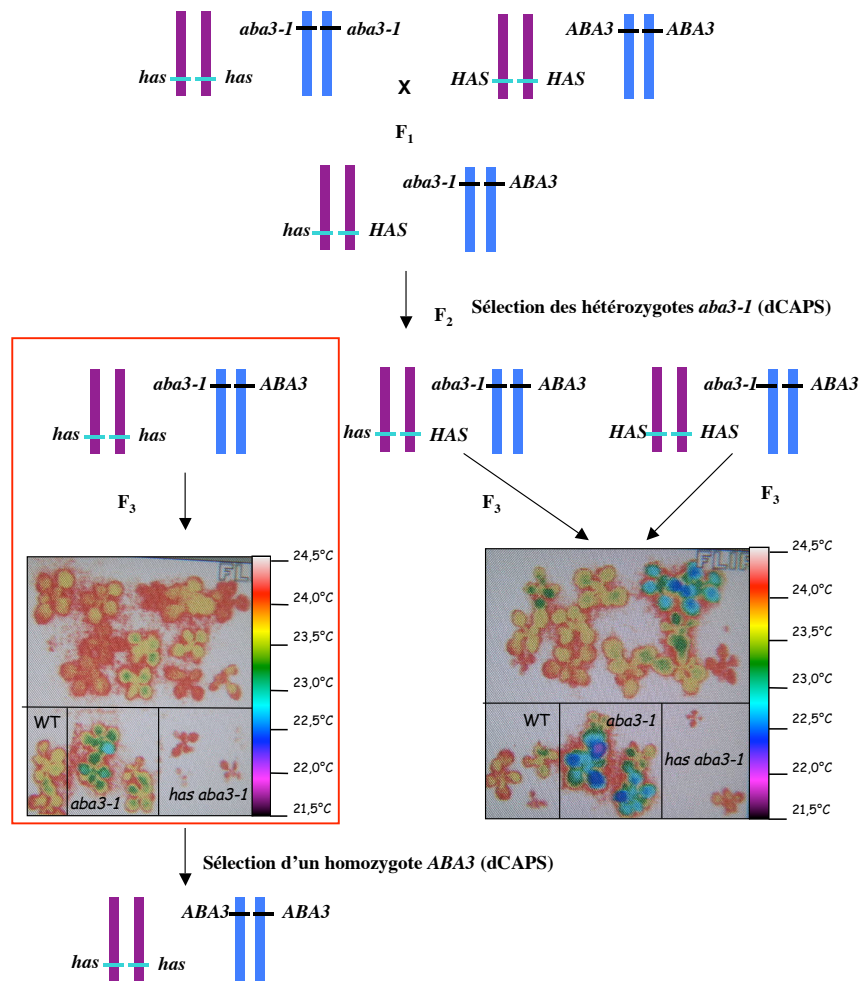


FIG. 2.22 – Sélection des mutations *has* sans la mutation *aba3-1*. La descendance F₃ de plantes hétérozygotes pour la mutation *aba3-1* de la génération F₂ sont observées par thermographie infra-rouge (images en bas). Parmi les plantes d'une descendance chaude à 100 %, un homozygote *ABA3* est sélectionné. *HAS* : allèle sauvage du gène affecté par la mutation de suppression, *has* : allèle muté du gène affecté par la mutation de suppression.

2.4.2 Caractérisation de *has1*

La morphologie et la taille des rosettes de *has1 aba3-1* et *has1* sont identiques.

2.4.2.1 Résistance à la déshydratation

La température foliaire (figure 2.23) de *has1* n'est pas plus élevée que celle du sauvage ; elle est comparable à celle de *has1 aba3-1*. *has1 aba3-1* n'était pas plus résistant à la déshydratation rapide qu'*aba3-1*. *has1* montre une perte d'eau après 30 min de déshydratation rapide plus grande que le sauvage (résultats non présentés). Cette mutation ne semble donc pas augmenter la résistance au stress hydrique du sauvage, mais cela reste à confirmer par une déshydratation progressive.

2.4.2.2 Sensibilité à l'ABA

Alors que *has1 aba3-1* était un peu plus sensible à l'ABA qu'*aba3-1*, la mutation *has1* seule ne modifie pas non plus significativement la sensibilité à l'ABA à la germination (résultats non présentés). Cela peut s'expliquer par le fait que la mutation *aba3-1* augmente la sensibilité à l'ABA à la germination (voir figure 2.18), ce qui pourrait accentuer une légère hypersensibilité à l'ABA.

2.4.2.3 Bilan

La mutation *has1* augmente la température foliaire et la sensibilité à l'ABA de la germination seulement dans un contexte de déficience en ABA. Le fait que la taille et la température foliaire de *has1* soient très similaires à celles de *has1 aba3-1* pourrait indiquer que ces phénotypes sont prédominants sur la déficience en ABA.

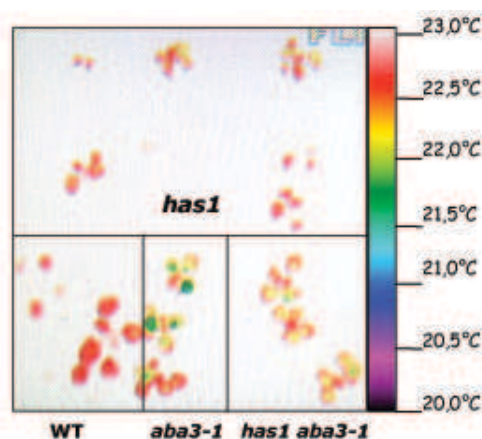


FIG. 2.23 – Image infrarouge (fausses couleurs) de plantules *has1* de 15 jours qui ont subi une déshydratation de 8 jours.

2.4.3 Caractérisation de *has2*

La stature de *has2 aba3-1* est assez proche de celles d'*aba3-1*. *has2* a une morphologie et une stature comparables à celles du sauvage.

2.4.3.1 Résistance à la déshydratation

has2 a une température foliaire supérieure à celle du sauvage (figure 2.24).

Le supprimeur *has2 aba3-1* a pour phénotype principal une meilleure résistance à une déshydratation rapide. Lors d'une déshydratation rapide, *has2* transpire significativement moins que le sauvage (figure 2.25). En particulier, il est notable qu'à partir du moment où la perte en eau est quasi-linéaire (après environ 90 min de déshydratation), les vitesses de perte de poids du sauvage et d'*aba3-1* sont très proches (leur courbes sont parallèles), et il en est de même pour *has2 aba3-1* et *has2*, pour lesquels cette vitesse est significativement plus faible que celle des témoins. Ils semblent donc avoir une transpiration réduite en régime stationnaire.

2.4.3.2 Sensibilité à l'ABA

has2 aba3-1 présente une sensibilité à l'ABA à la germination très proche de celle d'*aba3-1*. En accord avec ces résultats, la sensibilité à l'ABA de germination de *has2* n'est pas significativement différente de celle du sauvage (résultats non présentés).

2.4.3.3 Tolérance à un pathogène

Comme *has2 aba3-1*, *has2* est plus sensible au pathogène *Erwinia chrysanthemi* (figure 2.26). En effet, dès le deuxième jour après l'infection, la moitié des plantes *has2* présente des symptômes plus graves que les plantes sauvages. Par contre, la cinétique d'infection est assez similaire à celle du sauvage : il y a peu d'évolution des symptômes à partir du troisième jour après l'infection. L'infection du sauvage est moins avancée que lors du test sur les supprimeurs car cette expérience a été réalisée dans des conditions tempérées et non tropicales comme lors du premier test, qui sont moins favorables à la bactérie et permettent de mieux voir les différences avec le sauvage.

2.4.3.4 Bilan

Les différences et similarités principales entre *has2 aba3-1* et *aba3-1* sont retrouvées entre *has2* et le sauvage. Une déshydratation progressive devra être effectuée pour déterminer si *has2* résiste mieux que le sauvage au stress hydrique dans des conditions physiologiques.

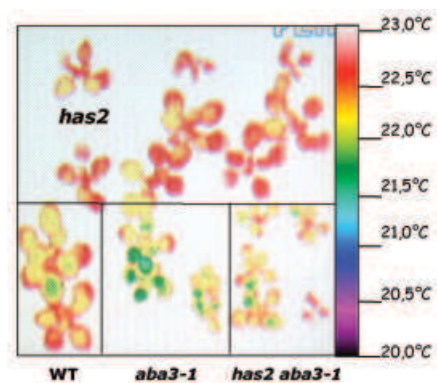


FIG. 2.24 – Image infrarouge (fausses couleurs) de plantules *has2* de 15 jours qui ont subi une déshydratation de 8 jours.

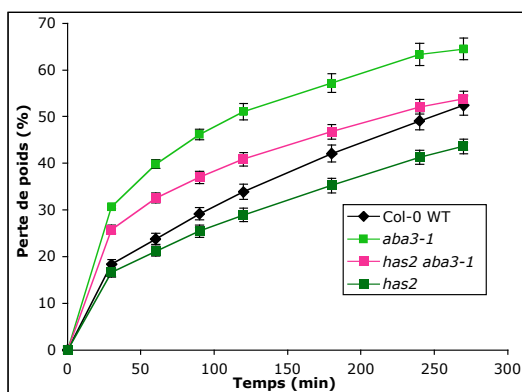


FIG. 2.25 – Cinétique de déshydratation rapide de rosettes *has2* et *has2 aba3-1* (BC2) pendant 4 h 30. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard pour 4 répétitions.

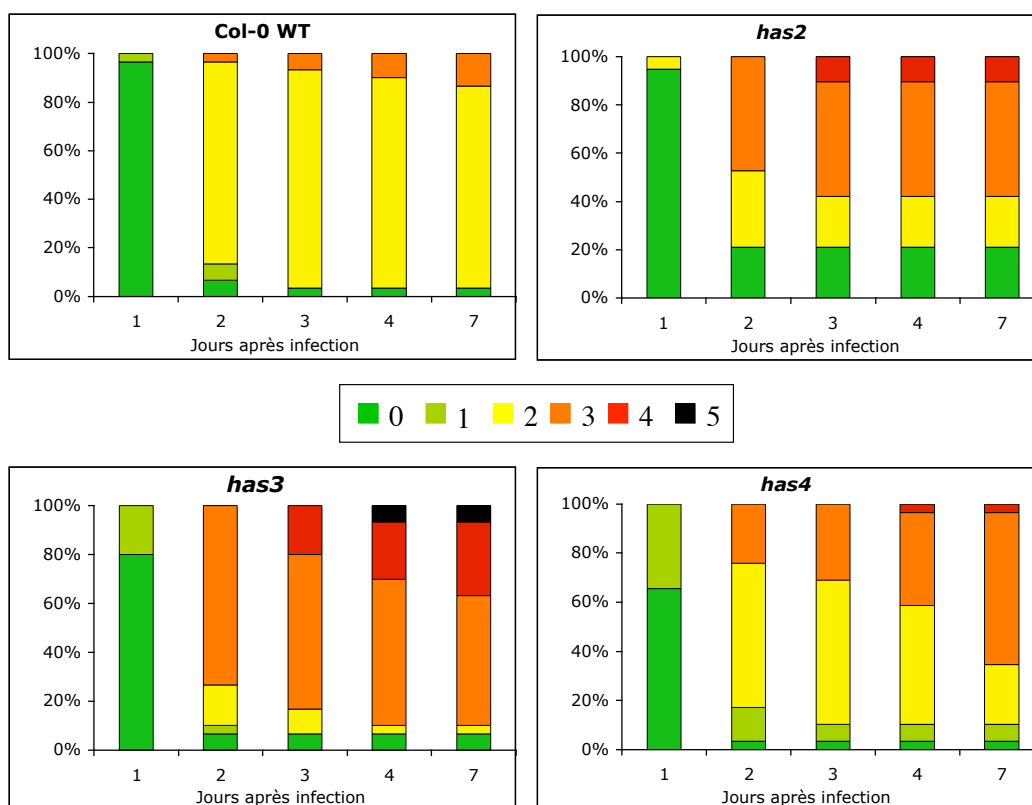


FIG. 2.26 – Répartition des niveaux de gravité de l'infection par *Erwinia chrysanthemi* dans des conditions tempérées dans des populations sauvage, *has2*, *has3* et *has4* et son évolution pendant 7 jours après l'inoculation. Les notes correspondent aux états de la plante suivants : 0 : pas de symptôme ; 1 : la macération est limitée au point d'infection ; 2 : la macération déborde du point d'infection ; 3 : la macération atteint la moitié du limbe ; 4 : la macération atteint la totalité du limbe ; 5 : la macération atteint la totalité de la feuille (limbe+pétiole).

2.4.4 Caractérisation de *has3*

De la même façon que *has3 aba3-1* a une rosette un peu moins large que celle d'*aba3-1* lorsqu'il est cultivé en serre, *has3* est dans ces conditions de culture un peu plus petit que le sauvage.

2.4.4.1 Résistance à la déshydratation

has3 aba3-1 présente des feuilles détachées chaudes en thermographie infrarouge mais ne perd pas moins d'eau qu'*aba3-1* en déshydratation rapide. La température foliaire de plantules *has3* en conditions de déshydratation est nettement plus élevée que celle du sauvage, et celle de rosettes coupées est un peu supérieure à celle du sauvage pendant les premières minutes d'observation (figure 2.27), mais comme *has3 aba3-1*, sa transpiration n'est pas diminuée en déshydratation rapide (résultats non présentés).

2.4.4.2 Sensibilité à l'ABA

Alors que la germination de *has3 aba3-1* est très nettement plus sensible à l'ABA qu'*aba3-1*, le phénotype de *has3* est plus subtil. En effet, il n'est que légèrement plus sensible à l'ABA que le sauvage, significativement pour $0,4 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (figure 2.28).

2.4.4.3 Tolérance à un pathogène

La sensibilité aux pathogènes n'avait pas pu être testée sur *has3 aba3-1*, mais il a été possible de l'évaluer pour *has3*. *has3* est le mutant le plus sensible à *Erwinia Chrysanthemi* des 3 testés (figure 2.26). Dès le deuxième jour de l'infection, plus des deux tiers des plantes présentent une macération de la moitié du limbe et l'infection s'aggrave jusqu'au quatrième jour où pour certaines plantes la macération atteint la totalité de la feuille, ce qui n'arrive chez aucun des autres génotypes testés.

2.4.4.4 Bilan

La mutation *has3* a donc un effet similaire sur la taille en serre et la température foliaire, en contexte sauvage ou en présence de la mutation *aba3-1*. Toutefois, la sensibilité à l'ABA à la germination semble atténuée en l'absence de la mutation *aba3-1* ce qui pourrait être expliqué par une augmentation de sensibilité à l'ABA en contexte de déficience en ABA (voir paragraphe 2.4.2.2). Comme *has3 aba3-1* se distingue par une forte sensibilité de sa germination au paclobutrazol et au stress salin, il faudra tester la germination de *has3* en réponse à ces inhibiteurs.

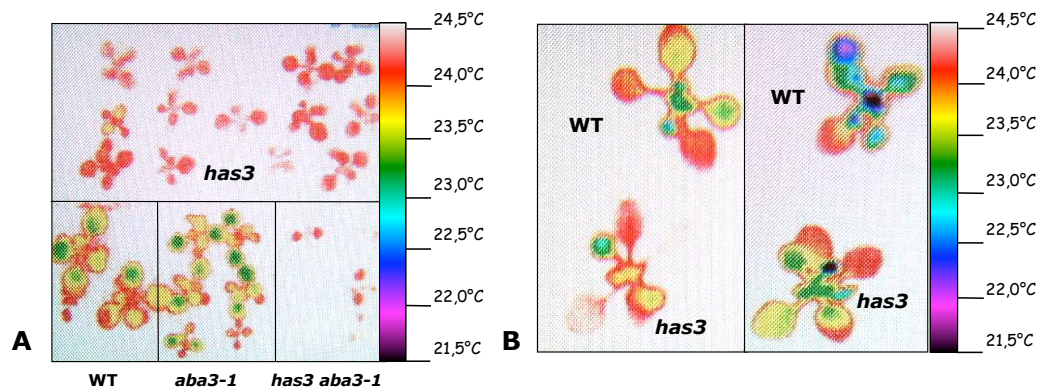


FIG. 2.27 – Image infrarouge (fausses couleurs) de *has3*. A : plantules de 12 jours après une déshydratation de 5 jours ; B : rosettes coupées de plantes bien arrosées.

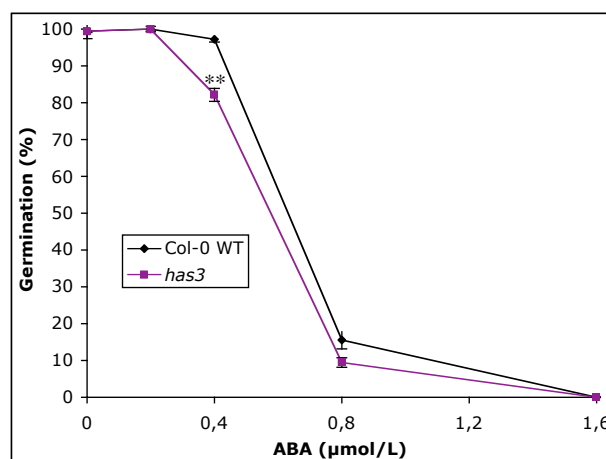


FIG. 2.28 – Test de sensibilité à l'ABA à la germination de *has3*. Les barres d'erreurs représentent l'erreur standard pour 3 répétitions. Test T de Student réalisé par rapport au sauvage ; ** : $p < 0,01$.

2.4.5 Caractérisation de *has4*

has4 aba3-1 a une taille de rosette un peu plus réduite qu'*aba3-1*. La rosette de *has4* est un peu plus petite que celle du sauvage, et ses feuilles ont une forme légèrement différente, plus allongées (figure 2.29).

2.4.5.1 Réponse à la déshydratation

has4 aba3-1 est le seul supprimeur à montrer à la fois une rosette détachée chaude en thermographie infrarouge et une transpiration réduite après 30 min de déshydratation rapide. La température foliaire de *has4* est significativement plus élevée que celle du sauvage, aussi bien pour des plantules en conditions de déshydratation que pour des feuilles ou rosettes entières détachées (figure 2.30). Contrairement à *has2*, sa vitesse de perte en eau en régime stationnaire n'est pas diminuée mais un peu plus élevée (résultats non présentés). Néanmoins, des mesures plus rapprochées réalisées au début de la déshydratation montrent que la perte initiale en eau est réduite significativement pendant les 30 premières minutes, même si elle est compensée ensuite par un taux de transpiration un peu plus important que le sauvage (figure 2.31). Ces résultats suggèrent que *has4* est capable de fermer plus rapidement ses stomates en réponse à une déshydratation ou bien qu'ils sont plus fermés dès le départ.

2.4.5.2 Sensibilité à l'ABA

has4 aba3-1 est plus sensible à l'ABA à la germination. *has4* présente une sensibilité à l'ABA à la germination moins marquée que celle de *has4 aba3-1*, mais tout de même nettement supérieure à celle du sauvage (figure 2.32).

2.4.5.3 Résistance à un pathogène

has4 aba3-1 résiste moins bien à l'infection par *Erwinia chrysanthemi*. La sensibilité exacerbée à la bactérie constatée chez *has4 aba3-1* est retrouvée chez *has4* (figure 2.26). Plus de plantes *has4* présentent une macération de la moitié du limbe que les plantes sauvages à partir du deuxième jour après l'infection. De plus, l'évolution de l'infection continue pour les plantes mutantes après le troisième jour alors qu'elle semble quasiment stoppée chez le sauvage.

2.4.5.4 Bilan

has4 aba3-1 et *has4* montrent des phénotypes de réponse à la déshydratation, aux pathogènes et à l'ABA similaires, même si ceux de *has4* sont un peu atténués. Comme pour les autres supprimeurs, il reste à confirmer que la mutation *has4* confère également une meilleure résistance à une déshydratation progressive. Il faudra de plus examiner si les phénotypes racinaires de perte de sensibilité à l'ABA et hypersensibilité au stress salin sont eux aussi conservés chez *has4*.

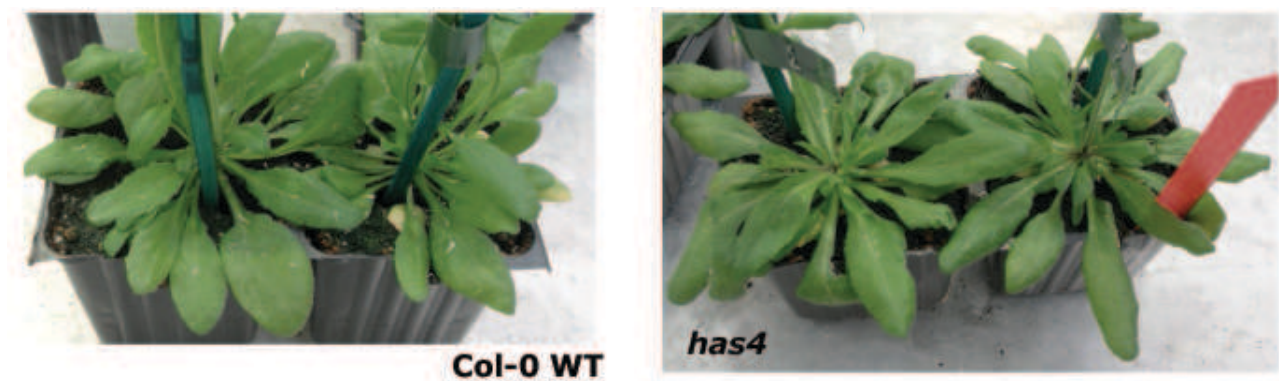


FIG. 2.29 – Plantes sauvages et *has4* après une culture de 8 semaines en serre.

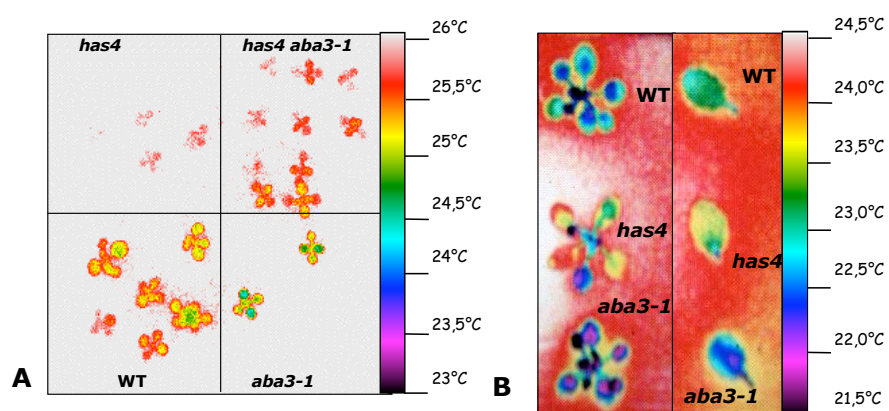


FIG. 2.30 – Image infrarouge (fausses couleurs) de *has4*. A : plantules de 14 jours après une déshydratation de 7 jours ; B : feuilles et rosettes coupées de plantes bien arrosées.

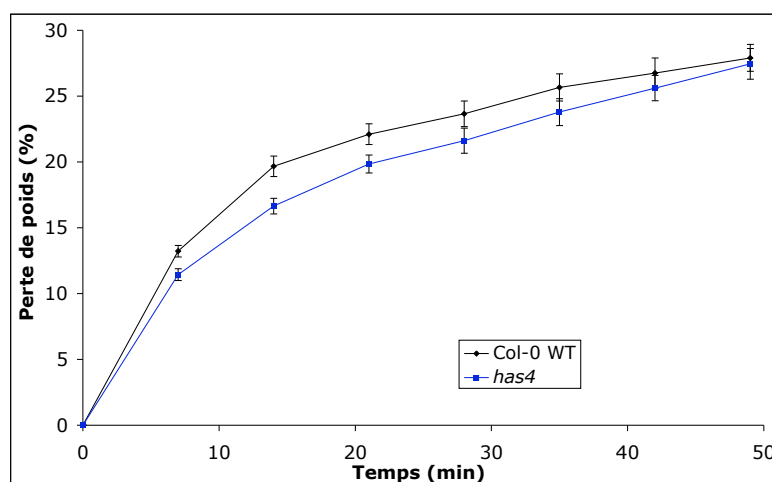


FIG. 2.31 – Cinétique de déshydratation rapide de *has4* pendant 50 min. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard pour 4 répétitions.

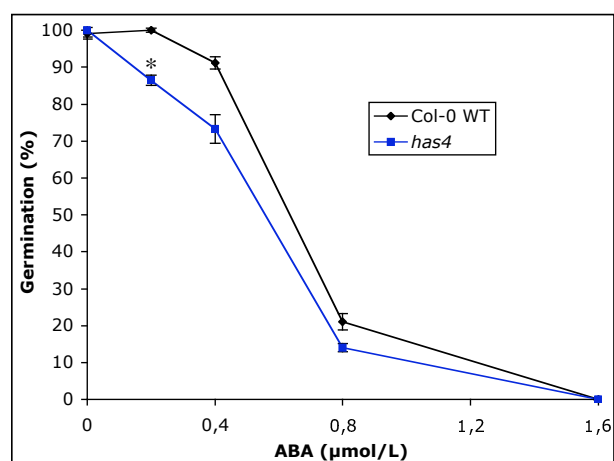


FIG. 2.32 – Test de sensibilité à l'ABA à la germination de *has4*. Les barres d'erreurs représentent l'erreur standard pour 3 répétitions. Test T de Student réalisé par rapport au sauvage ; * : $p < 0,05$.

2.5 Analyse transcriptomique

Pour identifier d'éventuels gènes candidats dont l'expression serait modifiée dans les mutants supprimeurs, nous avons réalisé une analyse comparée du transcriptome des 4 supprimeurs, du mutant *aba3-1* et du sauvage. De plus, les résultats obtenus pouvaient nous informer sur les conséquences de la mutation sur l'expression d'autres gènes.

L'analyse transcriptomique des 4 supprimeurs (BC0) et des 2 témoins a été réalisée sur les rosettes de 6 plantes non stressées, avec 2 répétitions biologiques. Pour chacun des supprimeurs, excepté *has2 aba3-1* pour lequel la comparaison au sauvage est plus pertinente, sont listés les gènes significativement différentiellement exprimés chez le suppresseur par rapport à *aba3-1*, mais qui ne sont pas significativement affectés chez les autres supprimeurs (sauf *has2 aba3-1* qui peut difficilement être comparé aux autres) car les gènes dérégulés en commun chez plusieurs supprimeurs feront l'objet d'une analyse spécifique. Afin d'analyser ces profils d'expression à la lumière des différences entre le sauvage et *aba3-1*, le rapport en log2 de la différence d'expression entre le sauvage et *aba3-1* correspondant à chacun des gènes de la liste est également donné. Les gènes sont classés : d'abord les gènes surexprimés chez le suppresseur par rapport à *aba3-1*, du plus surexprimé au moins surexprimé, puis les gènes sous-exprimés chez le suppresseur, du plus sous-exprimé au moins sous-exprimé.

La comparaison entre *aba3-1* et le sauvage montre 116 gènes significativement différentiellement exprimés chez le mutant (voir annexe 3), majoritairement surexprimés, puisque seuls 10 sont sous-exprimés.

Des annotations plus précises des gènes décrits dans les tableaux sont rassemblées dans l'annexe 2.

2.5.1 Transcriptome de *has1 aba3-1*

La plupart des gènes différentiellement exprimés chez *has1 aba3-1* sont sous-exprimés (tableau 2.1). De plus, que les gènes soient sous-exprimés ou surexprimés, on remarque pour tous exceptés les gènes chloroplastiques, la sulfurase et l'hélicase, qu'ils étaient différentiellement exprimés, dans le sens inverse, chez *aba3-1* par rapport au sauvage, ce qui montre que l'expression de ces gènes se rapproche de celle du sauvage. L'hélicase est l'exception la plus remarquable car c'est le gène le plus fortement sous-exprimé : en effet, chez *has1 aba3-1* son niveau d'expression est le plus faible mesurable. Cette situation pourrait résulter d'une mutation touchant ce gène et empêchant son expression, c'est pourquoi ce gène a été considéré dans la suite du travail comme un candidat potentiel pour porter la mutation de suppression.

Parmi les gènes différentiellement exprimés, il y a une proportion importante de gènes chloroplastiques, impliqués dans la synthèse de l'ATP, la photosynthèse et la synthèse des acides gras. Plusieurs gènes sont impliqués dans la réponse aux pathogènes. On note également deux gènes en rapport avec le Ca^{2+} . Un gène a une fonction en liaison avec la signalisation de l'ABA : FLC, dont la protéine agit sur les quantité d'ARNm de FCA, un des récepteurs d'ABA putatifs nouvellement identifiés.

Gène	<i>aba3-1/has1 aba3-1</i>	<i>p</i> -value	WT/ <i>aba3-1</i>	Annotation
At2g03760	-1,76	6,65E-4	-0,29	Similaire à une flavonole sulfotransférase
At5g36910	-1,69	2,29E-3	0,98	Thionine
At5g61140	3,04	0,00E+0	0,15	Hélicase putative à DEAD-box
ATCG00350	2,51	0,00E+0	-0,07	psaA, protéine du photosystème I
At5g10140	2,40	0,00E+0	-2,51	FLC
At3g51860	1,92	3,80E-5	-1,59	CAX3, échangeur de cation vacuolaire (homéostasie Ca ²⁺)
At1g33960	1,90	5,50E-5	-3,16	Induit par des gènes d'avirulence
At4g00700	1,88	7,60E-5	-2,81	Liaison au calcium/ aux lipides
At3g13610	1,85	1,53E-4	-2,44	Oxidoréductase
ATCG00140	1,83	1,89E-4	-0,17	atpH, sous-unité de l'ATPase III
At3g26830	1,70	1,91E-3	-3,8	Cytochrome P450 (biosynthèse de la camalexine)
ATCG00500	1,69	2,37E-3	-0,09	accD, sous-unité de l'acétyl-CoA carboxylase plastidiale
At2g30770	1,68	2,82E-3	-2,56	Cytochrome P450 71A putatif
ATCG00130	1,64	6,18E-3	-0,08	atpF, sous-unité d'ATPase
At4g39030	1,61	1,00E-2	-2,76	Transporteur d'extrusion de toxines
At1g30900	1,54	2,73E-2	-2,23	Récepteur vacuolaire de tri putatif
At1g19250	1,52	3,76E-2	-1,68	Monooxygénase
At3g11340	1,52	3,75E-2	-1,63	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transférase
At3g57260	1,52	3,91E-2	-3,27	β -1, 3, glucanase
At1g75040	1,51	4,30E-2	-3,22	Similaire à une thaumatine

TAB. 2.1 – Gènes significativement différentiellement exprimés chez *has1 aba3-1*. *aba3-1/has1 aba3-1* : rapport en log2 des niveaux d'expression de *aba3-1* et *has1 aba3-1*. WT/ *aba3-1* : rapport en log2 des niveaux d'expression du sauvage et d'*aba3-1*.

2.5.2 Transcriptome de *has2 aba3-1*

Le mutant *has2 aba3-1* est le supprimeur dont le transcriptome est le plus fortement affecté : 195 gènes sont significativement différentiellement exprimés par rapport à *aba3-1* (les gènes également dérégulés chez les autres supprimeurs sont aussi pris en compte car ses importants changements de régulation ne permettent pas de le comparer aux autres). La grande majorité de ces gènes est aussi différentiellement exprimée entre le sauvage et *aba3-1* (même si pour la moitié, cette différence n'est pas statistiquement significative). Une représentation graphique du niveau d'expression des gènes significativement dérégulés chez *has2 aba3-1* par rapport à *aba3-1* dans laquelle le niveau d'expression d'*aba3-1* est rapporté à 0 % et le niveau d'expression du sauvage est rapporté à 100 % (figure 2.33) montre que chez le supprimeur ces gènes ont toujours un niveau d'expression plus proche de celui du sauvage que d'*aba3-1*. La majorité d'entre eux a d'ailleurs un niveau d'expression très proche de celui du sauvage.

Cet effet est d'autant plus visible si on considère cette fois les 116 gènes dont l'expression est significativement dérégulée chez *aba3-1* par rapport au sauvage (dont 105 appartiennent déjà au groupe précédent) : seuls 3 ont aussi un niveau d'expression significativement différent de celui du sauvage chez *has2 aba3-1*. La même représentation graphique pour ce groupe de gènes montre de façon encore plus marquée un niveau d'expression similaire chez le supprimeur et le sauvage (figure 2.34) : la grande majorité des gènes qui étaient différentiellement exprimés chez *aba3-1* retrouve un niveau d'expression très proche de celui du sauvage chez *has2 aba3-1*. La régulation des gènes de *has2 aba3-1* se rapproche donc fortement de celle du sauvage.

De plus, on ne compte que 7 gènes différentiellement exprimés chez *has2 aba3-1* par rapport au sauvage. Ils sont répertoriés dans le tableau 2.2.

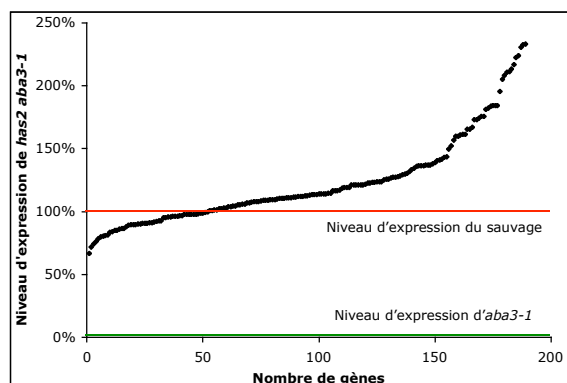


FIG. 2.33 – Comparaison des niveaux d’expression chez *has2 aba3-1* avec ceux chez *aba3-1* rapportés à 0 % et ceux chez le sauvage rapportés à 100 % pour le groupe de gènes significativement dérégulés chez *has2 aba3-1* par rapport à *aba3-1*

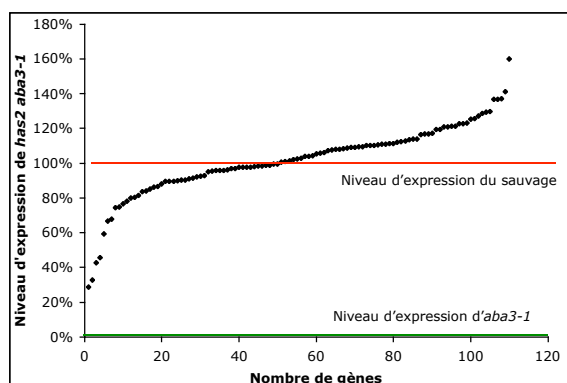


FIG. 2.34 – Comparaison des niveaux d’expression chez *has2 aba3-1* avec ceux chez *aba3-1* rapportés à 0 % et ceux chez le sauvage rapportés à 100 % pour le groupe de gènes significativement dérégulés chez *aba3-1* par rapport au sauvage

Gène	WT/ <i>has2 aba3-1</i>	<i>p</i> -value	WT/ <i>aba3-1</i>	Annotation
At3g30720	-4,12	0,00E+0	-2,89	Inconnu
At4g02290	-1,80	1,43E-2	-1,6	Glycosyl hydrolase membranaire
At4g28250	-1,72	4,08E-2	-0,9	β -expansine/allergène
At1g60960	2,71	0,00E+0	2,72	Famille des transporteurs de Fe(II)
At5g57560	2,43	0,00E+0	-0,12	Enzyme de modification de la paroi cellulaire
At1g58270	1,98	1,00E-3	2,29	Protéine endomembranaire � domaine MATH
At1g75750	1,86	5,89E-3	NC	Protéine GAST1

TAB. 2.2 – Gènes significativement différentiellement exprimés chez *has2 aba3-1* par rapport au sauvage. WT/*has2 aba3-1* : rapport en log2 des niveaux d’expression du sauvage et *has2 aba3-1*. WT/ *aba3-1* : rapport en log2 des niveaux d’expression du sauvage et d’*aba3-1*. NC : non calculé.

2.5.3 Transcriptome de *has3 aba3-1*

Tous les gènes significativement différentiellement exprimés chez *has3 aba3-1* sont surexprimés (tableau 2.3). De plus, le niveau d'expression chez le sauvage et *aba3-1* des 10 gènes les plus fortement surexprimés est souvent très proche du plus faible détectable, indiquant qu'ils ne sont quasiment pas exprimés dans ces conditions. Certains autres gènes sont encore plus surexprimés qu'ils ne l'étaient déjà chez *aba3-1*. Un seul gène, At2g30695, retrouve un niveau d'expression proche de celui du sauvage. Parmi ces gènes surexprimés, on note qu'un certain nombre code pour des enzymes.

2.5.4 Transcriptome de *has4 aba3-1*

Le transcriptome de *has4 aba3-1* est peu modifié comparé à ceux des autres supprimeurs (figure 2.5.4). Contrairement aux autres, on ne distingue pas de schéma particulier dans les modifications d'expression. Un des seuls éléments notables est la forte sous-expression du gène At1g16210, le seul dont l'expression est la même chez le sauvage et *aba3-1*, ce qui suggère la présence d'une mutation dans ce gène affectant son expression (même si elle n'est pas complètement éteinte). Ce gène devra donc être considéré comme gène candidat lors de la cartographie.

Gène	<i>aba3-1/has3 aba3-1</i>	<i>p</i> -value	WT/ <i>aba3-1</i>	Annotation
At1g33840	-3,48	0,00E+0	-0,13	Inconnu
At2g04460	-3,17	0,00E+0	ETF	Élément transposable
At5g24240	-2,57	0,00E+0	ETF	Phosphatidylinositol 3- et 4-kinase/ubiquitine
At1g73260	-2,56	0,00E+0	ETF	Famille des trypsines et inhibiteurs de protéases
At1g26390	-2,47	0,00E+0	-0,38	Protéine de transport des électrons
At2g45220	-2,45	0,00E+0	-0,67	Pectinestérase
At4g11650	-2,33	0,00E+0	-0,1	Protéine endomembranaire osmotine-like
At4g15610	-2,22	0,00E+0	-0,48	Protéine membranaire intégrale
At2g29350	-1,64	7,48E-3	-2,57	SAG13, déshydrogénase à courte chaîne
At1g68620	-1,63	9,20E-3	-2,15	Hydrolase
At4g10920	-1,61	1,22E-2	-0,06	Co-activateur transcriptionnel

TAB. 2.3 – Gènes significativement différentiellement exprimés chez *has3 aba3-1*. *aba3-1/has3 aba3-1* : rapport en log2 des niveaux d'expression de *aba3-1* et *has3 aba3-1*. WT/ *aba3-1* : rapport en log2 des niveaux d'expression du sauvage et d'*aba3-1*. ETF : expression très faible pour le sauvage et *aba3-1*, le calcul du rapport d'expression n'était pas pertinent.

Gène	<i>aba3-1/has4 aba3-1</i>	<i>p</i> -value	WT/ <i>aba3-1</i>	Annotation
At4g12480	-1,93	9,06E-4	-1,53	Protéine de transfert des lipides putative
At1g65500	-1,80	6,68E-3	-2,13	Protéine endomembranaire inconnue
At1g16210	3,61	0,00E+0	-0,07	Similaire à une protéine de la famille des cupines
At5g44420	2,10	5,30E-5	-2,78	Défensine
At2g26020	1,82	5,14E-3	-2,55	Défensine

TAB. 2.4 – Gènes significativement différentiellement exprimés chez *has4 aba3-1*. *aba3-1/has4 aba3-1* : rapport en log2 des niveaux d'expression de *aba3-1* et *has4 aba3-1*. WT/ *aba3-1* : rapport en log2 des niveaux d'expression du sauvage et d'*aba3-1*.

2.5.5 Comparaison des transcriptomes de *has1 aba3-1*, *has3 aba3-1* et *has4 aba3-1*

2.5.5.1 Gènes communs à *has1 aba3-1* et *has3 aba3-1*

Les gènes différentiellement exprimés à la fois chez *has1 aba3-1* et chez *has3 aba3-1* (tableau 2.5) sont tous surexprimés (comme les autres gènes différentiellement exprimés chez *has3 aba3-1*) à peu près jusqu'au même niveau d'expression pour les deux suppressesurs, tandis que leur expression était peu modifiée chez *aba3-1* par rapport au sauvage. On remarque que At2g21640 est impliqué dans la réponse au stress oxydatif, tandis que At2g41730 et At5g09570 sont induits par des stress salin et hypoxique (données <https://iii.genevestigator.ethz.ch>) ; At5g51440 est une protéine heat-shock qui pourrait également avoir un rôle dans ce type de stress.

2.5.5.2 Gènes communs à *has3 aba3-1* et *has4 aba3-1*

Les gènes significativement différentiellement exprimés communs à *has3 aba3-1* et *has4 aba3-1* (tableau 2.6) sont tous surexprimés, de façon relativement similaire pour les deux suppressesurs. On voit de nouveau que certains de ces gènes semblent avoir une fonction en relation avec la réponse à des stress abiotiques.

2.5.5.3 Gène commun à *has1 aba3-1* et *has4 aba3-1*

Un seul gène est différentiellement exprimé à la fois chez *has1 aba3-1* et *has4 aba3-1* (tableau 2.7). C'est le seul gène dont l'expression est significativement modifiée chez deux suppressesurs dans des sens inverses. Cela illustre bien le fait que si il existe des similitudes entre les modifications du transcriptome de *has3 aba3-1* avec celles de *has1 aba3-1* et *has4 aba3-1*, les transcriptomes de ces deux derniers ne semblent pas avoir été affectés de la même façon.

Gène	<i>aba3-1/has1 aba3-1</i>	<i>p</i> -value	<i>aba3-1/has3 aba3-1</i>	<i>p</i> -value	WT/ <i>aba3-1</i>	Annotation
At2g21640	-3,59	0,00E+0	-3,27	0,00E+0	-0,39	Impliqué dans le stress oxydatif
At2g41730	-3,05	0,00E+0	-2,90	0,00E+0	-0,26	Inconnu
At5g09570	-2,72	0,00E+0	-2,57	0,00E+0	-0,15	Protéine chloroplastique
At5g51440	-1,89	6,30E-5	-2,03	7,00E-6	0,01	Petite protéine heat-shock mitochondriale
At2g30695	-1,77	5,56E-4	-1,87	1,46E-4	1,94	Impliqué dans le transport et repliement des protéines

TAB. 2.5 – Gènes significativement différentiellement exprimés chez *has1 aba3-1* et *has3 aba3-1*. *aba3-1/has1* ou *3 aba3-1* : rapport en log2 des niveaux d'expression de *aba3-1* et *has1 aba3-1* ou *has3 aba3-1*. WT/ *aba3-1* : rapport en log2 des niveaux d'expression du sauvage et d'*aba3-1*.

Gène	<i>aba3-1/has3 aba3-1</i>	<i>p</i> -value	<i>aba3-1/has4 aba3-1</i>	<i>p</i> -value	WT/ <i>aba3-1</i>	Annotation
At2g44240	-2,50	0,00E+0	-2,20	8,00E-6	-0,05	Impliqué dans le stress oxydatif
At5g39520	-1,93	4,80E-5	-1,71	2,46E-2	-0,09	Induit par un stress salin ou osmotique
At4g12490	-1,80	5,47E-4	-2,30	1,00E-6	-2,75	Protéase LTP
At1g74590	-1,55	3,03E-2	-1,77	9,73E-3	-1,21	Gluthatione transférase (catabolisme des toxines)

TAB. 2.6 – Gènes significativement différentiellement exprimés chez *has3 aba3-1* et *has4 aba3-1*. *aba3-1/has3* ou *4 aba3-1* : rapport en log2 des niveaux d'expression de *aba3-1* et *has3 aba3-1* ou *has4 aba3-1*. WT/ *aba3-1* : rapport en log2 des niveaux d'expression du sauvage et d'*aba3-1*.

Gène	<i>aba3-1/has3</i>	<i>p</i> -value	<i>aba3-1/has4</i>	<i>p</i> -value	WT/ <i>aba3-1</i>	Annotation
At2g43570	1,92	3,80E-5	-1,74	1,48E-2	-4,12	Chitinase putative

TAB. 2.7 – Gène significativement différentiellement exprimé chez *has1 aba3-1* et *has4 aba3-1*. *aba3-1/has1* ou *4* : rapport en log2 des niveaux d'expression de *aba3-1* et *has1* ou *has4*. WT/ *aba3-1* : rapport en log2 des niveaux d'expression du sauvage et d'*aba3-1*.

2.5.6 Bilan

Le premier objectif de cette étude transcriptomique était d'identifier des gènes candidats dont l'expression aurait pu être affectée par une mutation. Des gènes dont le profil d'expression correspond à ce qu'on attend dans ce cas (expression très faible chez le supprimeur, significativement plus élevée chez les témoins et non affectée chez les autres supprimeurs) ont pu être trouvés chez *has1 aba3-1* (gène At5g61140) et chez *has4 aba3-1* (gène At1g16210). La possibilité que ces gènes portent la mutation provoquant le phénotype de température foliaire sera envisagée lors de la cartographie (voir section 2.7).

De plus, des schémas spécifiques de dérégulation ont pu être identifiés pour trois supprimeurs. Celui pour lequel cette dérégulation est la plus significative est *has2 aba3-1* dont le transcriptome montre un rapprochement prononcé vers celui du sauvage, suggérant un effet de sa mutation en amont de la régulation transcriptionnelle par l'ABA. Le mutant *has1 aba3-1* se distingue par la répression de plusieurs gènes chloroplastiques et un niveau d'expression proche du sauvage pour une quinzaine de gènes. Chez *has3 aba3-1* le profil de dérégulation est assez homogène puisque tous les gènes différentiellement exprimés, majoritairement faiblement exprimés chez les témoins, sont surexprimés, ce qui suggère qu'un élément de régulation commun soit affecté, même si ces gènes ne semblent pas être impliqués dans des processus similaires.

Des points communs ont été trouvés entre les transcriptomes de *has1 aba3-1* et *has3 aba3-1* (gènes en rapport avec la réponse au stress oxydatif surexprimés) et entre *has3 aba3-1* et *has4 aba3-1* (gènes de réponse à des stress abiotiques surexprimés) dont les fonctions sont cohérentes avec le point communs entre ces mutants, qui est de mieux résister à la déshydratation.

2.6 Analyse génétique des mutations de suppression

Pour pouvoir cartographier les mutations de suppression, il était nécessaire de déterminer si elles sont dominantes ou récessives. Pour cela, les supprimeurs ont été croisés avec une plante *aba3-1* et les descendances F₁ et F₂ de ces croisements ont été observées en thermographie infrarouge. Les plantes F₁ issues des croisements des quatre supprimeurs ont été observées et se sont avérées uniformément froides. Le dénombrement des plantes froides et chaudes dans la descendance F₂ est résumé dans le tableau 2.8. Ces résultats indiquent que les quatre mutations de suppression étudiées sont récessives.

Supprimeur	Froides / chaudes	Test de chi ²
<i>has1 aba3-1</i>	150 / 51	0,015 p > 0,5
<i>has2 aba3-1</i>	150 / 54	2,504 p > 0,1
<i>has3 aba3-1</i>	61 / 29	0,235 p > 0,5
<i>has4 aba3-1</i>	82 / 33	0,838 p > 0,1

TAB. 2.8 – Analyse de la ségrégation des loci *has*

2.7 Cartographie génétique des mutations de suppression

Les différentes caractérisations des supresseurs ont montré qu'ils avaient tous des phénotypes distincts et intéressants. Une cartographie préliminaire a donc été menée pour chacun d'entre eux, éventuellement en liaison avec les gènes candidats identifiés grâce à l'analyse transcriptomique. Le locus *has4* a été privilégié car le supresseur *has4 aba3-1* semblait le plus affecté au niveau de la réponse stomatique (feuilles détachées chaudes et résistance à la déshydratation rapide) et de la signalisation de l'ABA (induction des gènes de réponse au stress hydrique, sensibilité modifiée à l'ABA dans la graine, les racines et les parties aériennes).

2.7.1 Principe de la cartographie

La méthode de cartographie choisie repose sur l'utilisation d'une population de plantes recombinantes entre deux accessions dont l'ADN est différentiable par des marqueurs moléculaires, pouvant porter ou non la mutation de suppression. La localisation de la mutation se fait en deux temps. D'abord la sélection d'une population de cartographie pour le phénotype de suppression (plantes mutantes chaudes) permet de situer approximativement la mutation grâce à la liaison de marqueurs caractéristiques de l'accension dans lequel la mutation a été isolée avec le phénotype chaud. Puis la cartographie fine, en sélectionnant sur leur génotype des plantes qui recombinent dans la zone définie précédemment, permet de réduire l'intervalle de cartographie grâce à la détermination de leur phénotype.

2.7.1.1 Utilisation d'une population de cartographie recombinante

Le croisement entre le supresseur d'accension Col-0 et la lignée *aba3-11* d'accension *Ler* permet d'obtenir après autofécondation (génération F₂) une population de plantes mutantes *aba3* recombinantes *Ler* et Col-0. Cette population est observée par thermographie infrarouge afin de sélectionner le quart de plantes chaudes, c'est-à-dire le quart de plantes homozygotes pour la mutation de suppression (qui est récessive), ce qui formera la population de cartographie (figure 2.35). Comme l'allèle portant la mutation de suppression provient de la lignée Col-0, l'ADN à son voisinage est aussi de cette accession, jusqu'aux loci où se sont produit des recombinaisons entre les ADN Col-0 et *Ler*. Des marqueurs moléculaires sont utilisés pour distinguer l'ADN d'accension Col-0 de l'ADN *Ler*. Une population de cartographie suffisamment grande est testée avec une série de marqueurs répartis sur l'ensemble du génome (un par bras de chromosome, voir annexe 1). Si un marqueur n'est pas lié à la population, la ségrégation des deux types d'ADN sera mendélienne (un quart de Col-0, un quart de *Ler*, une moitié d'hétérozygotes, notés H), mais si le marqueur est lié à la mutation, c'est-à-dire s'il se trouve sur le même chromosome et suffisamment proche pour qu'il n'y ait pas eu de recombinaison entre le locus du marqueur et celui de la mutation chez une partie des plantes, on observera un enrichissement en ADN Col-0 (figure 2.36). Pour affiner la localisation de la mutation, d'autres marqueurs de part et d'autre de celui trouvé lié à la mutation sont testés. Plus le marqueur est proche de la mutation, moins il y a de chance de recombinaison entre les deux et donc plus la proportion en ADN Col-0 est grande. Cette méthode permet de situer la mutation entre les deux

marqueurs pour lesquels la liaison est la plus forte.

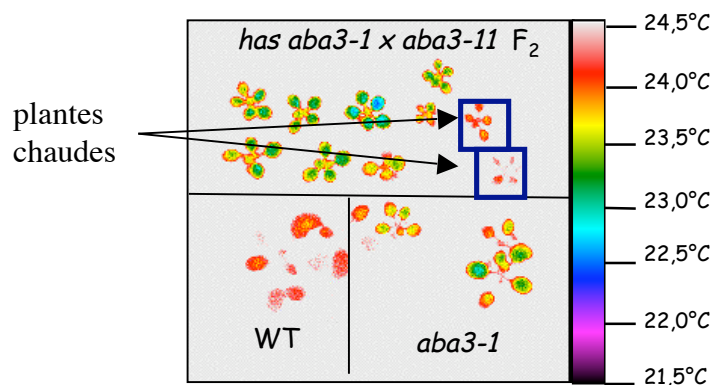


FIG. 2.35 – Image infrarouge (fausses couleurs) de la sélection de plantes chaudes pour constituer la population de cartographie

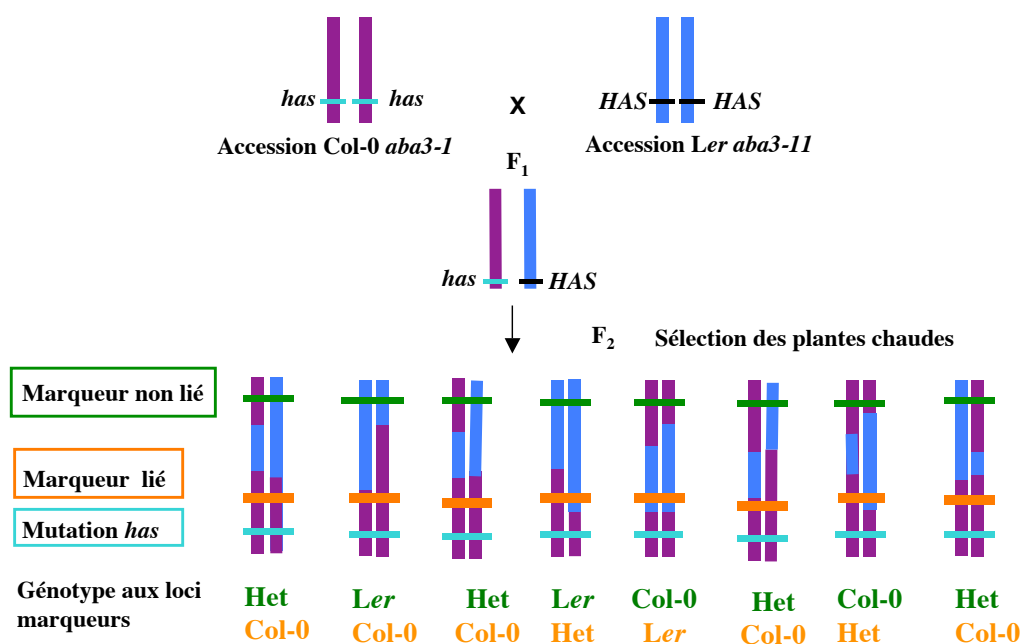


FIG. 2.36 – Constitution de la population F₂ pour la cartographie et génotypage attendu chez les mutants à un locus marqueur lié à la mutation (en orange) et non lié (en vert). Het : hétérozygote ; *HAS* : allèle sauvage du gène affecté par la mutation de suppression, *has* : allèle muté du gène affecté par la mutation de suppression.

2.7.1.2 Génotypage par des marqueurs moléculaires

Afin de disposer de marqueurs moléculaires, des séquences de microsatellites ou SSR (simple sequence repeats) constitués de répétitions en tandem de motifs mono-, di- ou trinuécléotidiques ont été recherchées dans les bases de données correspondant à l'accèsion Col-0. Il arrive souvent que le nombre de répétitions varie entre les accèsions. En définissant des amorces spécifiques de part et d'autre de ces répétitions, il est possible de déterminer s'il existe une différence suffisante dans le nombre de répétitions pour détecter un polymorphisme de taille de l'amplifon entre les deux accèsions testées (figure 2.37).

Lorsqu'il n'y a plus de microsatellites polymorphes entre les deux accèsions dans la région où des marqueurs sont nécessaires, il est également possible d'utiliser des polymorphismes sur une seule base SNP (single nucleotide polymorphism) détectables par séquençage.

2.7.1.3 Réduction de l'intervalle de cartographie

Pour pouvoir confirmer l'intervalle contenant la mutation de suppression déterminé à l'aide de la population de cartographie, puis diminuer sa taille, il faut établir de façon sûre le phénotype des recombinants dans l'intervalle. En effet, la technique de thermographie infrarouge génère une proportion non négligeable de faux-positifs lors de la sélection de la population de cartographie. Pour s'assurer du phénotype d'une plante, sa descendance en autofécondation est thermographiée et comparée au sauvage et à *aba3-1*. La descendance d'une plante homozygote pour la mutation de suppression doit présenter une température foliaire plus élevée que celle d'*aba3-1* (fig 2.38). Par contre, celle d'un recombinant hétérozygote doit être aux 3/4 froide et 1/4 chaude. Ce phénotypage est compliqué par le fait que l'allèle *aba3-11* dans l'accèsion *Ler* est un peu plus fort qu'*aba3-1* et que le mélange entre les deux accèsions *Ler* et Col-0 entraîne une variabilité de la température foliaire indépendante de la présence ou non de la mutation.

Une série de plantes portant une recombinaison dans l'intervalle de cartographie et dont le phénotype est certain, est ainsi utilisée pour réduire la région contenant la mutation. En effet, si une plante de phénotype chaud est hétérozygote pour les marqueurs microsatellites d'une partie de l'intervalle, on peut en déduire que la mutation de suppression ne peut se trouver dans la région située entre ces marqueurs, puisqu'elle doit se situer dans une portion d'ADN homozygote Col-0 (fig 2.39). Le même raisonnement s'applique à une plante froide, en sachant qu'au locus de la mutation, l'ADN ne peut pas être homozygote Col-0 (sinon elle serait chaude). Pour réduire plus avant l'intervalle de cartographie, il faut augmenter le nombre de recombinants disponibles. Pour cela, plusieurs milliers de plantes F₂ recombinantes sont génotypées, puis phénotypées si une recombinaison a eu lieu dans l'intervalle de cartographie.

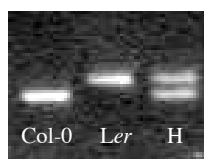


FIG. 2.37 – Photographie du résultat de la migration sur un gel d'agarose du produit d'amplification PCR d'un microsatellite pour les accessions Col-0 et Ler et un hétérozygote au locus du marqueur.

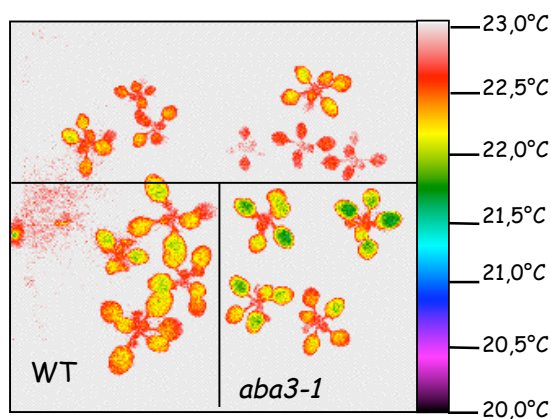


FIG. 2.38 – Phénotypage infrarouge (image en fausses couleurs) de la descendance d'un recombinant chaud.



FIG. 2.39 – Principe de la cartographie fine. En bleu ADN hétérozygote, en violet ADN Col-0. L'intervalle contenant la mutation est compris entre les marqueurs 1 et 2. La plante recombinante chaude est hétérozygote pour le marqueur 3. La mutation n'est donc pas entre les marqueurs 1 et 3, l'intervalle est réduit entre les marqueurs 3 et 2. De la même façon, la plante froide est homozygote Col-0 entre les marqueurs 1 et 3, ce qui confirme que la mutation n'est pas située dans cette région.

2.7.2 Cartographie du locus *has1*

Comme un gène candidat, At5g61140 situé à 24,6 Mb sur le bras sud du chromosome V, a été identifié par l'analyse transcriptomique (voir 2.5.1), des marqueurs dans la région de ce gène ont été testés en premier. Parmi la population de cartographie, la moitié des 140 plantes mutantes dont le phénotype paraissait le plus fiable ont été testées et ces marqueurs se sont révélés fortement liés à la mutation. Il apparaît donc clairement que la mutation se situe entre 20 et 28 Mb sur le chromosome V (tableau 2.9).

Marqueur	Localisation	Col-0	H	Ler	% d'allèles Col-0
msat 5.13	21,9 Mb	51	12	5	84 %
msat 5.19	25,9 Mb	51	14	4	84 %
msat 5.K8A10	27,5 Mb	58	14	4	86 %
msat 5.K9I9	28 Mb	49	20	3	81 %

TAB. 2.9 – Répartition des types d'ADN aux marqueurs du chromosome V testés sur 70 plantes sélectionnées pour leur phénotype chaud pour la recherche de liaison avec locus *has1*. H : hétérozygote.

2.7.3 Cartographie du locus *has2*

2.7.3.1 Phase initiale de cartographie

La population de cartographie était composée de 147 plantes sélectionnées pour leur phénotype chaud. La recherche de liaison sur l'ensemble du génome a été faite sur les 72 plantes dont le phénotype chaud était le plus sûr (tableau 2.10).

Une légère liaison a été observée avec le marqueur NGA 63 du bras nord du chromosome I. Cette liaison existe aussi chez les autres supresseurs : elle est due à la présence du gène *ABA3* (à 5,66 Mb sur le chromosome I). L'allèle mutant *aba3-1* de Col-0 est plus faible que l'allèle *aba3-11* de Ler, les plantes portant de l'ADN Col-0 au locus d'*ABA3* sont donc un peu plus chaudes que celles qui portent de l'ADN Ler, ce qui explique que des plantes avec de l'ADN Col-0 dans cette région du génome aient été sélectionnées préférentiellement.

La liaison située sur le bras nord du chromosome III a été étudiée plus précisément à l'aide de plusieurs marqueurs dans cette région (tableau 2.11) : elle semble se situer au nord de msat 3.118.

2.7.3.2 Phase de cartographie fine

Afin de simplifier le raisonnement, on appelle « recombinante au nord/sud d'un marqueur » une plante dont le phénotype indique que la mutation se situe au nord/sud de ce marqueur. Le génotypage à haut débit de 800 plantes a permis de sélectionner des plantes recombinant entre NGA 172 et msat 3.118. Parmi celles-ci, 12 recombinent au sud du marqueur msat 3.107 (2,1 Mb) et 4 au nord de msat 3.116 (3,7 Mb), ce qui montre que la mutation se situe entre ces deux marqueurs.

L'utilisation de marqueurs entre msat 3.107 et msat 3.116 et la sélection parmi 800 plantes de nouveaux recombinants dans cet intervalle a permis de réduire encore la région de cartographie

(figure 2.40). Les 5 recombinants au nord de F24K9-4 apportent une première limite à l'intervalle de cartographie. On trouve un seul recombinant au sud de T7M13. Comme il est risqué de raisonner à partir d'un seul recombinant dont le phénotype pourrait être inexact, il est plus sûr de s'appuyer sur les deux recombinants au sud de F14P13 pour définir la deuxième limite de la région de cartographie. L'intervalle de cartographie a ainsi été réduit entre 3,21 et 3,65 Mb. Il contient 145 gènes, parmi lesquels deux sont significativement sous-exprimés par rapport à *aba3-1* : At3g11010 (protéine de résistance aux maladies, famille LRR) et At3g11340 (UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transférase), mais pas par rapport au sauvage.

Marqueur	Localisation	Col-0	H	Ler	% d'allèles Col-0
NGA 63	I N 3,2 Mb	26	31	13	59 %
msat 3.MIL23	III N 8,0 Mb	33	23	7	71 %
msat 4.39	IV N 8,9 Mb	9	47	16	45 %
msat 5.K9I9	V S 28 Mb	19	38	16	52 %

TAB. 2.10 – Répartition des types d'ADN sur 72 plantes sélectionnées pour leur phénotype chaud aux marqueurs de l'ensemble du génome utilisés pour la recherche de liaison avec le locus *has2* ; localisation : numéro du chromosome, bras nord (N) ou bras sud (S) et position sur le chromosome (AGI).

Marqueur	Localisation	Col-0	H	Ler	% d'allèles Col-0
msat 3.116	3,73 Mb	44	23	8	74 %
msat 3.118	6,1 Mb	44	21	10	73 %
msat 3.MIL23	8,0 Mb	33	23	7	71 %
msat 3.MJL14	9,9 Mb	33	28	8	70 %

TAB. 2.11 – Répartition des types d'ADN sur les 72 plantes sélectionnées pour leur phénotype chaud aux marqueurs du chromosome III testés pour la recherche de liaison avec le locus *has2*. H : hétérozygote.

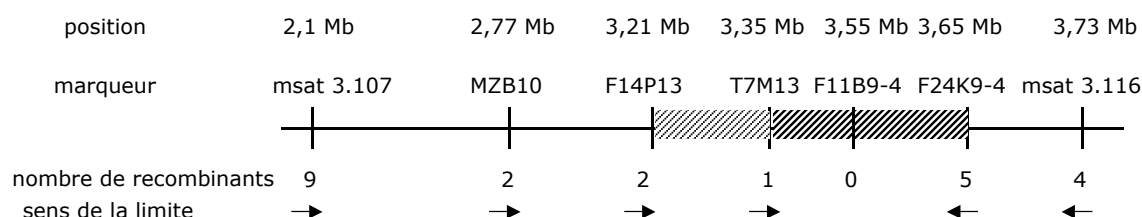


FIG. 2.40 – Réduction de l'intervalle entre F14P13 et F24K9-4 grâce au génotypage de 1600 plantes. Zone hachurée : nouvel intervalle de cartographie du locus *has2* ; zone hachurée foncée : intervalle de cartographie moins sûr.

2.7.4 Cartographie du locus *has3*

2.7.4.1 Phase initiale de cartographie

La population de cartographie comptait 157 plantes sélectionnées pour leur phénotype chaud. Pour la recherche de liaison sur le génome, seules les 94 plantes au phénotype le plus fiable ont été utilisées. Une forte liaison a été mise en évidence avec le marqueur NGA 8 sur le bras sud du chromosome IV (tableau 2.12).

Le test d'autres marqueurs situés sur le bras sud du chromosome IV a permis de déterminer que la mutation se situait entre NGA 8 et F17L22-2 (tableau 2.13).

2.7.4.2 Phase de cartographie fine

Le phénotypage par thermographie infrarouge des recombinants de la population de cartographie s'est révélé peu fiable à cause d'une importante variabilité de taille entre les recombinants empêchant de les comparer correctement. Comme *has3 aba3-1*, en plus d'être chaud montre également une suppression de la résistance au paclobutrazol conférée par la mutation *aba3-1* (figure 2.16), ce phénotype a été utilisé pour la cartographie (il est retrouvé après deux rétrocroisement, il est donc bien lié au phénotype chaud). Le caractère observé est la germination à une concentration de 10^{-4} mol.L⁻¹ de paclobutrazol. Le mutant *aba3-11*, comme *aba3-1*, germe aussi bien à cette concentration que sans paclobutrazol. Étant donné que le mélange d'accessions provoque une variabilité de la résistance au paclobutrazol, une population importante de témoins homozygotes pour la mutation *has3 aba3-1* (ADN Col-0 sur tout l'intervalle de cartographie) et hétérozygotes (hétérozygotes Col-0 *Ler* sur tout l'intervalle) a été nécessaire. Deux critères ont été utilisés pour discriminer les plantes homozygotes pour *has3 aba3-1* des hétérozygotes, le nombre de graines non germées (pas de radicule) noté NG et le nombre de plantules avec des cotylédons verts noté V, toujours rapportés à la germination du témoin sans paclobutrazol pour ne prendre en compte que l'effet de l'inhibiteur sur la germination. Le phénotype d'un recombinant est considéré certain si les pourcentages de NG et V se situent dans la gamme des témoins et au moins un des deux est suffisamment éloigné du seuil permettant de discriminer entre homozygotes et hétérozygotes. La germination de la descendance des recombinants est toujours comparée à celle des témoins ayant poussé et été récoltés en même temps. Ce critère est utilisé en parallèle avec la température foliaire lorsque la taille du recombinant est assez similaire à celle d'*aba3-1* et que les observations semblent fiables.

Les recombinants avec un phénotype sûr sont utilisés pour situer plus précisément la mutation : à l'aide de 3 recombinants au sud de ciw 6 et 3 au nord de msat 4.15, la région de cartographie peut être limitée entre ces deux marqueurs.

Pour réduire encore cet intervalle, de nouveaux marqueurs ont été trouvés et une série de 400 plante a été génotypée pour sélectionner les recombinants entre ciw 6 et msat 4.15. A l'aide de 8 recombinants au phénotype sûr et de 3 nouveaux marqueurs, l'intervalle a pu être réduit entre 8,26 et 9,36 Mb (figure 2.41). Les deux recombinants au sud de msat 4.103 et au nord msat 4.105 indiquent que la mutation se trouve entre ces deux marqueurs, mais une région plus certaine (mais plus large) peut être établie avec 3 recombinants à la limite nord (msat 4.101) et 2 recombinants à la limite sud (msat 4.15), soit un intervalle de 1,1 Mb. Un gène différentiellement exprimé entre

has3 aba3-1 et *aba3-1* identifié par l'analyse transcriptomique se trouve dans cet intervalle : c'est le gène At4g15610 qui code pour une protéine membranaire intégrale et qui est surexprimé. Cette surexpression pourrait être due à une perte de fonction si ce gène s'autorégule.

Marqueur	Localisation	Col-0	H	Ler	% d'allèles Col-0
NGA 63	I N 3,2 Mb	26	49	17	55 %
msat 1.F28H19	I S 20,5 Mb	22	57	15	54 %
msat 2.5	II N 0,3 Mb	23	50	20	51 %
NGA 1126	II S 11,9 Mb	30	57	7	62 %
msat 3.MIL23	III N 8,0 Mb	24	54	15	55 %
msat 3.11	III S 20,4 Mb	11	55	27	41 %
msat 4.39	IV N 8,9 Mb	28	37	26	51 %
NGA 8	IV S 4,7 Mb	47	32	10	72 %
NGA 139	V N 8,5 Mb	28	46	19	55 %
msat 5.K9I9	V S 28 Mb	23	34	31	45 %

TAB. 2.12 – Répartition des types d'ADN sur les 94 plantes sélectionnées pour leur phénotype chaud aux marqueurs de l'ensemble du génome utilisés pour la recherche de liaison avec le locus *has3* ; localisation : numéro du chromosome, bras nord (N) ou bras sud (S) et position sur le chromosome (AGI).

Marqueur	Localisation	Col-0	H	Ler	% d'allèles Col-0
NGA 8	4,7 Mb	47	32	10	72 %
ciw 6	7,89 Mb	63	22	9	79 %
msat 4.15	9,36 Mb	59	26	7	78 %
F7J7	11,3 Mb	58	28	8	77 %
F17L22-2	11,51 Mb	58	25	8	77 %
NGA 1107	17,3 Mb	34	24	10	68 %

TAB. 2.13 – Répartition des types d'ADN sur les 94 plantes sélectionnées pour leur phénotype chaud aux marqueurs du chromosome IV pour la recherche de liaison avec le locus *has3*. H : hétérozygote.

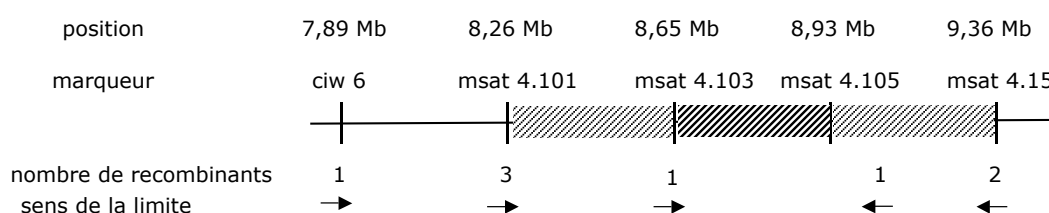


FIG. 2.41 – Réduction de l'intervalle entre msat 4.101 et msat 4.15 grâce aux 157 plantes sélectionnées chaudes et au génotypage de 400 plantes. Zone hachurée : nouvel intervalle de cartographie du locus *has3* ; zone hachurée foncée : intervalle de cartographie moins sûr.

2.7.5 Cartographie du locus *has4*

2.7.5.1 Phase initiale de cartographie

La population de cartographie pour ce supresseur était constituée de 183 plantes sélectionnées pour leur phénotype chaud.

Marqueur	Localisation	Col-0	H	Ler	% d'allèles Col-0
nga 63	I N 3,2 Mb	80	74	23	66 %
msat 1.F28H19	I S 20,5 Mb	63	92	24	61 %
msat 2.5	II N 0,3 Mb	46	86	38	52 %
nga 1126	II S 11,9 Mb	44	83	37	52 %
msat 3.MIL23	III N 8,0 Mb	42	96	39	48 %
msat 3.11	III S 20,4 Mb	52	90	36	55 %
msat 4.39	IV N 8,9 Mb	37	83	41	49 %
nga 8	IV S 4,7 Mb	70	77	27	62 %
nga 139	V N 8,5 Mb	43	92	46	49 %
msat 5.K9I9	V S 28 Mb	38	95	49	47 %

TAB. 2.14 – Répartition des types d'ADN sur les 193 plantes sélectionnées pour leur phénotype chaud aux marqueurs de l'ensemble du génome utilisés pour la recherche de liaison avec le locus *has4* ; localisation : numéro du chromosome, bras nord (N) ou bras sud (S) et position sur le chromosome (AGI).

Pour ce locus, l'analyse transcriptomique a permis d'identifier un gène candidat sur le chromosome I (At1g16210, voir paragraphe 2.5.4) qui semblait KO. Une liaison a été détectée sur le chromosome I. Elle pourrait indiquer que le gène candidat est bien muté, ou alors elle pourrait être due à la présence du gène *ABA3*. L'utilisation d'amorces spécifiques d'At4g16210 a montré que l'amplification de la deuxième moitié du gène n'était pas possible chez *has4 aba3-1* avant rétrocroisement, prouvant l'existence d'une délétion ou d'une insertion dans la séquence génomique. La fin du gène est néanmoins amplifiable dans le supresseur après trois rétrocroisements, ce qui prouve que cette mutation n'est pas responsable du phénotype chaud de *has4 aba3-1*, le biais est donc probablement causé par la proximité du gène *ABA3*. La liaison avec le bras sud du chromosome IV a donc été étudiée plus en détail. L'utilisation de marqueurs supplémentaires dans cette région a permis de confirmer la liaison et d'indiquer que la mutation se trouvait entre msat 4.15 et F20B18-2 (tableau 2.15).

Marqueur	Localisation	Col-0	H	Ler	% d'allèles Col-0
nga 8	4,7 Mb	38	37	15	63 %
msat 4.15	9,4 Mb	55	24	11	74 %
F24J7-1	10,6 Mb	61	21	10	78 %
F7J7	11,3 Mb	59	20	11	77 %
F20B18-2	11,5 Mb	57	24	9	77 %
nga 1107	17,3 Mb	42	40	8	69 %

TAB. 2.15 – Répartition des types d'ADN sur 92 plantes sélectionnées pour leur phénotype chaud aux marqueurs du chromosome IV pour la recherche de liaison avec le locus *has4*. H : hétérozygote.

Le phénotype des recombinants de la population de cartographie a été vérifié sur leur descendance pour affiner la cartographie (figure 2.42). Cinq recombinants au sud de msat 4.15 situent la mutation au-delà de 9,4 Mb. Deux recombinants au nord de F7J7 permettent de réduire l'intervalle entre msat 4.15 et F7J7. Un seul recombinant au nord de F24J7-1 pourrait permettre de diminuer encore la région de cartographie, mais ne suffit pas pour être sûr.

2.7.5.2 Phase de cartographie fine

Des recombinants entre msat 4.15 et F7J7 ont été sélectionnés grâce au génotypage de 2000 plantes (figure 2.43). Sept recombinants au sud de F13C5-5 et 2 au nord de F24J7-5 indiquent que la mutation se situe entre ces deux marqueurs, même si la limite définie par les 8 recombinants au nord de T16H5-2 est plus sûre.

Le génotypage de 2600 nouvelles plantes a permis de sélectionner de nouveaux recombinants entre F13C5-5 et T16H5-2. A l'aide de nouveaux marqueurs, dont un SNP, dans cette région, l'intervalle a encore été réduit (figure 2.44). Grâce aux 3 recombinants au sud de SNP4 et aux 4 recombinants au nord de T5K18-6, la mutation a été située avec une bonne fiabilité dans un intervalle de 117 kb entre 10,472 et 10,585 Mb. Aucun gène significativement différentiellement exprimé ne se trouve dans cet intervalle.

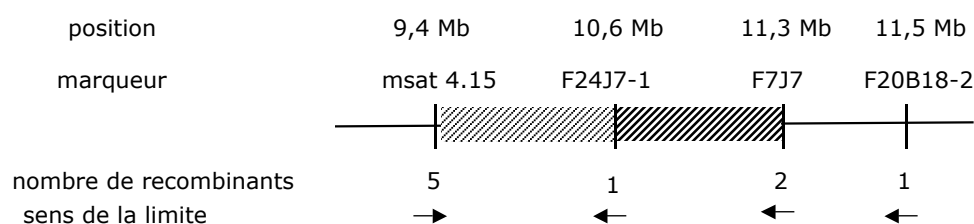


FIG. 2.42 – Réduction de l'intervalle entre msat 4.15 et F7J7 grâce aux 193 sélectionnées pour leur phénotype chaud. Zone hachurée : nouvel intervalle de cartographie pour le locus *has4* ; zone hachurée foncée : intervalle de cartographie moins sûr.

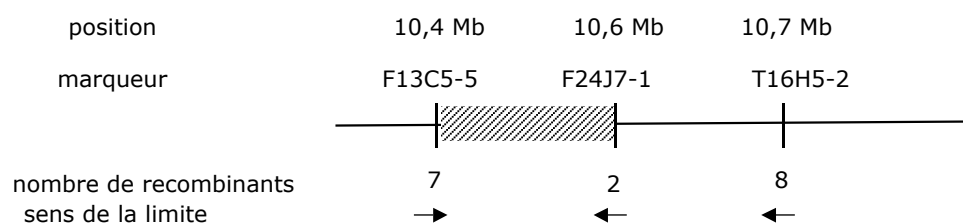


FIG. 2.43 – Réduction de l'intervalle entre F13C5-5 et F24J7-1 grâce à la population de cartographie et le génotypage de 2000 plantes. Zone hachurée : nouvel intervalle de cartographie pour le locus *has4*.

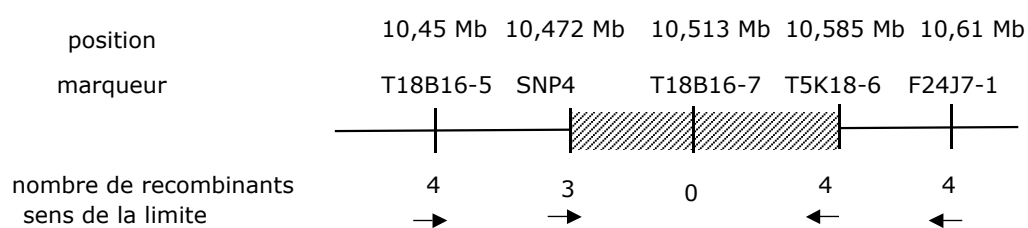


FIG. 2.44 – Réduction de l'intervalle entre SNP4 et T5K18-6 grâce à la population de cartographie et le génotypage de 4600 plantes. Zone hachurée : nouvel intervalle de cartographie pour le locus *has4*.

2.8 Analyse de gènes candidats dans l'intervalle de cartographie pour le locus *has4*

L'intervalle de cartographie de *has4 aba3-1* contient 32 gènes (en incluant ceux qui sont partiellement dedans), de At4g19150 à At4g19410 parmi lesquels aucun n'est différentiellement exprimé par rapport à *aba3-1*. Une première approche utilisée pour identifier le gène responsable du phénotype chaud de *has4 aba3-1* et *has4* a été de tester l'effet d'une mutation dans les gènes de l'intervalle sur la température foliaire à l'aide des ressources disponibles dans les banques de mutants d'insertion. Ensuite, une sélection des meilleurs gènes candidats a été réalisée. D'abord, la fonction des gènes de l'intervalle, lorsque ceux-ci sont annotés, est rapportée à ce qui est déjà connu quant aux gènes intervenant dans la réponse à la déshydratation. Puis, les données disponibles sur l'expression de ces gènes sont utilisées pour identifier ceux qui sont induits ou réprimés par un stress hydrique et qui sont exprimés dans les stomates. Ces analyses servent à la fois à éliminer certains gènes et à dresser un ordre de priorité pour le séquençage des gènes candidats.

2.8.1 Phénotypage infrarouge de mutants d'insertion dans les gènes de l'intervalle

Des mutants d'insertion des banques Salk et GABI ont été commandés pour tous les gènes dans lesquels ils étaient disponibles. Des mutants homozygotes pour l'insertion ont pu être sélectionnés pour les gènes At4g19150 (insertion dans la région 5' non traduite), At4g19160 (dans un intron au milieu du gène), At4g19180 (dans un exon au début du gène), At4g19185 (dans un intron au début du gène), At4g19190 (dans un exon au milieu du gène), At4g19200 (dans le promoteur), At4g19210 (dans le promoteur), At4g19220 (dans un exon au début du gène), At4g19240 (dans le promoteur), At4g19300 (dans un exon au début du gène), At4g19330 (dans un exon à la fin du gène), At4g19395 (dans le promoteur) et At4g19410 (dans un exon à la fin du gène). La descendance des mutants homozygotes pour l'insertion a été observée en thermographie infrarouge. Leur température foliaire était très similaire à celle du sauvage, excepté pour le mutant portant une insertion dans le promoteur de At4g19200, dont la descendance était froide (figure 2.45). Les mutants portant une insertion dans un exon au début ou au milieu du gène et n'ayant pas de phénotype en thermographie infrarouge, permettent d'éliminer les gènes correspondants, puisqu'on s'attendrait à ce qu'ils aient la même température que *has4* (comme c'est une mutation récessive, il y a peu de chance qu'elle amène un gain de fonction). C'est le cas pour At4g19180, At4g19190, At4g19220, At4g19300 et At4g19330.

À la suite de difficultés de sélection de mutants homozygotes pour l'insertion, les lignées pour les gènes At4g19230, At4g19340 et At4g19360 restent à étudier.

2.8.2 Tri de gènes candidats selon leur fonction

Les annotations des gènes de l'intervalle, provenant du site www.arabidopsis.org, sont les suivantes :

- At4g19150 : protéine endomembranaire de la famille à répétition d'anhydrures ayant une fonction de liaison aux protéines
- At4g19160 : protéine inconnue
- At4g19170 : CCD4, protéine chloroplastique de la famille des NCED
- At4g19180 : protéine de la famille des phosphatases de nucléosides
- At4g19185 : protéine membranaire similaire à une protéine liée aux nodulines
- At4g19190 : protéine de la famille des zinc-knuckle (de type CCHC), impliquée dans la liaison aux acides nucléiques
- At4g19191 : protéine mitochondriale à répétition de pentatricopeptides
- At4g19200 : protéine de la famille riche en proline
- At4g19210 : protéine de la famille des L-inhibiteurs de RNase, avec une activité de transporteur
- At4g19220 : protéine à répétition de pentatricopeptides
- At4g19230 : CYP707A1, impliquée dans le catabolisme de l'ABA pour libérer de la dormance
- At4g19240 : protéine inconnue
- At4g19250 : protéine avec des répétitions de kelch, similaire à une protéine de la famille des F-box
- At4g19260 : protéine avec des répétitions de kelch
- At4g19270 : protéine inconnue
- At4g19280 : gène à élément transposable
- At4g19290 : gène à élément transposable
- At4g19300 : gène à élément transposable
- At4g19305 : gène à élément transposable
- At4g19310 : gène à élément transposable, protéine similaire à une protéase Ulp1
- At4g19320 : gène à élément transposable, protéine similaire à une protéase Ulp1
- At4g19330 : protéine avec des répétitions de kelch de la famille des F-box
- At4g19340 : protéine avec des répétitions de kelch
- At4g19350 : gène embryon-déficient
- At4g19360 : protéine inconnue
- At4g19370 : protéine inconnue
- At4g19380 : protéine proche d'une alcool oxydase impliquée dans le transport d'électrons
- At4g19390 : protéine similaire à un constituant structurel du ribosome
- At4g19395 : microARN 168 qui cible AGO1
- At4g19400 : protéine de liaison à l'actine impliquée dans l'organisation du cytosquelette
- At4g19410 : pectinacétyl estérase putative localisée dans la paroi cellulaire

Certains gènes ont une fonction qui en fait des gènes candidats peu probables. Ainsi un candidat à probablement écarter est At4g19350 car une mutation dans ce gène provoque la mort de l'embryon. Le gène At4g19170 code pour une protéine de la même famille que les NCED, et pourrait avoir un rôle dans la biosynthèse de l'ABA, mais une telle fonction n'a pour l'instant pas été démontrée pour ce gène. De plus une mutation améliorant la tolérance à la déshydratation par une meilleure synthèse de l'ABA serait vraisemblablement dominante et *has4 aba3-1* ne paraît de toute façon pas affecté dans l'accumulation d'ABA.

Plusieurs gènes codent pour des protéines dont l'annotation indique une possible implication dans la réponse à la déshydratation. Un autre gène que At4g19170, pouvant intervenir dans l'accumulation d'ABA est At4g19230/CYP707A1, qui code pour une enzyme d'hydroxylation de l'ABA impliquée dans son catabolisme. D'après les phénotypes décrits chez le mutant *cyp707a1* (Okamoto et al., 2006), son rôle semble être plutôt localisé dans la graine. De plus, comme les teneurs en ABA de *has4 aba3-1* ne sont pas plus élevées que celles d'*aba3-1*, une mutation dans ce gène ne paraît pas expliquer les phénotypes de *has4 aba3-1*, mais la possibilité de changements subtils dans l'accumulation d'ABA non détectés par nos mesures et d'un rôle non encore découvert de ce gène dans les parties végétatives de la plante doit être envisagé. Deux gènes codent pour des protéines liées au métabolisme des ARN, qui intervient dans la signalisation de l'ABA : At4g19210 code pour une protéine de la famille des L-inhibiteurs de RNase et At4g19395 pour un microARN. At4g19190 code pour une protéine qui présente des caractéristiques de facteur de transcription. Enfin, sachant que des modifications du cytosquelette d'actine interviennent dans la fermeture stomatique, le gène At4g19400 codant pour une protéine de liaison à l'actine est également un bon gène candidat.

2.8.3 Tri de gènes candidats selon leur profil d'expression

A l'aide des données d'analyses transcriptomiques disponibles sur le site <https://iii.genevestigator.ethz.ch>, les gènes de l'intervalle de cartographie dont l'expression est modifiée par un stress hydrique ou par l'ABA ont été répertoriés.

Cinq gènes sont fortement réprimés par un ou plusieurs types de stress hydrique et sont tous réprimés par l'ABA sauf At4g19410 :

- At4g19280 est réprimé par une déshydratation.
- At4g19310 est réprimé par un stress hydrique.
- At4g19340 est réprimé par un stress hydrique.
- At4g19380 est réprimé par un stress hydrique.
- At4g19410 est réprimé par un stress salin ou osmotique.

Sept gènes sont faiblement réprimés par un ou plusieurs types de stress hydrique et parfois aussi régulés par l'ABA :

- At4g19150 est réprimé par des stress osmotique et salin.
- At4g19210 est réprimé par un stress salin.
- At4g19320 est réprimé par un stress salin et une déshydratation et induit par l'ABA.
- At4g19330 est réprimé par l'ABA et un stress hydrique.
- At4g19370 est réprimé par des stress salin ou osmotique.

- At4g19400 est légèrement réprimé par des stress salin et osmotique et par l'ABA.

Deux gènes sont faiblement induits par le stress hydrique :

- At4g19200 est induit par un stress hydrique.
- At4g19300 est induit par un stress hydrique et réprimé par l'ABA.

Comme *has4* et *has4 aba3-1* ont un phénotype stomatique important, il est probable que le gène muté responsable de ce phénotype soit exprimé dans les stomates. Grâce aux données d'une puce à ADN réalisée par Leonhardt et al. (2004) sur des cellules de garde, il a été possible de déterminer les différents niveaux d'expression de certains gènes de l'intervalle de cartographie.

Les gènes exprimés fortement sont : At4g19160, At4g19170, At4g19200, At4g19210, At4g19350, At4g19390, At4g19410.

Les gènes exprimé moyennement sont : At4g19150, At4g19185, At4g19400.

Enfin, certains gènes ne sont pas exprimés dans les stomates, c'est le cas pour At4g19190, At4g19220, At4g19230, At4g19240, At4g19260, At4g19300, At4g19320, At4g19330, At4g19370, At4g19380.

Les meilleurs gènes candidats d'après le recoupement entre les données d'expression en réponse au stress et dans les stomates sont At4g19150, At4g19200, At4g19210, At4g19400 et At4g19410.

2.8.4 Séquençage des gènes candidats

Le séquençage de certains des meilleurs gènes candidats a été mené. Aucune mutation n'a été trouvée dans la séquence des gènes candidats At4g19150, At4g19200, At4g19230, At4g19240 et At4g19395. Le gène At4g19210 a été séquencé à 99 % et aucune mutation n'a été détectée. Certains gènes qui étaient de moins bons candidats, mais pour lesquels des mutants d'insertion n'étaient pas disponibles comme At4g19170 et At419250, ou bien au contraire montraient un léger phénotype infrarouge (non confirmé) comme At4g19220, ou bien courts et facilement séquençables comme At4g19240 ont aussi été séquencés par mesure de précaution, sans qu'une mutation ne soit détectée.

Les gènes de At4g19260 et At4g19340 n'ont pas pu être séquencés car il n'a pas été possible de définir des amorces spécifiques dans ces gènes. En effet, At4g19260, At419330 et At4g19340 présentent de larges zones d'homologie quasiment parfaite. La zone comprenant les gènes At4g19270 à At4g19320 a une très forte homologie avec deux régions des chromosomes I et V : même les séquences intergéniques sont très similaires. Le fait qu'il existe des gènes très homologues fait par ailleurs de ces gènes des gènes candidats moins probables puisque cela implique une possible redondance fonctionnelle qui empêcherait une mutation dans un de ces gènes de provoquer un phénotype visible.

Pour certains bons gènes candidats pour lesquels aucune mutation n'a été trouvée dans la séquence codante, un séquençage du promoteur semblait nécessaire. En particulier le mutant d'insertion dans le promoteur d'At4g19200, qui a un phénotype froid en thermographie infrarouge, pour lequel une mutation dans le promoteur de ce gène ayant un effet inverse est envisageable. Les 1500 pb adjacentes à l'ATG des promoteurs des gènes At4g19200, ainsi que de At4g19230 et At4g19395 ont ainsi été séquencés sans qu'une mutation ne soit trouvée.

2.8.5 Bilan

Les résultats décrits ci-dessus sont résumés dans la figure 2.46. Deux bons gènes candidats restent à séquencer : At4g19400 et At4g19410. L'étude des trois gènes candidats les plus sérieux n'est pas terminée : il faudra séquencer le promoteur de At4g19210, dont à la fois la fonction et le profil d'expression en font un candidat majeur ; l'étude d'un mutant d'insertion dans At4g19230 devrait aussi permettre de valider ou d'invalidier ce gène connu pour sa fonction dans le catabolisme de l'ABA ; le séquençage plus large du promoteur de At4g19200, seul gène dans lequel une mutation provoque un important changement de température foliaire, devra être entrepris. Si aucune mutation n'est trouvée dans ces gènes ou leurs promoteurs, le séquençage des gènes non annotés et pour lesquels certaines données d'expression ne sont pas connues, ainsi que des candidats moins probables que ceux déjà considérés devra aussi être entrepris.

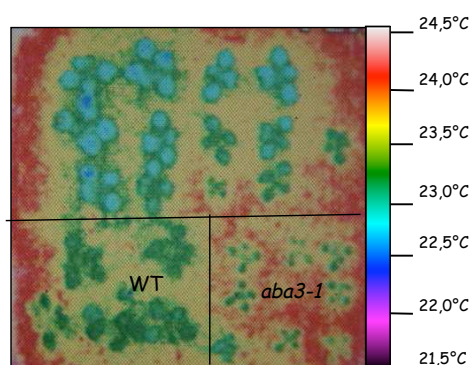


FIG. 2.45 – Image infrarouge (fausses couleurs) d'un mutant d'insertion dans le promoteur du gène At4g19200

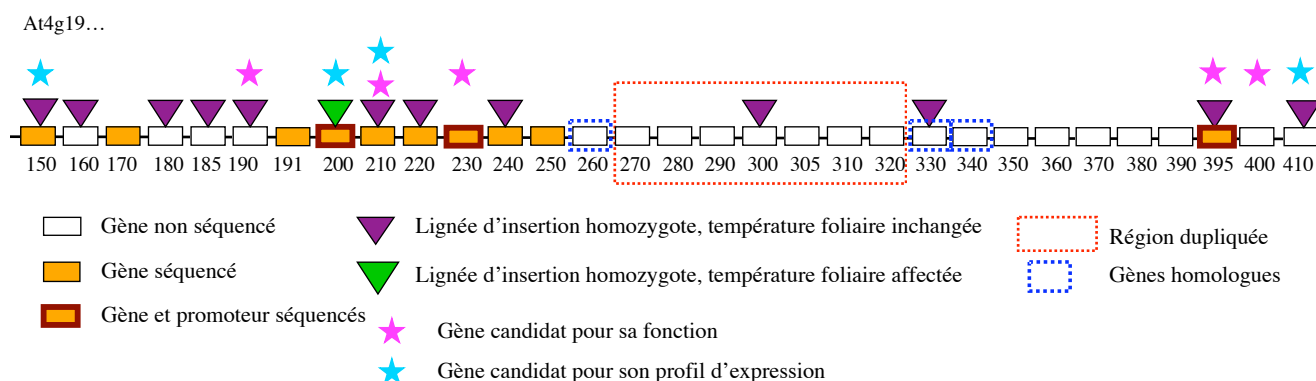


FIG. 2.46 – Étude des gènes candidats situés dans l'intervalle de cartographie défini pour le locus *has4*

2.9 Analyse du gène At5g61140 comme gène candidat pour le locus *has1*

Comme les données des puces à ADN indiquaient que l'expression du gène At5g61140 était quasiment inexistante chez *has1 aba3-1* et que les résultats de cartographie montraient une liaison dans une région du génome où se situe ce gène, il semblait être un bon gène candidat. Dans un premier temps, il a fallu confirmer que ce gène était réellement muté chez *has1 aba3-1*, puis il restait à démontrer que les phénotypes de *has1 aba3-1* étaient dus à la mutation dans ce gène. Pour cela des mutants portant une insertion dans ce gène ont été étudiés et leurs phénotypes ont été comparés à ceux de *has1*. L'insertion a également été sélectionnée en fond *aba3-1* pour pouvoir comparer ses effets aux phénotypes de *has1 aba3-1*.

2.9.1 Étude de la mutation de At5g61140 chez *has1 aba3-1*

2.9.1.1 Une altération de la séquence du gène At5g61140 chez *has1 aba3-1* empêche l'expression de son ARNm complet

Afin de confirmer les données d'expression de ce gène obtenues lors de l'analyse transcriptomique, une RT-PCR a été effectuée. Deux régions de l'ADNc ont été testées, une entre les amorces RT For 2 (à 1520 pb) et RT Rev 2 (à 2640 pb) au début du gène et une autre entre les amorces RT For1 (à 11220 pb) et RT Rev 1 (à 13010 pb) à la fin du gène (figure 2.47). Après 35 cycles d'amplification, les deux couples d'amorces donnent une bonne amplification de l'ADNc sauvage, mais il n'y a pas d'amplification chez *has1 aba3-1* pour le couple RT For 1/ RT Rev 1 de la fin du gène. Ce résultat confirme l'existence d'une altération de la séquence du gène ayant pour conséquence la production d'un ARNm tronqué.

Pour connaître la nature de cette altération, ce gène de 13515 pb a été séquencé. La majorité du gène a pu être séquencée sans qu'une mutation n'y soit trouvée, mais une région n'a pas pu être amplifiée. Ce n'était pas dû à un défaut dans les oligonucléotides puisque ceux-ci utilisés sur de l'ADN de plante sauvage donnaient l'amplification attendue. L'hypothèse d'une délétion d'une partie du gène a été envisagée, mais elle a été invalidée car si l'utilisation de la paire d'amorces For H'/RevI ne permettait pas d'amplifier par PCR, le couple ForH'/RevI' était fonctionnel et RevI se trouvait dans une zone amplifiable et de taille attendue (figure 2.48), ce qui prouve que la séquence sur le gène de ces deux amorces était toujours présente. Comme il existait une zone commune à la portion de gène que toutes les paires d'amorces ne fonctionnant pas étaient sensées amplifier, l'hypothèse d'une insertion dans le gène a paru probable. Sachant que les deux paires ForI/RevI2 et ForI1/RevI ne permettent pas d'amplifier de fragment d'ADN, l'insertion se trouve forcément dans la zone commune aux deux segments définis par ces amorces, c'est-à-dire entre ForI1 et RevI2. Cette possible insertion a donc été localisée entre 11885 pb et 12104 pb après l'ATG. Elle permet d'expliquer pourquoi l'ARNm est tronqué.

La recherche d'homologues de ce gène a montré qu'il comportait une région entre 11318 et 12184 pb qui se trouvait dupliquée à l'identique dans deux autres gènes ; l'insertion est donc située dans cette zone.

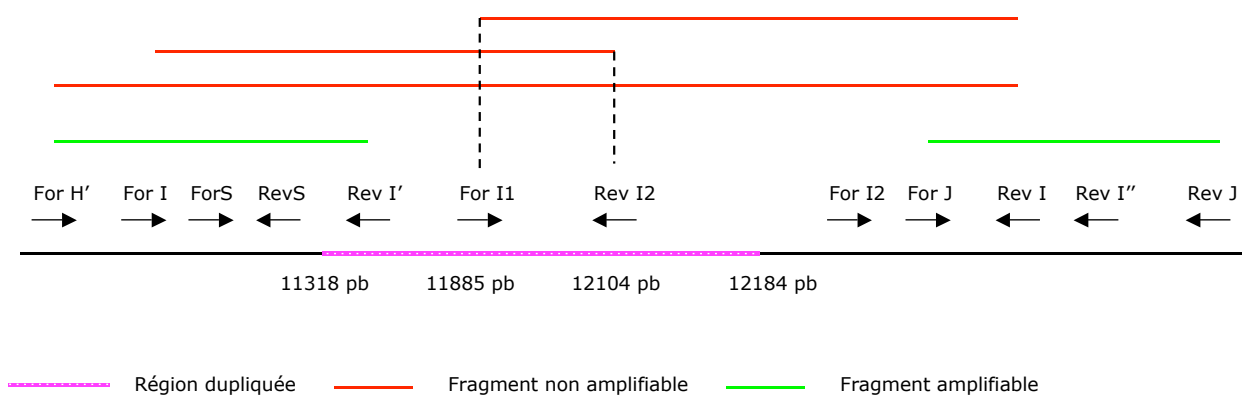


FIG. 2.48 – Répartition des amorces utilisées pour localiser la « coupure » dans At5g61140

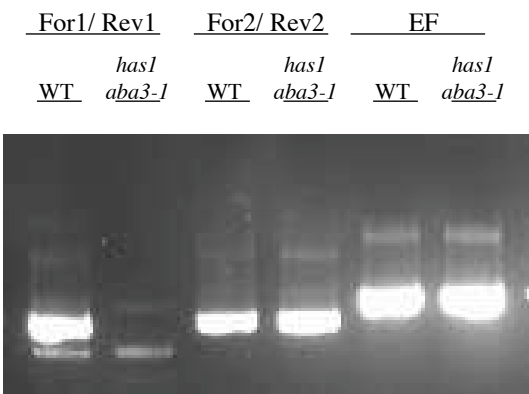


FIG. 2.47 – Résultats de RT-PCR semi-quantitative pour le gène At5g61140 sur *has1 aba3-1* après 35 cycles d’amplification

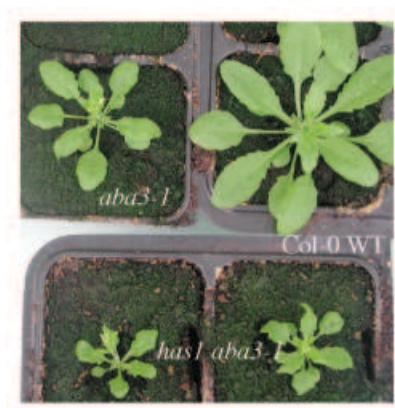


FIG. 2.49 – Morphologie de *has1 aba3-1* pendant une culture en serre

2.9.1.2 Recherche de la nature de la « coupure »

Deux hypothèses semblent pouvoir expliquer le fait que le gène At5g61140 soit « coupé » en deux chez *has1 aba3-1* : une insertion dans le gène ou bien un réarrangement chromosomique intervenant à l'intérieur du gène. Afin de tester la possibilité d'une insertion, deux amorces bordant le site de la « coupure » ont été utilisées pour faire une PCR avec un programme réglé pour amplifier jusqu'à 4 kb. Aucun fragment n'a été amplifié à l'issue de cette PCR (répétée plusieurs fois avec des couples d'amorces différents), ce qui exclut la possibilité d'une insertion plus petite que 4 kb.

Une analyse de Southern a été menée pour essayer de discriminer entre une longue insertion et un réarrangement chromosomique. Deux sondes, situées de part et d'autre de la « coupure » ont été utilisées, la sonde A de 300 pb en amont de la « coupure » entre les amorces ForS et RevS et la sonde B de 430 pb en aval de la « coupure » entre les amorces For I2 et Rev I'. Sept enzymes de restriction ont été utilisées pour digérer l'ADN génomique du sauvage et de *has1 aba3-1*. Comme le marquage a été très faible, il n'y a pas eu de bandes pour tous les puits et le repérage des bandes visibles était difficile (en particulier les bandes de très grande taille), l'analyse n'était donc pas aisée.

La taille des bandes détectées chez *has1 aba3-1* semble différente de celle du sauvage. Étant donné que les enzymes utilisées coupent peu souvent, il semble probable que la « coupure » dans *has1 aba3-1* soit due à une très grande insertion (au moins 10 kb) ou bien à un remaniement chromosomique. Cette analyse de Southern devra être reproduite pour confirmer ces résultats.

2.9.1.3 Liaison entre la mutation dans At5g61140 et les phénotypes de *has1 aba3-1*

Cultivées en serre, les plantes mutantes *has1 aba3-1* présentent un phénotype très marqué de petite taille et de feuilles gaufrées (figure 2.49). Afin de déterminer si ces phénotypes étaient liés à la mutation dans At5g61140, 264 plantes de la génération F₂ du croisement entre une plante sauvage et *has1 aba3-1* ont été criblées pour la mutation (absence d'amplification PCR avec les amorces ForI1 et RevI situées de part et d'autre de la « coupure »). Les 50 plantes portant la « coupure » à l'état homozygote présentaient tous les phénotypes de *has1 aba3-1*, qui sont absents chez les 214 autres plantes. Ceci indique une liaison très forte entre la mutation de *has1 aba3-1* dans At5g61140 et ses phénotypes morphologiques. Il est remarquable que ces phénotypes soient détectables indépendamment de la ségrégation de la mutation *aba3-1*. En particulier la mutation *has1* confère une réduction de taille à la fois chez *aba3-1* et le sauvage.

2.9.2 Étude des mutants d'insertion

Trois lignées mutantss présentant une insertion dans le gène At5g61140 à l'état homozygote ont été sélectionnés chacun à l'aide d'une paire d'amorces permettant d'amplifier autour de la région de l'insertion et d'une autre paire amplifiant la bordure de l'insertion. L'insertion de la lignée Salk 029498 se trouve dans un exon à 4125 pb de l'ATG. Celle de la lignée Salk 116847 est située dans un intron à 2970 pb de l'ATG, et celle d la lignée Salk 086062 est à 12920 pb dans un intron (figure 2.50).

2.9.2.1 Expression du gène At5g61140

Une transcription inverse suivie d'une PCR semi-quantitative a été utilisée pour déterminer si les insertions dans le gène At5g61140 affectaient son expression (figure 2.51). Les couples d'amorces utilisés, situés au début et à la fin du gène sont les mêmes que pour *has1 aba3-1* au paragraphe 2.9.1.1. De façon inattendue, le transcrit de At5g61140 semble présent chez les lignées Salk 029498 et 116847 alors que leurs insertions sont situées au début du gène (et dans un exon pour la lignée 029498), alors qu'il n'y pas d'amplification de la fin de l'ADNc et peu du début pour la lignée Salk 086062 dont l'insertion est dans un intron à la fin du gène. Pour la lignée Salk 116847, on observe lors de deux RT-PCR réalisées sur des ADNc issus d'extractions indépendantes une deuxième bande, plus faible, au dessus de celle correspondant à l'ADNc de la taille attendue, qui n'existe pas chez les autres génotypes. Même s'il n'y a pas d'explication pour la présence de cette bande, cela nous a incité à étudier la lignée de mutants d'insertion Salk 116847 en même temps que la lignée Salk 086062.

2.9.2.2 Phénotype en thermographie infrarouge

Le mutant Salk 086062 porte une insertion dans un intron à la fin du gène qui empêche l'expression d'un ARNm entier, son insertion a donc a priori le même effet que la « coupure » du gène de *has1 aba3-1*, c'est pourquoi on s'attend à ce que le mutant d'insertion ait les mêmes phénotypes que *has1 aba3-1*. Ce n'est apparemment pas le cas en ce qui concerne les phénotypes morphologiques de taille et gaufrage des feuilles, le mutant Salk ayant un aspect similaire au sauvage. Ce n'est pas non plus le cas pour la température foliaire, puisque loin d'être chaud, le Salk 086062 apparaît légèrement froid (figure 2.53).

2.9.2.3 Sensibilité de la croissance à l'ABA

Aucune différence de croissance, avec ou sans pulvérisation d'ABA, significative ou reproductible n'a été remarquée entre le sauvage et les mutants d'insertion.

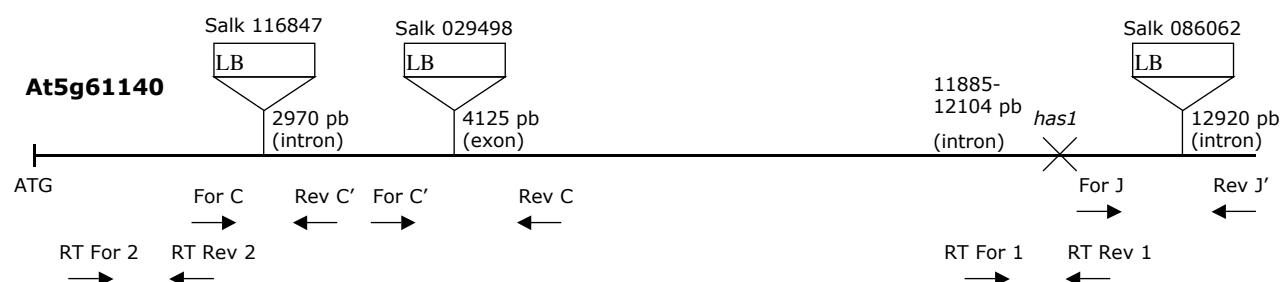


FIG. 2.50 – Localisation des insertions des 3 lignées Salk étudiées et des amorces utilisées pour sélectionner les insertions et pour la RT-PCR. LB : bordure gauche.

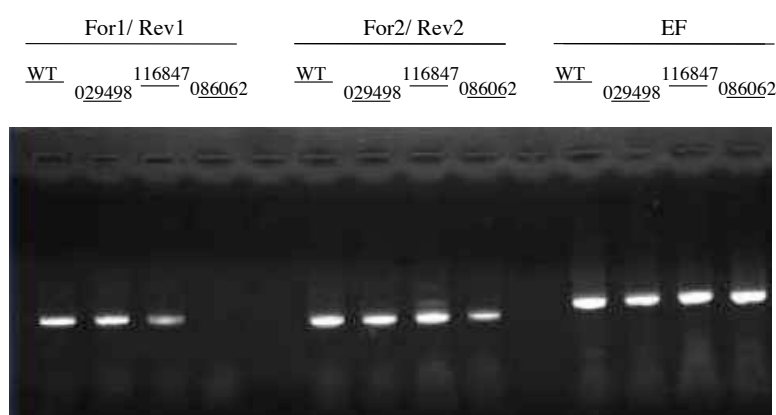


FIG. 2.51 – Expression du gène At5g61140 détectée par RT-PCR semi-quantitative sur les lignées d'insertion après 35 cycles d'amplification

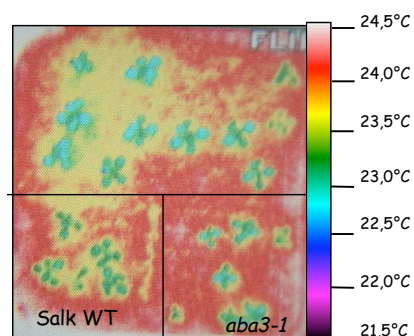


FIG. 2.52 – Image infrarouge (fausses couleurs) de la lignée mutante d'insertion Salk 086062

2.9.2.4 Effet de l'insertion en contexte de déficience en ABA

Comme la mutation du gène At5g61140 en contexte sauvage ne confère pas les phénotypes observés chez *has1 aba3-1*, nous avons introduit les mutations d'insertion dans le mutant *aba3-1*. Des croisements ont été réalisés entre les mutants d'insertion dans At5g61140 et *aba3-1* et les plantes homozygotes à la fois pour la mutation *aba3-1* et pour l'insertion ont été sélectionnées. L'insertion dans At5g61140 ne supprime pas le phénotype froid de *aba3-1* (figure 2.53).

Par contre, lors d'un test de pulvérisation d'ABA à 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ sur des plantes cultivées en serre, on observe des différences de réponse à l'ABA entre les mutants d'insertion et le témoin (figure 2.54). Le diamètre final de la rosette n'est pas significativement modifié par les pulvérisations d'ABA chez la lignée 086062 *aba3-1*, alors qu'il augmente d'environ 30 % chez *aba3-1* et la lignée 116847 *aba3-1*. La hauteur maximale atteinte par la hampe florale à la fin de la croissance de la plante est augmentée de façon moins importante (25 %) chez les plantes ayant une insertion dans le gène At5g61140 que chez le témoin (45 %). Ses résultats suggèrent que, en contexte de déficience en ABA, les lignées mutantes Salk 086062 et 116847 présentent soit une moindre sensibilité à l'ABA, soit une plus grande sensibilité qui annulerait l'effet de compensation de la déficience en ABA visible chez *aba3-1*.

Toutefois, les graines de ces plantes cultivées en serre ne montrent pas de changement significatif de sensibilité à l'ABA à la germination (résultats non présentés) comparé à *aba3-1*.

2.9.3 Bilan

Parmi tous les phénotypes de *has1 aba3-1*, seule la réponse pour la croissance de la rosette à l'ABA est retrouvée chez une des lignées d'insertion en contexte *aba3-1*. De plus, il s'agit du mutant qui comme *has1* présente une insertion en 3' du gène et ne produit pas de transcrit. Il est donc possible que ce caractère soit conféré à *has1 aba3-1* par la disruption du gène At5g61140. Par contre, tous les autres phénotypes, température foliaire, taille de la rosette, morphologie des feuilles et sensibilité à l'ABA à la germination, semblent avoir une autre cause puisqu'ils n'existent pas chez la lignée 086062 *aba3-1*. La température foliaire de *has1 aba3-1* semble liée aux autres phénotypes (taille, germination) puisqu'ils sont retrouvés après trois rétrocroisements, et le caractère de petite taille est lui-même fortement lié à la disruption dans le gène At5g61140, comme montré au paragraphe 2.9.1.3. L'événement provoquant les phénotypes principaux de *has1 aba3-1* pourrait donc avoir la même cause que la mutation dans At5g61140, ce qui suggère la possibilité d'un réarrangement chromosomique ayant provoqué à la fois la « cassure » de At5g61140 et d'autres modifications du génome responsables de certains des caractères de *has1 aba3-1*.

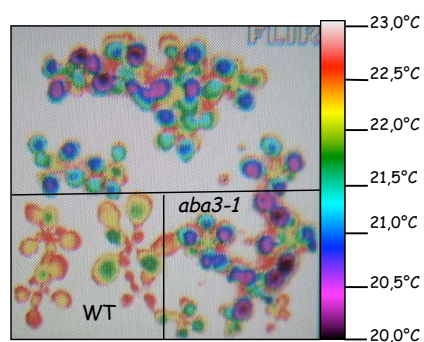


FIG. 2.53 – Image infrarouge (fausses couleurs) de 086062 *aba3-1*

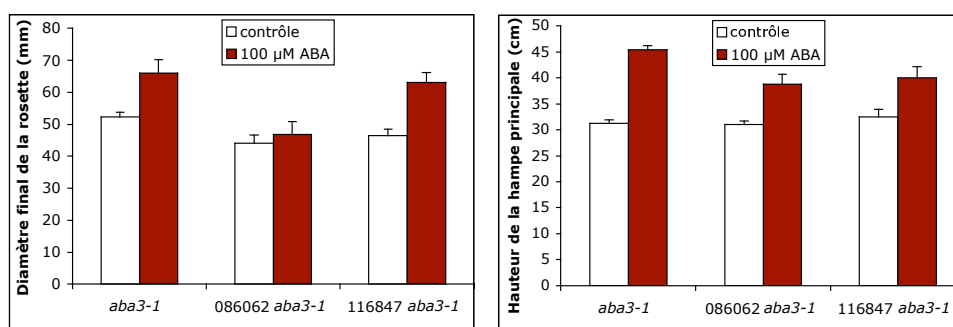


FIG. 2.54 – Mesures biométriques avec et sans pulvérisation d'ABA à 100 μ mol.L⁻¹ du diamètre final de la rosette et de la hauteur maximale de la hampe florale des lignées Salk 086062 *aba3-1* et 116847 *aba3-1*. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard pour 4 répétitions.

Chapitre 3

Discussion

3.1 Stratégie de sélection et d'analyse des mutants *has*

3.1.1 Intérêts et limites de la thermographie infrarouge

La thermographie infrarouge est une technique très bien adaptée à la sélection de mutants car elle est utilisable à haut débit et non destructive. Comparé au crible utilisant le promoteur de *RD29A* contrôlant l'expression du gène de la luciférase, ce crible a l'avantage d'être plus physiologique, c'est-à-dire de mettre en évidence directement des gènes ayant un rôle dans des mécanismes biologiques (par exemple dans la fermeture stomatique) sans influencer nécessairement sur la régulation transcriptionnelle (tel que *OST1* par exemple). Elle a été utilisée à plusieurs reprises avec succès pour identifier des mutants affectés dans le fonctionnement stomatique (Merlot et al., 2002; Xie et al., 2006). Néanmoins, c'est une méthode qui demande des précautions d'utilisation, car de nombreux facteurs affectent la température foliaire (placement dans le pot, taille de la plante, stade de développement, sénescence). Une bonne reproductibilité des conditions de la déshydratation permettant d'observer des différences d'ouverture stomatique est difficile à obtenir. Pour pallier à ces inconvénients, les observations ont toujours été répétées trois fois à plusieurs jours d'intervalle. Cela n'a pourtant pas empêché les populations de cartographie de compter une proportion variable (selon le suppressor) de faux-positifs. De plus, lors du phénotypage de la descendance des recombinants pour la cartographie fine, trois pots par recombinant ont été observés. A cause de la variabilité phénotypique provoquée par le croisement entre accessions, les recombinants (et leur descendance) avaient souvent une taille différente d'*aba3-1*. Lorsque la différence est très importante, elle peut nuire à la fiabilité du phénotypage infrarouge. D'autres sources de variabilité (telles que la différence entre les deux allèles *aba3-1* et *aba3-11*) semblent également avoir une influence, puisque pour certains recombinants la température foliaire comparée aux témoins pouvait varier radicalement d'un pot à l'autre et d'une observation à l'autre. Ces recombinants ne pouvaient donc pas être utilisés pour réduire l'intervalle de cartographie et introduisent un doute quant à la fiabilité du phénotype déterminé pour les autres. Une solution à ce problème aurait été de disposer pour chacun des suppressors d'un phénotype de confirmation qui varie moins dans ces hybrides entre accessions. Un phénotype supplémentaire de sensibilité au paclobutrazol a pu être utilisé pour la cartographie du locus *has3*, pour lequel le phénotypage infrarouge était le plus difficile. Toutefois l'expérience a

montré que la variabilité touchait aussi la germination, qui ne semble donc pas être un critère idéal. L'observation de feuilles détachées des recombinants a également été utilisée pour le locus *has3*, mais n'a pas paru fiable. Un test de la variabilité dans la population hybride F₂ *aba3-1* x *aba3-11* de tous les phénotypes « forts » des supprimeurs aurait pu être mené afin de déterminer lesquels étaient les moins sujets à la variabilité. En outre, la source de variabilité induite par la différence entre les allèles *aba3-1* et *aba3-11* aurait pu être éliminée par la génération de la population de cartographie à partir des mutants *has*, pour les trois qui sont plus chauds que le sauvage.

3.1.2 Utilisation d'un crible de suppression

3.1.2.1 Choix du mutant déficient en ABA

Le mutant *aba3-1* a été choisi pour sa moindre déficience en ABA par rapport aux mutants dans d'autres étapes de biosynthèse de cette hormone, qui affecte modérément son développement. De plus, la synthèse résiduelle d'ABA paraissait favorable à la recherche de mutations de suppression induisant une plus grande sensibilité à l'hormone. L'utilisation d'un mutant avec une déficience en ABA plus prononcée aurait compliqué l'étude physiologique par une réduction plus importante de la taille des plantes, une sensibilité au stress plus forte et une fertilité réduite notamment, comme chez le mutant *aba2* (Cheng et al., 2002). Néanmoins, l'utilisation d'un mutant à phénotype plus fort aurait peut-être facilité l'identification de supprimeurs présentant une réduction moins marquée de l'évapotranspiration foliaire. En effet, un contexte très déficient en ABA aurait exacerbé les différences de température foliaire, de sensibilité à la déshydratation ou à l'ABA et aurait ainsi facilité l'identification de modifications plus faibles.

3.1.2.2 Intérêt de la recherche de supprimeur

De nouveaux mutants de signalisation de voies hormonales ont déjà été identifiés grâce à des cribles de suppression et en mettant à jour, BRL1, un gène partiellement redondant dans la signalisation des brassinostéroïdes (Zhou et al., 2004) et un régulateur négatif de la signalisation des GA, RGA (Silverstone et al., 1997). Dans notre cas, l'utilisation d'un crible de suppression d'un mutant déficient avait pour but de favoriser la sélection de nouveaux gènes par rapport à ceux déjà identifiés grâce à la thermographie infrarouge dans le groupe de J. Giraudat et J. Leung, dont la mutation induisait un phénotype froid. De plus, l'utilisation d'un mutant déficient en ABA permettait de privilégier des mutations en relation avec cette hormone. Cette stratégie a bien marché puisque les supprimeurs montrent tous des changements dans leur sensibilité à l'ABA. Mais puisque trois des mutations *has* augmentent aussi la température foliaire en fond sauvage, on peut se demander si un crible direct pour des mutants plus chauds que le sauvage n'aurait pas permis de sélectionner ces mutations, sachant que la présence d'une deuxième mutation complique la cartographie. Cela n'est pas certain pour l'instant, car il n'a pas encore été prouvé que les mutants *has* étaient plus résistants à une déshydratation progressive, ce phénotype étant peut-être détectable uniquement en présence de la mutation *aba3-1*.

3.1.3 Pertinence du deuxième critère de sélection

Parmi les 17 mutants chauds sélectionnés initialement, nous avons choisi de retenir ceux dont l'élévation de température foliaire était corrélée à une meilleure résistance à la déshydratation. Les supresseurs ont ainsi été soumis à une déshydratation progressive par arrêt d'arrosage et seuls ceux qui conservaient une teneur en eau supérieure à *aba3-1* ont été gardés. Cette méthode a semblé être la plus pertinente pour identifier des gènes intervenant dans la réponse globale de la plante au stress hydrique. Il aurait été possible de prendre comme critère la résistance à une déshydratation rapide, mais celle-ci se fait sans les racines, qui jouent un rôle, en particulier dans la détection du stress. De plus, le stress appliqué lors de cette déshydratation est beaucoup plus rapide qu'un stress « naturel » et des plantes dont la meilleure résistance pourrait reposer sur un processus long n'auraient pas été retenues. *A posteriori*, le choix de la déshydratation progressive semble justifié, puisque deux des supresseurs, pourtant résistants à la déshydratation progressive ne le sont pas à la déshydratation rapide.

3.1.4 Stratégie d'identification des loci *has*

3.1.4.1 Réduction de l'intervalle de cartographie

L'avancement de la cartographie de trois loci a permis d'évaluer la quantité de plantes nécessaires pour arriver à diminuer suffisamment l'intervalle contenant la mutation que l'on cherche à localiser. Une population de cartographie d'environ 200 plantes, dont certaines devront être phénotypées une nouvelle fois (dans leur descendance) peut être suffisante à elle seule pour définir une première région d'environ 2 Mb, comme cela a été le cas pour les loci *has3* et *has4*. Une réduction de l'intervalle d'un facteur 5 à 10 peut être obtenue assez rapidement : le génotypage de 2000 nouvelles plantes pour la sélection de recombinants a conduit à un l'intervalle de 0,2 Mb lors de la cartographie du locus *has4* (0,5 Mb grâce à 1600 plantes pour *has2*). Il devient ensuite de plus en plus difficile de sélectionner de nouveaux recombinants pour lesquels la probabilité de recombinaison diminue avec la taille de l'intervalle. Ainsi, 2600 nouvelles plantes génotypées n'ont permis que de diviser par deux la région de cartographie du locus *has4*. A partir du moment où l'intervalle ne contient plus qu'une centaine de gènes, il peut être moins coûteux en temps et en ressources de commencer à chercher des gènes candidats, pour leur fonction ou leur expression si des données de transcriptome sont disponibles, puis de les séquencer, que de continuer à réduire l'intervalle. Néanmoins, en l'absence de gènes candidats valables, ou si aucun des candidats ne s'avère contenir de mutation, continuer à chercher de nouveaux recombinants pour diminuer l'intervalle reste la seule méthode pour trouver la mutation.

3.1.4.2 Utilisation d'une puce à ADN

Une analyse transcriptomique a été menée dans le but principal d'aider à l'identification de gènes candidats. En effet, puisque les rayons γ génèrent souvent de grandes délétions, les mutations corrépondantes ont probablement pour effet un KO du gène touché. Cet effet n'est visible que si le gène est présent sur la puce et qu'il est suffisamment exprimé dans les conditions utilisées, sinon

la diminution d'expression ne sera pas jugée significative. Dans le cas d'une mutation de perte de fonction qui affecte un gène qui s'autorégule, il est également possible de voir une différence d'expression. Cette analyse transcriptomique s'est révélée intéressante puisque pour *has1* et *has4* des gènes candidats ont été identifiés. De plus, dans le cas de *has4*, même si le gène sous-exprimé n'était pas dans l'intervalle de cartographie, la connaissance de l'existence de cette mutation a permis de vérifier son élimination après trois rétrocroisements.

Enfin, une fois les gènes mutés identifiés, cette étude pourra contribuer à l'identification des voies dans lesquelles chaque gène intervient et de ses éventuelles cibles.

3.1.5 Analyse des mutations sélectionnées

3.1.5.1 Saturation du crible

Les résultats de cartographie montrent que les 4 locus *has* sont distincts. Le fait de ne pas avoir obtenu de séries alléliques a été un handicap pour cette étude car cela aurait permis d'éliminer les mutations complexes telles que *has1* et aurait augmenté la probabilité d'avoir une mutation KO repérable par l'analyse transcriptomique. Bien que le crible utilisé n'ait pas permis l'isolement d'un nombre suffisant de mutants, il n'était pas envisageable de faire une nouvelle recherche de mutants dans le temps de la thèse.

3.1.5.2 Type de mutations sélectionnées

A l'origine, un des objectifs du crible était d'isoler de nouveaux gènes impliqués dans la biosynthèse de l'ABA ou dans sa régulation. Pourtant, sur les 7 supprimeurs à la fois chauds et plus résistants à la déshydratation progressive, aucun n'a montré une plus grande accumulation d'ABA qu'*aba3-1* (figure 2.7 et résultats non présentés), alors que lors d'une recherche de mutants froids (Merlot et al., 2002) une majorité de mutants affectés dans la biosynthèse de l'ABA a été isolée. Une explication possible est que la mutagenèse utilisée (rayons γ) génère surtout de grandes délétions qui provoquent plutôt des pertes de fonction que des gains de fonction des gènes mutés. Or, pour augmenter la synthèse d'ABA par la mutation d'un gène codant pour une enzyme de biosynthèse, seul un gain de fonction est possible. Par contre, il était possible d'obtenir des mutants de perte de fonction dans le catabolisme de l'ABA. Mais des mutations dans des gènes du catabolisme de l'ABA peuvent difficilement permettre au mutant d'améliorer son accumulation d'ABA par un facteur 2,5 à 8 (le rapport entre les teneurs en ABA du sauvage et d'*aba3-1* après une déshydratation rapide / progressive), quand on sait que plusieurs voies interviennent dans ce mécanisme. Finalement, des mutations affectant la régulation négative des gènes de biosynthèse de l'ABA auraient pu être sélectionnées. Si cela n'a pas été le cas, c'est peut-être parce qu'elle se fait plutôt par des régulateurs positifs ou redondants, ou encore parce qu'elle intervient de façon mineure par rapport à l'effet de la mutation *aba3-1*. Il semble donc que les mutations capables de supprimer l'effet d'une déficience en ABA sur la réponse à la déshydratation affectent principalement la signalisation de l'ABA/du stress.

3.2 Analyse des mutations

3.2.1 Analyse de la mutation *has1*

3.2.1.1 La résistance à la déshydratation pourrait être dépendante des racines

S'il a une température foliaire plus élevée et une meilleure résistance à une déshydratation progressive qu'*aba3-1*, *has1 aba3-1* n'est pas plus résistant à une déshydratation rapide et ses feuilles détachées ne sont pas plus chaudes (figure 3.1). La résistance de *has1 aba3-1* à la déshydratation pourrait donc nécessiter un processus impliquant les racines. En particulier, la détection du stress par l'appareil racinaire, ou bien la production ou la propagation du signal de stress hydrique des racines aux parties aériennes (Christmann et al., 2007) pourrait être affecté. L'existence d'un phénotype racinaire chez *has1 aba3-1* rend plausible une telle hypothèse, puisque ses racines sont affectées dans leur réponse au stress salin et à l'ABA.

3.2.1.2 Liaison entre la mutation de l'hélicase putative et les phénotypes de *has1 aba3-1*

Le suppresseur *has1 aba3-1* est muté dans le gène At5g61140 codant pour une hélicase à ARN putative dans laquelle une disruption de la séquence d'ADN empêche l'expression d'un ARNm complet (voir paragraphe 2.9.1.1). Une lignée portant une insertion dans une région du gène proche de celle où se trouve la « coupure » chez *has1 aba3-1*, nommée 086062 a été étudiée, avant et après son croisement avec *aba3-1*.

La majorité des phénotypes de *has1 aba3-1* sont fortement liés à un possible réarrangement chromosomique dans le gène At5g61140, puisque la petite taille en serre coségrège (voir paragraphe 2.9.1.3) avec cette mutation et que trois rétrocroisements ont montré que la petite taille était liée à la température foliaire. Pourtant, parmi tous les phénotypes testés chez 086062 *aba3-1* seule la réponse réduite à l'ABA exogène sur la croissance de la rosette est commune avec *has1 aba3-1* ; il n'est en particulier ni petit, ni chaud. Il se pourrait donc qu'une partie des phénotypes de *has1 aba3-1* soient dus à la disruption du gène At5g61140, mais que les autres aient une autre origine.

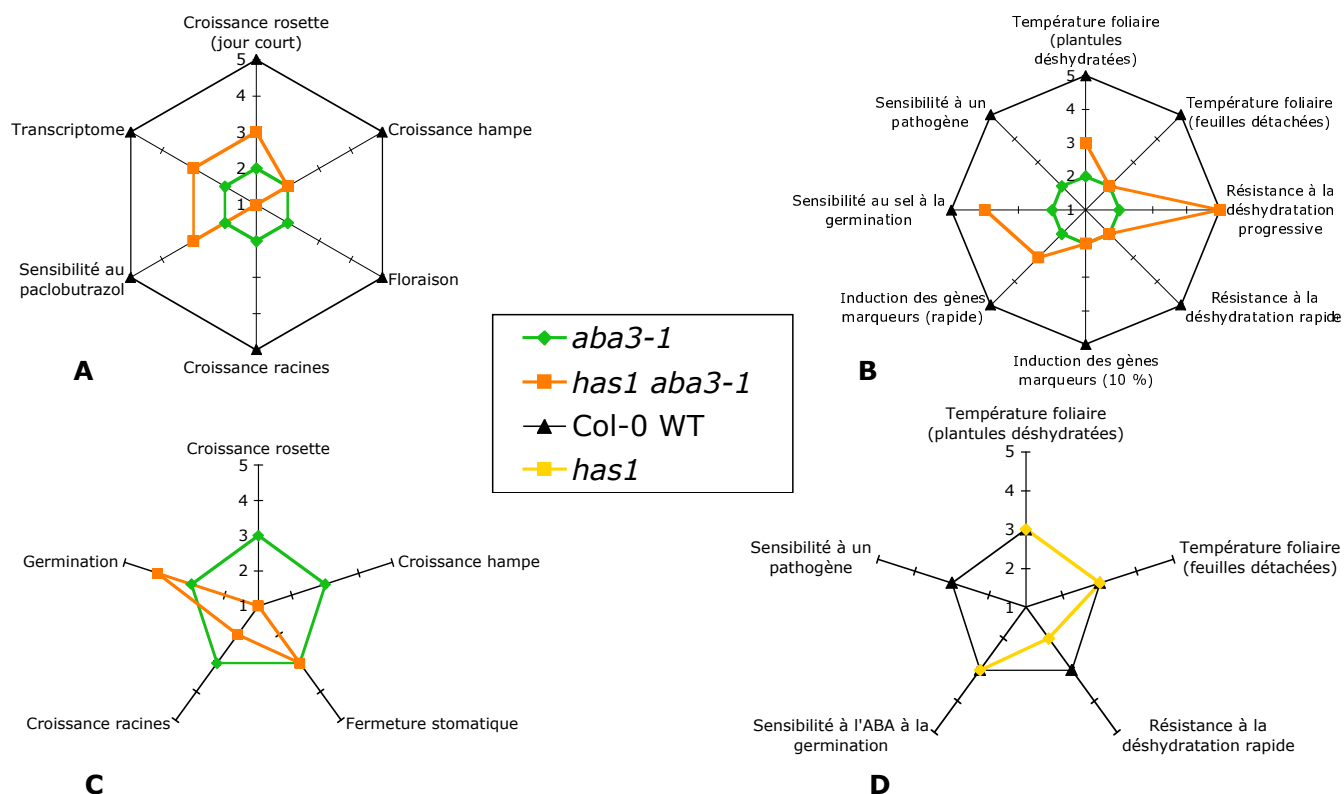


FIG. 3.1 – Récapitulatif A : des phénotypes développementaux, de germination et d'expression non liés à la réponse au stress de *has1 aba3-1* ; B : des phénotypes de réponse à plusieurs stress de *has1 aba3-1* ; C : des phénotypes de sensibilité à l'ABA de *has1 aba3-1* ; D : des phénotypes de *has1*. Pour A et B : échelle de 1 à 5 dans laquelle les phénotypes d'*aba3-1* sont notés 2 et ceux du sauvage sont notés 5. Pour C/D : échelle de 1 à 5 dans laquelle les phénotypes d'*aba3-1*/du sauvage sont notés 3.

3.2.1.3 Réponse de la croissance à la durée du jour

La différence de croissance importante du supprimeur entre les conditions de la serre et celles d'une chambre de culture en jour court pourrait résulter au moins en partie de sa floraison précoce (figure 3.1). De plus, ces phénotypes seraient peut-être dus à la mutation de l'hélicase putative, car ils sont retrouvés chez le mutant *lba1*, affecté dans une autre hélicase (Yoine et al., 2006). Pour tester l'influence de la mutation de At5g61140 sur la croissance en jour court et sur la floraison, le mutant 086062 *aba3-1* pourra être cultivé en même temps que *has1 aba3-1*, et leurs phénotypes comparés.

3.2.1.4 La sensibilité à l'ABA dépend de l'organe étudié

L'hypersensibilité à l'ABA de la germination de *has1 aba3-1* (figure 3.1) pourrait être corrélée à sa meilleure résistance à la déshydratation progressive. En effet, un tel phénotype est aussi observé chez certains mutants plus résistants à la déshydratation tels que *abh1*, *cbp20* et *era1* (voir tableau 1.1). L'hypersensibilité à l'ABA de la germination de *has1 aba3-1* n'existe pas chez 086062 *aba3-1*, ce qui montre que ce phénotype n'est pas dû à la mutation du gène At5g61140. La perte de sensibilité à l'ABA au niveau des racines (figure 3.1) pourrait être corrélée à celle des parties aériennes. La possibilité qu'elle ait la même origine que la résistance à la déshydratation doit être envisagée, car l'ensemble de phénotypes : racine courte, perte de sensibilité à l'ABA et de résistance au stress salin, existe aussi chez *has1 aba3-1*.

3.2.1.5 Recherche d'une autre origine pour l'augmentation de température foliaire

Comme ni le phénotype chaud ni la petite taille en serre ne sont retrouvés chez 086062 *aba3-1* (voir paragraphe 2.9.2.4), la mutation d'un autre gène, liée à celle de At5g61140 doit expliquer ces phénotypes. Le séquençage de l'ADN adjacent aux bordures de la coupure de ce gène apporteront peut être des indications quant à la nature exacte de cette altération de la séquence génomique et quel(s) autre(s) gène(s) elle pourrait toucher. Comme des gènes chloroplastiques sont fortement sous-exprimés chez *has1 aba3-1* (alors qu'ils sont régulés de la même façon chez *aba3-1*, le sauvage et les autres supprimeurs), en particulier de sous-unités d'ATPase et du photosystème I, il est possible qu'une autre mutation affecte un régulateur de gènes chloroplastiques, et qu'elle soit liée aux phénotypes de *has1 aba3-1* non expliqués par la mutation de l'hélicase.

Le fait que les phénotypes de réponse à la déshydratation et de taille réduite en serre soient prépondérants sur la déficience en ABA (puisque *has1* a la même taille et la même température foliaire et réponse à la déshydratation rapide que *has1 aba3-1* (voir paragraphe 2.4.2) est un signe que la mutation qui en est la cause touche un gène ayant une fonction majeure pour la plante. Il est donc possible que la température foliaire plus élevée et la résistance à une déshydratation progressive soient des conséquences annexes d'une dérégulation physiologique importante, qui ne soit pas liée directement à la signalisation de l'ABA ou à la réponse au stress hydrique. Par exemple, une mutation affectant la photosynthèse expliquerait les phénotypes de croissance et pourrait influencer sur l'ouverture stomatique et/ou la température foliaire. C'est pourquoi, compte tenu de son caractère

moléculaire complexe et de son effet pléiotrope la mutation *has1* ne sera vraisemblablement pas étudiée plus avant.

3.2.2 Analyse de la mutation *has2*

3.2.2.1 Les changements de transcriptome ont peu de conséquences phénotypiques

Les résultats de l'analyse transcriptomique sont difficiles à relier aux autres résultats. Il est inattendu que les forts changements d'expression par rapport à *aba3-1* n'aient pas plus de conséquence au niveau physiologique : étant donné le peu de différence d'expression des gènes entre *has2 aba3-1* et le sauvage en conditions non stressées, on s'attendrait à ce qu'ils aient un développement très semblable, alors que *has2 aba3-1* reste proche d'*aba3-1* pour la stature et le délai de floraison (figure 3.2). Ces résultats ne sont pas non plus corrélés avec l'expression des gènes de réponse à la déshydratation, qui ne sont pas plus induits que chez les autres supprimeurs. Ce changement de régulation de l'expression des gènes pourrait être relativement indépendant de la réponse au stress.

3.2.2.2 La résistance à la déshydratation pourrait nécessiter un seuil dans l'intensité de stress

Les phénotypes de réponse à différents types de déshydratation (figure 3.2) suggèrent que la mutation *has2* diminuerait le taux de transpiration en réponse à un stress hydrique suffisamment intense. En effet, la température foliaire élevée, qui est mesurée après au moins 5 jours de déshydratation physiologique, indique une diminution de la transpiration dans ces conditions de stress. Pendant une déshydratation rapide, on observe une vitesse de perte en eau diminuée lors de la phase linéaire de la déshydratation, c'est-à-dire lorsque le stress est déjà intense (perte en eau d'au moins 20 % du poids total). Par contre pendant les premières minutes d'observation infrarouge des feuilles détachées de *has2 aba3-1* aucune différence de température avec *aba3-1* n'est visible, ce qui suggère que le stress n'est alors pas suffisant pour déclencher le processus permettant de limiter la transpiration. Cet effet de seuil semble également exister pour l'induction de gènes de réponse au stress hydrique : il y a peu de changement avec *aba3-1* lors d'une déshydratation modérée, après la perte d'une quantité d'eau correspondant à 10 % du poids initial, mais on observe une induction après les 4 h 30 de déshydratation rapide. Ce seuil d'intensité du stress pourrait être lié à un seuil de teneur en ABA. Pour tester cette hypothèse, il faudrait mesurer les teneurs en ABA de *has2 aba3-1* et *has2* après une déshydratation à 10 % et pour voir si la différence d'accumulation serait suffisante pour expliquer ce type de réponse.

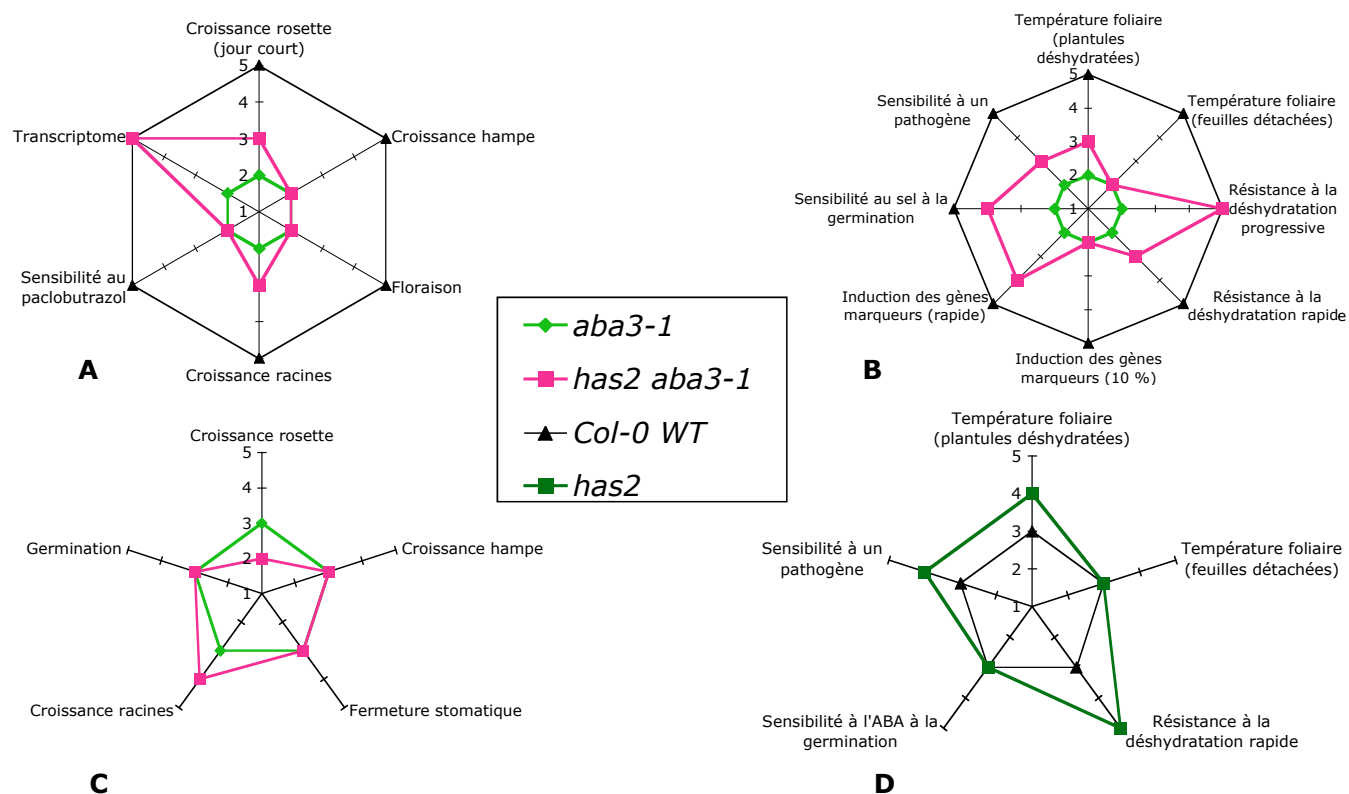


FIG. 3.2 – Récapitulatif A : des phénotypes développementaux, de germination et d'expression non liés à la réponse au stress de *has2 aba3-1* ; B : des phénotypes de réponse à plusieurs stress de *has2 aba3-1* ; C : des phénotypes de sensibilité à l'ABA de *has2 aba3-1* ; D : des phénotypes de *has2*. Pour A et B : échelle de 1 à 5 dans laquelle les phénotypes d'*aba3-1* sont notés 2 et ceux du sauvage sont notés 5. Pour C/D : échelle de 1 à 5 dans laquelle les phénotypes d'*aba3-1*/du sauvage sont notés 3.

3.2.2.3 Recherche de gènes candidats

La mutation *has2* semble agir sur la signalisation de l'ABA et du stress dans les tissus aériens et racinaires (figure 3.2). L'effet important de cette mutation sur l'expression des gènes révélé par l'analyse transcriptomique suggère la possibilité qu'un facteur de transcription ou une protéine régulant un facteur de transcription soient mutés. Étant donné qu'aucun des gènes de réponse au stress hydrique dont l'expression a été étudiée ne semble plus particulièrement induit que les autres, il paraît peu probable qu'un facteur de transcription impliqué dans une des voies spécifiques de régulation de ces gènes soit muté ou différenciellement régulé, la mutation devant agir plus en amont pour pouvoir affecter toutes ces voies à la fois.

La comparaison avec les mutants résistants à la déshydratation, énumérés dans le tableau 1 de l'introduction, permet de rapprocher les phénotypes causés par *has2* avec ceux de *ahk2* et *ahk3*, qui montrent une surexpression de gènes de réponse au stress hydrique. Il n'y a pas d'histidine kinase parmi les 145 gènes de l'intervalle de cartographie pour le locus *has2*, mais par contre il y a plusieurs kinases : At3g10540 codant pour une protéine kinase dépendante de 3-phosphoinositides, At3g10660 codant pour CPK2 une protéine kinase dépendante du calcium, At3g11010 et At3g11080 deux kinases de type récepteur impliquées dans la réponse aux pathogènes. Certaines kinases pouvant phosphoryler des facteurs de transcription, la mutation d'une kinase serait cohérente avec les hypothèses exposées au-dessus pour expliquer les modifications du transcriptome de *has2 aba3-1*. L'intervalle de cartographie contient de nombreux facteurs de transcription : quatre MYB, trois NAC, un bZIP, un facteur de transcription à zinc-finger, trois de type inconnu, WOX5 (impliqué dans la réponse à l'auxine) et DREB2B. Une mutation récessive dans DREB2B ne correspond pas à un phénotype de résistance à la déshydratation et aurait été visible sur l'expression des gènes *RD29A* et *COR15A*, il est donc peu probable que ce soit le gène touché par la mutation de suppression.

Deux gènes de l'intervalle de cartographie sont significativement sous-exprimés par rapport à *aba3-1* : At3g11010 (protéine de résistance aux maladies, famille LRR) et At3g11340 (UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transférase). Toutefois, leur expression n'est pas significativement différente du sauvage. De plus, de nombreux gènes sont dérégulés de façon similaire chez *has2 aba3-1*. La probabilité qu'ils soient KO n'est donc pas très grande, mais il faudra néanmoins les compter parmi les gènes candidats.

3.2.3 Analyse de la mutation *has3*

3.2.3.1 Des phénotypes de réponse au stress et de germination liés à une hypersensibilité à l'ABA

La plupart des phénotypes de *has3 aba3-1* de croissance, de germination, de réponse à des stress et de sensibilité à l'ABA sont cohérents avec une hypersensibilité à l'ABA (figure 3.3). La suppression de la résistance de la germination au stress salin et au paclobutrazol et de la réponse à la déshydratation au niveau des stomates semble être due à une plus grande sensibilité à l'ABA, qui inhibe plus la germination du supprimeur que celle d'*aba3-1*, et qui semble induire une différence de température foliaire plus importante que les témoins. Cette plus grande sensibilité pourrait aussi expliquer la meilleure croissance de *has3 aba3-1*, ainsi que son délai de floraison retardé. La réponse

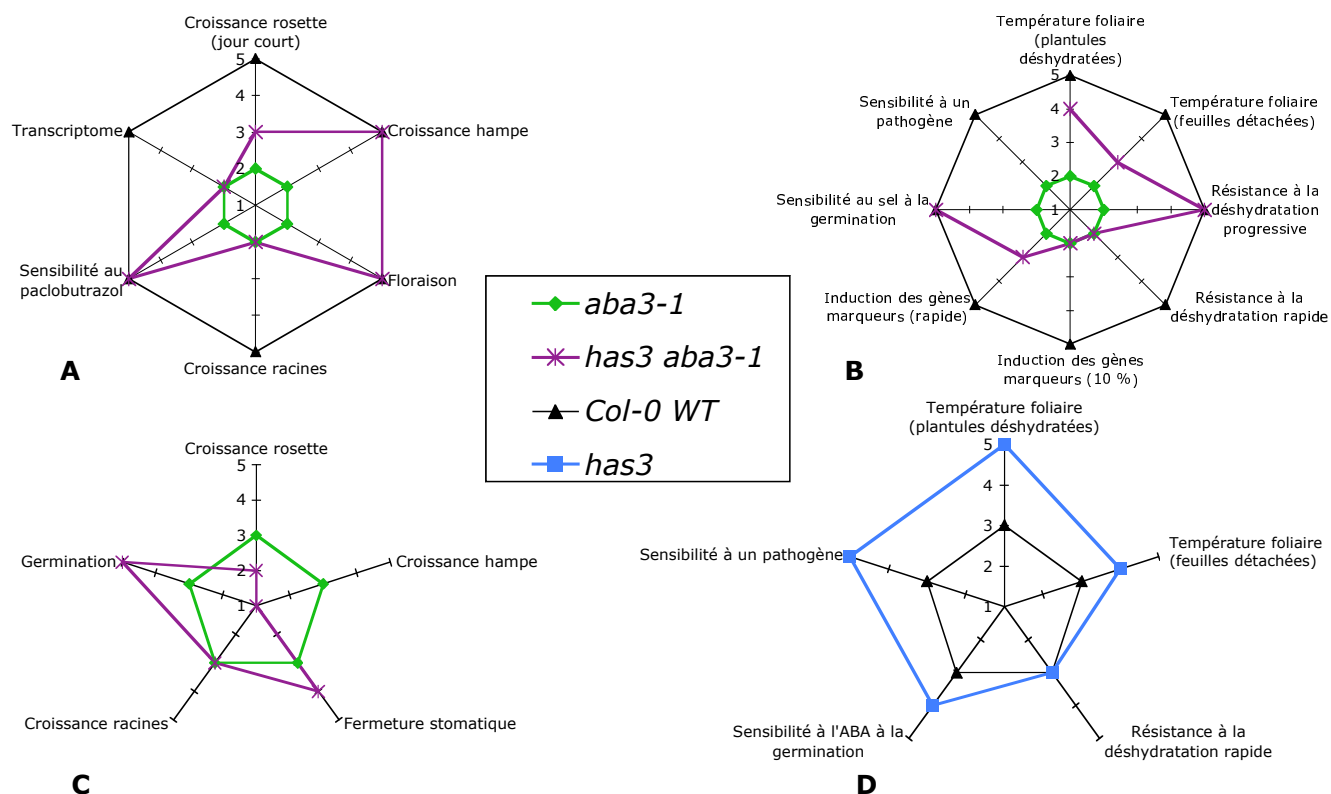


FIG. 3.3 – Récapitulatif A : des phénotypes développementaux, de germination et d'expression non liés à la réponse au stress de *has3 aba3-1* ; B : des phénotypes de réponse à plusieurs stress de *has3 aba3-1* ; C : des phénotypes de sensibilité à l'ABA de *has3 aba3-1* ; D : des phénotypes de *has3*. Pour A et B : échelle de 1 à 5 dans laquelle les phénotypes d'*aba3-1* sont notés 2 et ceux du sauvage sont notés 5. Pour C/D : échelle de 1 à 5 dans laquelle les phénotypes d'*aba3-1*/du sauvage sont notés 3.

plus faible à l'ABA exogène serait alors due au fait qu'il y avait moins de réduction de stature à compenser que chez *aba3-1*.

La mutation *has3* semble avoir également un effet sur la résistance aux pathogènes puisque *has3* est beaucoup plus sensible à la bactérie *Erwinia chrysanthemi* que le sauvage. Ce phénotype correspond à ce qu'on attend chez un mutant hypersensible à l'ABA, puisque l'ABA a un effet négatif sur la résistance aux pathogènes.

3.2.3.2 Recherche de gènes candidats

Grâce à l'analyse transcriptomique, on remarque un schéma particulier de dérégulation de certains gènes : la plupart des gènes différentiellement exprimés sont très peu exprimés chez les témoins et sont fortement induits chez le supprimeur (voir paragraphe 2.5.3). Il est donc possible, comme pour *has2*, qu'un facteur de transcription ou un gène régulant l'activité d'un facteur de transcription soit muté ou bien qu'une modification dans le métabolisme des ARN soit à l'origine de ces différences de régulation. Cette dernière hypothèse est séduisante car les mutants de certains acteurs du métabolisme des ARN (voir paragraphe 1.1.4.2) constituent une large part des mutants hypersensibles à l'ABA. L'intervalle de cartographie contient 306 gènes dont plusieurs codant pour des ARN polymérases At4g14520, At4g14660, At4g16260, et un gène de ribonucléase At4g15417 (AtRLT1). Le gène FCA, codant pour un récepteur putatif à l'ABA se trouve également dans la région de cartographie, mais sa mutation ne provoque pas de phénotype de germination (Razem et al., 2006).

D'autres mutations connues pour augmenter la résistance à la déshydratation et la sensibilité à l'ABA des graines et des stomates sont celles affectant des phosphatases (voir paragraphe 1.2.4.1.2). Deux sous-unités régulatrices B' γ de PP2A sont codées par des gènes adjacents de l'intervalle de cartographie : At4g15410 et At4g15415.

L'étude transcriptomique permet également d'identifier un autre gène candidat : At4g15610 (protéine membranaire intégrale) qui se trouve dans l'intervalle de cartographie et est surexprimé chez *has3 aba3-1*, ce qui pourrait être dû à une perte de fonction du gène dans le cas où il s'auto-régulerait.

3.2.4 Analyse de la mutation *has4*

3.2.4.1 Une possible fermeture constitutive des stomates

Les feuilles détachées de *has4 aba3-1* et de *has4* ont une température nettement plus élevée et les deux mutants perdent moins d'eau que leurs témoins respectifs en début de déshydratation rapide (figure 3.4). De plus, lors d'expériences préliminaires, les stomates de *has4 aba3-1* ont semblé ne pas répondre à l'ABA. Tous ces résultats suggèrent que la mutation *has4* a pour effet soit d'induire une fermeture constitutive des stomates, soit une fermeture plus rapide. Une expérience de mesure de la conductance stomatique sur des plantes entières pourrait permettre de tester l'hypothèse d'une fermeture constitutive.

Une telle fermeture des stomates pourrait diminuer l'activité photosynthétique ce qui expliquerait le diamètre de la rosette diminué par rapport à *aba3-1* de *has4 aba3-1*. Mis à part ce phénotype

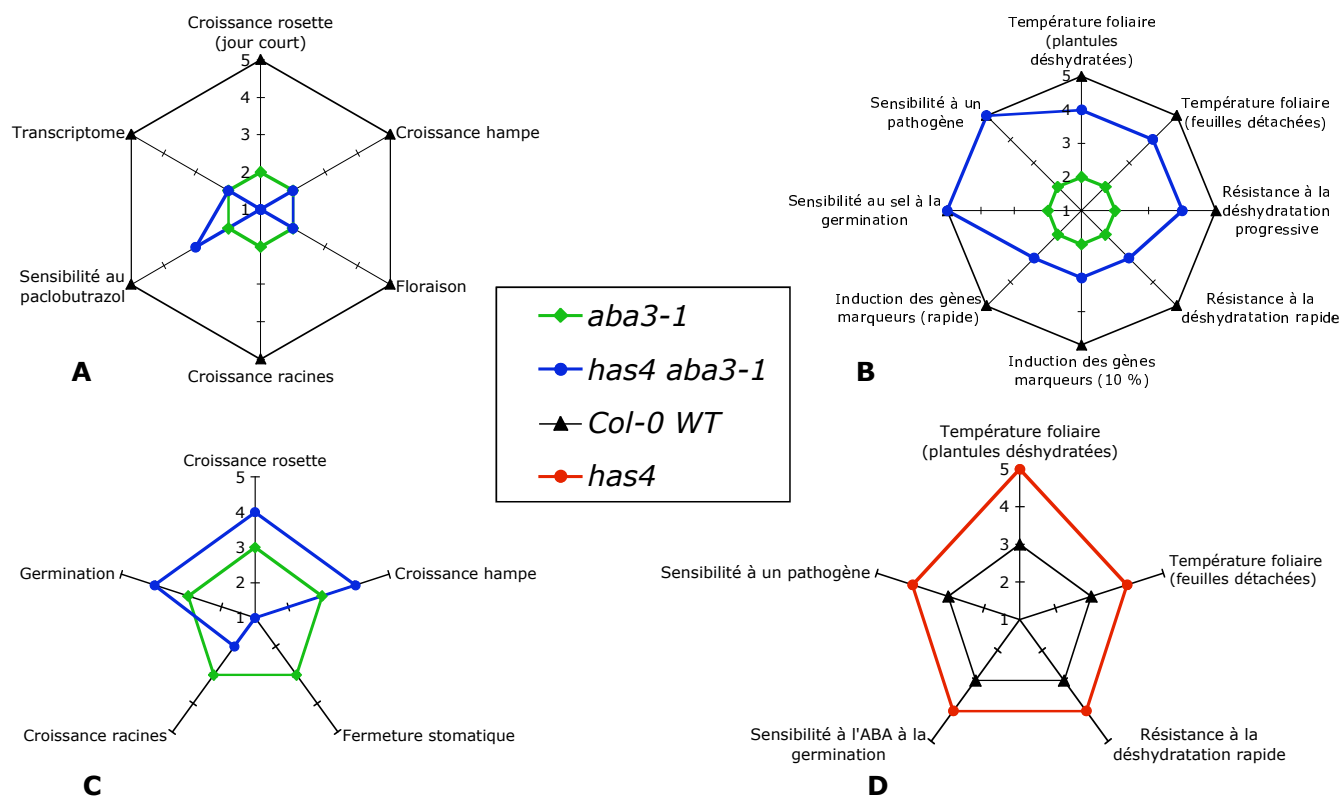


FIG. 3.4 – Récapitulatif A : des phénotypes développementaux, de germination et d'expression non liés à la réponse au stress de *has4 aba3-1* ; B : des phénotypes de réponse à plusieurs stress de *has4 aba3-1* ; C : des phénotypes de sensibilité à l'ABA de *has4 aba3-1* ; D : des phénotypes de *has4*. Pour A et B : échelle de 1 à 5 dans laquelle les phénotypes d'*aba3-1* sont notés 2 et ceux du sauvage sont notés 5. Pour C/D : échelle de 1 à 5 dans laquelle les phénotypes d'*aba3-1*/du sauvage sont notés 3.

de taille réduite, *has4 aba3-1* montre peu de phénotypes non liés à la réponse au stress hydrique (figure 3.4), et en particulier son transcriptome en conditions de culture normales est peu modifié par rapport à *aba3-1*. Ce phénotype de résistance à la déshydratation couplé avec une insensibilité des stomates à l'ABA rappelle celui du mutant *mrp5-1* (Klein et al., 2003), affecté dans un transporteur ABC.

3.2.4.2 Des modifications généralisées de la sensibilité à l'ABA

Les effets de la mutation *has4* sur la réponse au stress hydrique semblent être liés à des différences de sensibilité à l'ABA (figure 3.4). En effet, au niveau racinaire on observe une insensibilité à l'ABA et une hypersensibilité au stress salin de *has4 aba3-1*. Les graines de *has4 aba3-1* et *has4* sont hypersensibles à l'ABA à la germination, ainsi qu'au stress salin et au paclobutrazol pour *has4 aba3-1*. Cette hypersensibilité à l'ABA est retrouvée pour les graines de *has4*. Il serait donc intéressant de tester aussi l'effet du stress salin et du paclobutrazol sur sa germination.

La mutation *has4* induit également une plus grande sensibilité à un pathogène avec ou en l'absence de la mutation *aba3-1* (figure 3.4). Au niveau moléculaire, de nombreux gènes de réponse au stress hydrique sont surexprimés chez *has4 aba3-1*. Ces phénotypes peuvent être expliqués par une plus grande sensibilité à l'ABA. Ces résultats indiquent que la signalisation de l'ABA serait modifiée à un niveau commun à de nombreux mécanismes.

3.2.4.3 Avancement de la cartographie

Étant donné que l'intervalle de cartographie pour ce locus ne contient plus qu'une trentaine de gènes (voir section 2.8), dont certains ont été éliminés grâce au phénotype de mutants d'insertion ou par leur séquençage, et que parmi les autres se trouvent de bons gènes candidats, l'identification du gène portant la mutation ne devrait pas tarder. Le rôle de ce gène dans la fermeture stomatique et/ou la signalisation de l'ABA devrait apporter des informations inédites, en regard aux phénotypes de *has4 aba3-1* et *has4* et à l'absence de gènes déjà caractérisés pour leur fonction dans ces processus dans l'intervalle de cartographie.

3.2.5 Mise en évidence d'interactions entre la signalisation de l'ABA et la réponse au stress biotique

L'étude de la sensibilité à un pathogène des mutants suppresseurs nous a paru un aspect important à étudier dans un projet consacré à la tolérance au déficit hydrique, compte tenu de la nombreuse littérature récente sur le sujet. En effet, dans un objectif d'amélioration de la réponse de plantes cultivées aux conditions environnementales, il n'est pas concevable de se concentrer uniquement sur l'aspect abiotique lorsque l'on sait qu'une modification dans le processus de tolérance au stress hydrique a de fortes chances d'affecter également la réponse aux pathogènes (voir paragraphe 1.1.3.4). De plus, plusieurs résultats de ce travail confirment que ces deux processus sont fortement liés. Tout d'abord, l'analyse du transcriptome du mutant *aba3-1* montre que l'expression de nombreux gènes de réponse au stress biotique est induite par la déficience en ABA (voir annexe 3), en particulier des facteurs de transcription WRKY ; un parallèle peut être fait avec des

résultats de puce à ADN montrant que réciproquement, une attaque par un pathogène induit de nombreux gènes de signalisation et de biosynthèse de l'ABA (de Torres-Zabala et al., 2007). Sur-tout, les trois mutants *has* dont la température foliaire est plus élevée que celle du sauvage sont plus sensibles à la bactérie *Erwinia chrysanthemi* soulignant la difficulté d'améliorer la tolérance au déficit hydrique sans augmenter la sensibilité au stress biotique. Il aurait été intéressant de disposer d'un plus grand nombre de mutants résistants à la déshydratation pour évaluer l'étendue de cette relation antagoniste.

3.3 Conclusion et perspectives

3.3.1 Conclusion

Les résultats de cartographie indiquent sans équivoque que les quatre locus *has* étudiés sont distincts. D'après les analyses physiologique et transcriptomique, ces quatre mutations semblent agir à des niveaux différents de la signalisation de l'ABA. D'abord au niveau stomatique, ils ont tous des phénotypes différents si l'on considère les tests de température de feuilles détachées et de déshydratation rapide. La sensibilité à l'ABA est également variée entre les supprimeurs et dépend des tissus testés : pour la croissance des parties aériennes en réponse à de l'ABA exogène, seuls *has1 aba3-1* et *has3 aba3-1* semblent avoir des réponses à peu près similaires, mais pour la sensibilité des racines *has1 aba3-1* ressemble alors à *has4 aba3-1*, tandis que *has2 aba3-1* a une réponse à l'ABA peu ou pas différente d'*aba3-1* pour les différents processus testés. Ces résultats suggèrent que les quatre mutations de suppression agissent à des niveaux différents de la signalisation de l'ABA/du stress hydrique. La recherche de gènes candidats pour les loci *has2*, *has3* et *has4* a montré que leurs intervalles de cartographie ne contenaient pas de gènes déjà étudiés dans lesquels des mutants auraient des phénotypes qui correspondraient à ceux de nos mutants. Cela montre que, soit les gènes affectés ont un rôle encore inconnu, soit ils ont une autre fonction que celle déjà décrite. Dans tous les cas, ces trois mutations devraient permettre d'avancer dans la compréhension des mécanismes mis en jeu pour la tolérance à la déshydratation.

Finalement, il est intéressant de constater que parmi les trois mutations *has* testées, toutes induisent une hypersensibilité à la bactérie *Erwinia chrysanthemi*, indiquant une corrélation entre résistance à la déshydratation et sensibilité aux pathogènes.

3.3.2 Perspectives

Afin d'avoir une idée plus claire de l'impact des mutations de suppression sur les stomates, des mesures de la conductance stomatique des supprimeurs *has aba3-1* et également des mutants *has* devraient être réalisées prochainement. La sensibilité des stomates à l'ABA devra être mieux étudiée grâce à une répétition des observations de la température de feuilles pulvérisées avec de l'ABA avec une quantification de l'écart de température, et également par des mesures de la fermeture stomatique induite par l'ABA sur des pelures d'épiderme, en priorité pour les mutations *has3* et *has4*.

Une fois ces expériences réalisées, la caractérisation physiologique des supresseurs *has aba3-1* sera suffisamment complète, et il faudra se concentrer sur la confirmation des phénotypes en fond sauvage. En particulier, il faudra soumettre les mutants *has* à une déshydratation progressive pour voir s'ils sont capables de mieux garder leur eau, comme les supresseurs. Il faudra également confirmer les phénotypes de germination de *has3* avec des tests de dormance, de résistance au stress salin et au paclobutrazol. Des mesures de la croissance de ces mutants, de leur délai de floraison et leur réponse à l'ABA pour les parties aériennes seraient utiles pour mieux comprendre les phénotypes des supresseurs, compliqués par l'effet de leur déficience en ABA.

En ce qui concerne la cartographie, la fin du séquençage des meilleurs gènes candidats et de leurs promoteurs devrait prochainement permettre d'identifier le gène touché par la mutation *has4*. Pour la cartographie des loci *has2* et *has3*, l'obtention de nouveaux recombinants est nécessaire afin de réduire encore les intervalles de cartographie. Des gènes candidats pour leur fonction ou leur expression mesurée grâce aux puces à ADN ont déjà été identifiés et ceux qui resteront dans la région de cartographie réduite seront séquencés.

Les gènes identifiés pour les loci *has* devront être validés par un test de complémentation ou à l'aide de mutants d'insertion dans ces gènes montrant des phénotypes identiques au mutant *has* correspondant. Selon la nature de ces gènes, une analyse de leur expression dans la plante et de leur localisation cellulaire pourra être nécessaire. Leur étude pourra être guidée grâce aux résultats de l'analyse transcriptomique. L'objectif final sera de réussir à identifier le rôle des protéines correspondantes en relation avec ce qui est déjà connu de la réponse à la déshydratation de la plante *Arabidopsis thaliana*.

Chapitre 4

Matériels et Méthodes

4.1 Matériel végétal

Le mutant d'*Arabidopsis thaliana aba3-1* (gène *ABA3* : At1g16540), de l'accession Columbia-0 (notée Col-0), a été obtenu par un crible de germination sur paclobutrazol (Léon-Kloosterziel et al., 1996) et a été fourni par Martin Koornneef. Le mutant *aba3-11*, de l'accession Landsberg *erecta* (notée Ler), a été identifié lors d'un crible de recherche de plantes froides par thermographie infrarouge (numéro VI-48) (Merlot et al., 2002). Le gène *ABA3* a été séquencé chez ce mutant : il contient une mutation ponctuelle (G2085A), provoquant le changement de la glycine en position 280 en sérine.

Les mutants supprimeurs *has1 aba3-1*, *has2 aba3-1*, *has3 aba3-1* et *has4 aba3-1* ont été obtenus par irradiation aux rayons gamma (irradiateur CIGAL du centre de Cadarache) de 2500 graines mutantes *aba3-1*. La source d'irradiation est du Co⁶⁰ pour une dose de 300 Gray (Gy) à un débit de dose de 20 Gy.min⁻¹. Avant mon arrivée au laboratoire, 40000 graines M₂ ont ensuite été criblées, parmi lesquelles 165 plantes chaudes ont été identifiées. Les contaminants sauvages et révertants intragéniques ont été éliminés par un test d'activité de la xanthine déshydrogénase, une enzyme nécessitant un cofacteur à molybdène sulfuré par la sulfurase de cofacteur à molybdène codée par *ABA3* pour être fonctionnelle. Le phénotype chaud des plantes sélectionnées restantes a été confirmé en descendance pour 17 d'entre elles. Une déshydratation par arrêt d'arrosage a permis de sélectionner 7 lignées plus résistantes qu'*aba3-1*, parmi lesquelles 4 lignées récessives étudiées plus en détail.

4.2 Méthodes

4.2.1 Manipulations du matériel végétal

4.2.1.1 Stérilisation des graines

Les graines sont stérilisées avant d'être semées *in vitro* pour les tests de germination ou avant repiquage en serre. La solution de stérilisation est obtenue en dissolvant un comprimé de chlore actif (Inov'Chlore) dans 40 mL d'eau osmosée, puis en dissolvant cette préparation 10 fois (v/v) dans

de l'éthanol 95 % (v/v). Entre 0,7 et 1 mL de cette solution est ajouté dans un tube eppendorf contenant les graines, et le tout est mis à agiter 7 min. Les graines sont enfin rincées à l'éthanol absolu et mises à sécher sous une hotte à flux laminaire.

4.2.1.2 Conditions de culture

4.2.1.2.1 Germination *in vitro* Afin de pouvoir repiquer les plantes en serre ou en chambre de culture, les graines stériles sont semées dans des boîtes de Petri (diamètre 9 cm, Greiner) sur un milieu de culture de type Gamborg B5 (Duchefa) contenant 1 % (p/v) de saccharose, 0,7 % (p/v) d'agar (Kalys) et 0,0008 % (v/v) de pourpre de bromocrésol, le pH est ajusté à la soude à 6,7. Après une stratification (48 à 72 h à 4°C) permettant de lever la dormance résiduelle, la germination et le développement des plantules se déroulent pendant 7 à 10 jours en chambre de culture dont les conditions d'hygrométrie, de photo- et thermo-période sont contrôlées (16 h de jour, 8 h de nuit, 25°C, hygrométrie 70 %).

4.2.1.2.2 Culture en serre et en chambre de culture Après 7 à 10 jours de culture *in vitro*, les plantules sont repiquées en serre (photopériode de 13 h à une intensité minimale de lumière de 250 à 400 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, 22°C le jour, 18°C la nuit, hygrométrie non contrôlée) dans du terreau (tourbe de sphaigne blonde, Terf) arrosé régulièrement avec de l'eau pendant les 3 premières semaines de culture, puis avec de la solution nutritive diluée 200 fois (N 15 %, P 10 %, K 30 % ; B 0,02 %, Cu 0,05%, Fe 0,1 %, Mn 0,05 %, Mo 0,05 %, Zn 0,05 % (p/v)).

Pour la réalisation des tests de déshydratation physiologique, les plantes sont cultivées en chambre de culture réglée en jour court afin d'optimiser la taille de la rosette (8 h de lumière à 21°C, 16 h d'obscurité à 17°C, hygrométrie 70 %, intensité lumineuse de 150 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$).

4.2.1.3 Croisements

Sur un bouton floral de la plante utilisée comme parent femelle, tous les organes du périanthe ainsi que les étamines sont excisés à la pince, sous une loupe binoculaire. Les anthères à maturité de la plante paternelle sont mis en contact avec le pistil de la fleur maternelle émasculée, afin d'y déposer le pollen. Les autres fleurs et les siliques présentes sur la hampe florale portant la fleur croisée sont excisées ainsi que les autres boutons floraux de l'inflorescence.

4.2.2 Culture des bactéries

Les bactéries sont cultivées dans du milieu LB (Luria Bertani, extrait de levure 5 g.L⁻¹, bacto-tryptone 10 g.L⁻¹, NaCl 10 g.L⁻¹, pH 7,2) à 37°C. Si besoin est, le milieu de culture est supplémenté de kanamycine (Duchefa) à une concentration finale de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

4.2.3 Tests physiologiques

4.2.3.1 Tests de germination

Pour tous les tests de germination, les graines stériles sont semées dans des boîtes de Petri (Greiner) de diamètre 9 cm sur un milieu minimum composé d'eau osmosée et d'agarose 0,5 % (p/v). Les semis subissent une stratification de 72 h (4°C) afin d'homogénéiser la germination puis sont placés dans un phytotron (hygrométrie 70 %, photopériode de 16 h à $50 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, 25°C). Après 4 jours de culture, les graines germées (le critère de germination varie selon l'inhibiteur testé) sont comptabilisées. Toutes les mesures sont faites en triplicat. La moyenne sur les 3 boîtes du pourcentage de graines germées par rapport au nombre total de graines semées est calculée et normalisée par la valeur maximale de germination afin de ne pas tenir compte des variations de germination entre les génotypes indépendantes de l'effet de l'inhibiteur. Il est ainsi possible d'évaluer la résistance ou la sensibilité à l'inhibiteur.

4.2.3.1.1 Test de résistance au paclobutrazol La gamme de concentration en paclobutrazol (Syngenta) utilisée est la suivante : 10^{-4} , 3.10^{-4} , 10^{-5} , 3.10^{-6} , 10^{-6} , 3.10^{-7} mol.L⁻¹. Les plantules ayant 2 cotylédons verts sont comptabilisées comme germées (Lefebvre et al., 2006).

4.2.3.1.2 Test de sensibilité à l'ABA La gamme de concentration utilisée est comprise entre 0,1 et 0,4 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, selon le lot de graine. La gamme est ajustée de façon à avoir 100 % de germination pour le sauvage à la première concentration et 0 % à la dernière. Les plantules ayant 2 cotylédons verts sont comptabilisées comme graines germées.

4.2.3.1.3 Test de résistance au chlorure de sodium La gamme de concentration en chlorure de sodium utilisée est la suivante : 50, 100, 150, 200, 250 mmol.L⁻¹. Les plantes dont la racine est visible sont comptabilisées comme germées.

4.2.3.2 Déshydratation rapide

Les plantes sont cultivées en serre environ trois semaines (elles ne doivent pas avoir de hampe florale). Les rosettes sont coupées au collet, placées face abaxiale vers le haut sur un papier absorbant avec un support de feuille d'aluminium, immédiatement pesées sur une balance de précision et placées sous une hotte à flux laminaire, lumière allumée où elles subissent une déshydratation de 4 h 30 au maximum (North et al., 2005). Elles sont pesées régulièrement au cours du stress : la perte de poids correspond à la perte d'eau subie par la plante.

4.2.3.3 Déshydratation physiologique

Après 7 jours de culture *in vitro*, les plantules sont repiquées dans des pots individuels de 5 cm de diamètre, contenant un fond de 9 mL de vermiculite surmonté d'un mélange (1/1, v/v) de sable de la Loire tamisé (maille : 1,1 mm) et de terreau tamisé (maille : 3 mm). Le poids total des pots est ajusté à 50 g et ils sont traités au Trigard (larvicide) 30 min avant repiquage. Les plantes sont

cultivées 3 semaines avec un arrosage régulier dans la serre (voir 4.2.1.2.2). Les 8 plantes les plus homogènes sont sélectionnées. Pour 4 d'entre elles, un arrosage régulier est poursuivi, tandis que l'arrosage est interrompu pour les 4 autres. Les pots sont pesés chaque jour avant l'arrosage afin de suivre leur contenu en eau. Au bout de 7 jours, les pots non arrosés ont perdu 120 % du poids gagné par l'arrosage par rapport au poids ajusté au départ. Les plantes sont alors placées dans des tubes dont les bouchons sont percés, les tubes sont pesés et congelés dans de l'azote liquide. Ils sont enfin lyophilisés à 0,035 mbar (lyophilisateur Christ, Gamma 1-16) pendant 48 h. Aussitôt après la lyophilisation, les tubes sont à nouveau pesés, ce qui permettra de calculer la teneur en eau des plantes.

4.2.3.4 Mesure de la teneur en ABA

La mesure de la teneur en ABA est réalisée sur des rosettes à l'issue d'une déshydratation rapide (voir paragraphe 4.2.3.2). Les rosettes non stressées sont congelées dans de l'azote liquide avant le début de la déshydratation et conservées au congélateur à -80°C , les rosettes stressées sont congelées à la fin des 4 h 30 de déshydratation. Chaque échantillon est composé d'une rosette individuelle. Les tissus sont lyophilisés, pesés puis broyés à froid dans 3 mL d'un solvant d'extraction composé d'acétone, d'eau et d'acide acétique (80/19/1, v/v/v). Cinquante ng d'ABA marqué au deutérium (ABA-D₄, NRC Plant Biotechnology Institute, Canada) sont introduits dans l'échantillon pour évaluer l'efficacité de l'extraction. Les échantillons sont centrifugés 45 min à 5000 g ; le surnageant est conservé, tandis que le culot est resuspendu dans 1 mL de tampon d'extraction et placé 30 min dans un sonicateur pour extraire l'ABA restant, puis de nouveau centrifugé 45 min à 5000 g. Le surnageant récupéré après cette deuxième extraction est ajouté au premier. Le tampon d'extraction est évaporé sous azote puis au speed-vac et le culot est repris dans 150 μL de solvant de chromatographie (acétonitrile, eau et acide acétique, 50/50/0,05, v/v/v), placé 15 min dans le sonicateur et filtré (Whatman-Glass microfibre filters). Dix μL de l'échantillon sont injectés dans le système LC-ESI-MS-MS. Une première étape de chromatographie permet la séparation des constituants extraits, elle s'effectue sur une colonne C18 d'une chaîne HPLC «Alliance» dotée d'un détecteur UV-visible (Waters). Le solvant A contient de l'acétonitrile, de l'eau et de l'acide acétique 95/5/0,5 (v/v/v) et le solvant B de l'eau, de l'acétonitrile et de l'acide acétique 95/5/0,5 (v/v/v). Après injection de l'extrait, l'élution est réalisée à l'aide d'un gradient linéaire du temps 0 où A/B = 30/70 à 12 min où A/B = 62/38 (débit de 150 $\mu\text{L}.\text{min}^{-1}$). De 12 min à 12,5 min, A/B passe à 100/0 (débit de 500 $\mu\text{L}.\text{min}^{-1}$). La colonne est rincée pendant 3,5 min avec A/B = 100/0 (débit de 500 $\mu\text{L}.\text{min}^{-1}$) puis retour aux conditions initiales en 1 min et stabilisation de la colonne pendant 5 min avant l'injection suivante. La détection et la quantification se font par la technique de spectrométrie de masse MS-MS. L'appareil utilisé est un triple quadripôle «Quattro LC» de Micromass (Waters) qui est couplé à l'HPLC, réglé en mode MRM (Multiple Reaction Monitoring) qui permet une quantification très spécifique et très sensible des composés. Le logiciel MassLynx, utilisé avec le programme Quantify, permet ensuite l'analyse des résultats.

4.2.3.5 Réponse de la croissance des rosettes à l'ABA

Les plantules sont repiquées en serre après 7 jours de culture *in vitro*. Après une semaine de culture, les plantes sont pulvérisées tous les 4 jours, soit avec une solution d'éthanol 0,1 % (v/v) (témoins), soit avec la même solution additionnée d'ABA ($100 \mu\text{mol.L}^{-1}$). Le diamètre des rosettes de 4 plantes, pour chaque traitement et génotype, est déterminé à partir de photographies prises après 16 jours de pulvérisations, avec le logiciel Scion Image 1.63 (Freeware, National Institute of Health, USA). Parallèlement, la date de la floraison est notée comme le jour où la hampe florale atteint une hauteur de 1 cm.

4.2.3.6 Observations par thermographie infrarouge

Les graines sont mises à germer pendant deux jours (voir paragraphe 4.2.1.2.1) après trois jours de stratification à 4°C. Elles sont repiquées dans des pots individuels de 8 x 8 x 7 cm, contenant une couche de 18 mL de vermiculite surmontée d'un mélange 50/50 (v/v) de terreau horticole tamisé (maille : 3 mm) et de sable de la Loire tamisé (maille : 1,1 mm), et recouverts d'une couche homogène de 1,5 mL de sable de Fontainebleau qui assure un fond thermique uniforme et de température distincte de celle des plantes (s'il est bien sec) lors de la thermographie. Les plantules sont cultivées dans la serre (voir paragraphe 4.2.1.2.2) pendant 7 jours, puis transférées en enceinte de dessèchement (flux laminaire à 4 m.s^{-1} , 25°C, 50% d'humidité, lumière continue) sans arrosage. Le pot est divisé en 3 secteurs, deux petits pour des témoins chauds et froids (entre 6 et 9 plantules) adaptés à la lignée observée (par exemple sauvage Col-0 et *aba3-1*) et un grand pour le génotype observé (15 plantules). Les observations se font à l'Institut de Sciences du Végétal (CNRS) à l'aide d'une caméra thermique du modèle Thermacam PM 250 (FLIR systems) qui peut mesurer le rayonnement IR compris dans une fenêtre de 3,4 à 5 mm, et ayant une sensibilité de 0,1°C dans la gamme de température utilisée. Les températures mesurées par la caméra sont visualisées sur un écran vidéo où elles sont traduites en fausses couleurs ou en niveaux de gris. Une première observation est effectuée 5 jours après le transfert dans l'enceinte de dessèchement. Après cette observation, les plantes sont arrosées par subirrigation pendant 2 minutes puis remises dans l'enceinte de dessèchement. De nouvelles observations sont effectuées 2 et 3 jours après (sans nouvel arrosage). Ces observations sont l'occasion de confirmer ou d'infirmer les phénotypes constatés la première fois. Si les observations avaient pour fonction une sélection parmi une descendance F₂, les plantes repérées sont ensuite repiquées dans un pot de culture classique et sont cultivées dans la serre.

Pour les observations de feuilles ou rosettes détachées, les plantes sont cultivées dans les conditions normales de la serre. La feuille ou la rosette est coupée et placée sur une feuille de papier sous l'objectif de la caméra dans l'enceinte de dessèchement puis observée pendant 1 à 3 minutes.

4.2.3.7 Mesure de la croissance racinaire

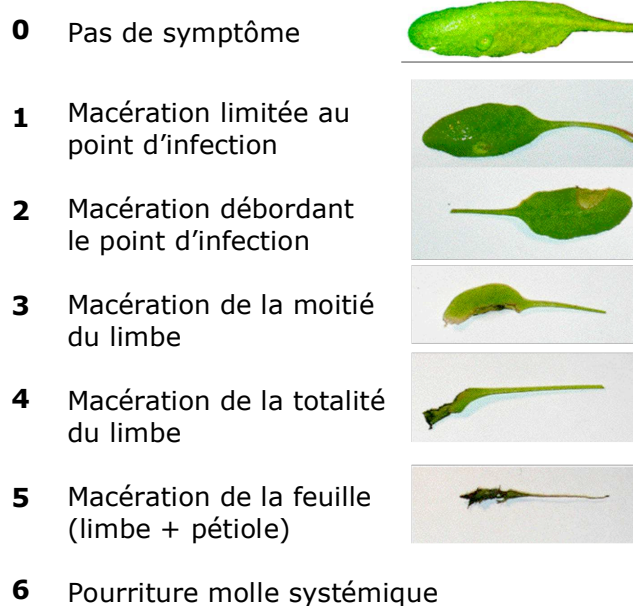
Les graines des génotypes testés sont semées sur le milieu d'Estelle et Somerville (Estelle and Somerville, 1987). Il est composé de KH_2PO_4 à $2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$, MgSO_4 à 2 mmol.L^{-1} , CaCl_2 à 2 mmol.L^{-1} , d'une solution de vitamines diluée 500 fois (myo-inositol 50 mg.L^{-1} , panthoténate de calcium $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$, niacine $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$, pyridoxine $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$, thiamine HCl $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$, biotine

0,05 mg.L⁻¹), d'une solution de micro-éléments diluée 1000 fois (H₃BO₃ 70 mmol.L⁻¹, MnCl₂ 14 mmol.L⁻¹, CuSO₄ 0,5 mmol.L⁻¹, Na₂MoO₄ 0,2 mmol.L⁻¹, NaCl 10 mmol.L⁻¹, ZnSO₄ 1 mmol.L⁻¹, CoCl₂ 0,01 mmol.L⁻¹), de pourpre de bromocrésol à 0,0008 % (p/v), MES à 0,07 %, saccharose à 10 g.L⁻¹, et d'agar à 0,7 % (p/v). Les graines sont laissées à 4°C pendant 4 jours. Après 3 jours de culture *in vitro*, les plantules sont transférées, espacées de 1,5 cm, dans des boîtes carrées (côté de 12 cm, Greiner) à raison de 8 par boîte remplie avec 50 mL de milieu d'Estelle et Somerville (voir ??) dans lequel l'agar Kalys est remplacé par de l'agar Phytoblend (Caisson Laboratories, Inc) à 12 g.L⁻¹. Les boîtes sont placées horizontalement en chambre de culture pendant 1 à 2 jours pour que les racines des plantules s'enfoncent dans le milieu, puis elles sont mises verticalement pendant 11 jours. Les boîtes sont enfin scannées et la longueur de la racine principale est mesurée à l'aide du logiciel Image J.

4.2.3.8 Test de résistance à un pathogène

Ces tests sont réalisés par Yvan Kraepiel au laboratoire des Interactions Plante Pathogènes d'AgroParisTech. Les graines des plantes testées sont semées sur du terreau STmix supplémenté en sable volcanique (BAAN) et stratifiées pendant 2 jours à 4°C. Après 2 semaines de culture (8 h de jour à 24°C, 16 h de nuit à 19°C, hygrométrie 70 %), les plantules sont repiquées dans des pots individuels et cultivées encore trois semaines dans les mêmes conditions. Seize heures avant l'inoculation, les cultures sont fortement arrosées et recouvertes d'un couvercle en plastique afin d'atteindre 100 % d'humidité, ce qui stimule l'ouverture des stomates et donc favorise l'inoculation de la bactérie. La souche bactérienne utilisée est *Erwinia chrysanthemi* 3937 (Kotoujansky et al., 1982). La solution utilisée pour l'infection est concentrée à 5.10⁸ CFU.mL⁻¹ dans du tampon KPO₄ à 50 mmol.L⁻¹, pH 7. Pour inoculer la bactérie, 5 µL de la solution bactérienne sont déposés sur un petit trou réalisé à l'aide d'une aiguille sur une feuille. La progression de l'infection est suivie soit dans les conditions (tempérées) déjà utilisées pour la culture soit dans des conditions tropicales (16 h de jour à 28°C, 8 h de nuit à 25°C) sur 30 plantes ; le couvercle plastique est laissé sur les plantes afin de conserver 100 % d'humidité. Aux jours 1, 2, 3 et 6 ou bien 1, 2, 3, 4 et 7 après l'inoculation, la résistance à la bactérie est évaluée selon la notation décrite dans la figure 4.1.

La sensibilité d'un génotype à la bactérie est évaluée par la répartition sur les 30 plantes des différents degrés de l'infection et son évolution.

FIG. 4.1 – Notation des symptômes de l'infection par *Erwinia chrysanthemi*.

4.2.4 Analyses moléculaires

4.2.4.1 Extraction d'ADN

4.2.4.1.1 ADN génomique végétal

Bas débit (Doyle and Doyle, 1990) Deux à 3 boutons floraux ou 2 petites feuilles de rosette sont congelés dans l'azote liquide et broyés dans un tube eppendorf. Un volume de 750 μL de tampon d'extraction (CTAB 2 % (p/v) NaCl 1,4 mol.L⁻¹, EDTA 20 mmol.L⁻¹ pH 8, Tris-HCl 100 mmol.L⁻¹ pH 8, β -mercaptoéthanol 0,2 % (v/v)) préchauffé à 60°C est ajouté. Après 30 min d'incubation à 60°C, 750 μL de chloroforme/alcool isoamylique (24/1, v/v) sont ajoutés. L'ensemble est agité puis centrifugé à 13000 g pendant 10 min. La phase aqueuse (supérieure) est prélevée et transférée dans un nouvel eppendorf. Les acides nucléiques qu'elle contient sont précipités en ajoutant un dixième du volume aqueux d'acétate de sodium à 3 mol.L⁻¹ et un volume d'isopropanol. Le mélange est agité puis centrifugé 10 min à 13000 g et le culot est lavé par 500 μL d'éthanol à 70 % (v/v). Pour une utilisation en routine de l'ADN (sélection par PCR), le culot est séché sous vide et repris dans 50 μL de TE (Tris-HCl 10 mmol.L⁻¹ pH 8, EDTA 1 mmol.L⁻¹). Pour l'ADN digéré lors d'un Southern blot, le culot séché est repris dans 100 μL de TE et 1 μL de RNase (10 mg.mL⁻¹) et incubé 30 min à 37°C. Le tout est à nouveau précipité et lavé comme précédemment. Le culot séché sous vide est repris dans 50 μL de TE. L'ADN est dilué 10 ou 20 fois selon l'utilisation qui en est faite.

Haut débit (Simon et al., 2008) Pour le génotypage à haut débit (populations de cartographie, sélection de recombinants, sélection de mutants d'insertion), un autre type d'extraction, plus rapide mais avec un rendement réduit (suffisant pour les analyses PCR) est utilisé. Les plantes

sont cultivées sur des plateaux de 96 pots (8 x 12) permettant d'utiliser un système de coordonnées similaire à celui des plaques PCR. Deux feuilles de jeune rosette sont placées dans un des 96 tubes d'une plaque (barettes de 8 tubes, VWR), chacun ayant été préalablement rempli avec deux billes de verre (diamètre 4 mm, VWR). Les plaques sont congelées dans de l'azote liquide (conservées à -80°C si l'extraction n'est pas immédiate) puis les échantillons sont broyés à l'aide du broyeur Qiagen MM300 (3 min à 30 vibrations.s⁻¹) et aussitôt stockées dans l'azote liquide. Après une centrifugation de 5 min à 3000 g (4°C) permettant de sédimenter les broyats au fond des tubes, un volume de 200 µL de tampon d'extraction (SDS 0,5 % (v/v), Tris 200 mmol.L⁻¹ pH 7,5, NaCl 250 mM mol.L⁻¹, EDTA 25 mmol.L⁻¹ pH 8) est ajouté dans chaque tube et la plaque est vortexée uniformément pendant 1 min. Afin de sédimenter les débris végétaux éventuels, la plaque est centrifugée 10 min à 3000 g (4°C) puis 100 µL de surnageant est prélevé et transféré dans une plaque ELISA (96 puits, fond plat, Greiner) dont chaque puits contient 100 µL d'isopropanol. Les acides nucléiques sont laissés à précipiter 10 min à température ambiante puis les plaques sont centrifugées 20 min à 2500 g. Le surnageant est vidé et le culot est rincé avec 100 µL d'éthanol à 75 % (v/v). La plaque est centrifugée 5 min à 2500 g et l'alcool est vidé. Le reste de l'alcool est laissé à évaporer au moins 5 h à température ambiante. Un volume de 50 µL d'eau est ajouté dans chaque puits et la plaque est incubée au moins une heure à 4°C puis vortexée quelques dizaines de secondes pour que l'ADN se resuspende puis centrifugée 1 min à 700 g. L'ADN est dilué au 1/10 dans une plaque PCR (polycarbonate, 96 puits, Thermowell).

4.2.4.1.2 ADN plasmidique bactérien L'extraction est réalisée à l'aide du kit GenElute Plasmid Miniprep (Sigma). Il permet une lyse alcaline au SDS des cellules, suivie d'une adsorption de l'ADN sur membrane de silice en condition de salinité élevée, un lavage des contaminants et une élution avec de l'eau ou du TE. La culture bactérienne utilisée est faite pendant une nuit dans 4 mL de milieu LB contenant de la kanamycine (100 µg.mL⁻¹). Un mL et demi de cette culture est prélevé et centrifugé 1 min à 13000 g. Après élimination du surnageant, le culot est repris dans 200 µL de solution de resuspension, auxquels sont ajoutés 200 µL de solution de lyse (la lyse ne doit pas dépasser 5 min pour ne pas dégrader l'ADN). Les débris cellulaires sont précipités par 350 µL de solution de neutralisation et sédimentés par 10 min de centrifugation à 12000 g. Chaque étape de la purification sur colonne est suivie d'une centrifugation d'1 min à 12000 g. La colonne est équilibrée avec 500 µL de solution de préparation. Le surnageant du lysat est passé sur la colonne, puis la colonne est lavée d'abord avec 500 µL de solution de lavage optionnel, puis avec 750 µL de solution de lavage. La colonne est centrifugée à nouveau 2 min pour éliminer tout l'éthanol. Finalement, l'ADN est élué avec 100 µL de solution d'élution.

4.2.4.2 Amplification d'ADN par PCR

La réaction de PCR (Polymerase Chain Reaction : amplification en chaîne par polymérase) permet d'amplifier de façon spécifique, *in vitro*, une séquence d'ADN génomique, plasmidique ou d'ADNc.

La réaction est en général menée dans un volume de 20 µL, composé de 0,8 µL d'un mélange à 5 mmol.L⁻¹ des 4 désoxynucléotides triphosphates, 0,8 µL de chaque oligonucléotide encadrant la

région à amplifier (Sigma) à $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$, $2 \mu\text{L}$ de tampon 10X (KCl 100 mmol.L^{-1} , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 100 mmol.L^{-1} , Tris-HCl 200 mmol.L^{-1} , MgSO_4 20 mmol.L^{-1} , Triton X-100 0,1 % (v/v), pH 8,8), $0,05 \mu\text{L}$ d'ADN polymérase thermostable (*Taq* DNA polymerase, Biolabs, 5000 U.mL^{-1}), $5 \mu\text{L}$ d'ADN matrice dilué à environ $5 \text{ ng}/\mu\text{L}$ et de l'eau stérile pour compléter à $20 \mu\text{L}$.

Les microtubes de $0,2 \text{ mL}$ (Axygen) ou les microplaques de 96 tubes (VWR) contenant les produits de réaction sont placés dans un thermocycleur programmable (2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems). La réaction de PCR est constituée d'une première phase de dénaturation de 2 min, puis de 30 à 40 cycles successifs comprenant 3 étapes distinctes :

1. dénaturation de l'ADN à 94°C pendant 15 s
2. hybridation des oligonucléotides sur la matrice pendant 15 à 30 s, à une température dépendant de la taille et de la teneur en GC de l'amorce
3. élongation par l'ADN polymérase à 72°C (environ 60 s pour 1 kb)

La réaction s'achève par une étape de terminaison des élongations en cours à 72°C pendant 2 min. La température est enfin abaissée à 15°C pendant 10 min.

4.2.4.2.1 Oligonucléotides utilisés pour la PCR Plusieurs séries d'amorces ont été utilisées :

1. des oligonucléotides permettant d'amplifier des séquences contenant des microsatellites polymorphes ou des SNP entre Col-0 et *Ler* pour la cartographie (voir annexe 1)
2. les oligonucléotides utilisés pour la RT-PCR, la détection d'insertion et l'amplification de sondes dans le gène At5g61140 (tableau 4.1).

4.2.4.3 Electrophorèse d'ADN

L'ADN migre dans des gels d'agarose purifié (Eurobio), de concentration variable (de 0,8 à 3 % (v/v)) selon la taille des fragments, fondu dans du TBE 0,5 X (Tris 50 mmol.L^{-1} , acide borique 45 mmol.L^{-1} , EDTA $0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$). L'addition de bromure d'éthidium ($0,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ final), un agent intercalant fluorescent qui se fixe à l'ADN permet de visualiser l'ADN sous UV. Les échantillons déposés sur le gel sont au préalable mélangés en proportion variable (de 2/5 à 1/5 (v/v)) à du bleu de charge (bleu de bromophénol 0,25 % (p/v), additionné de xylène cyanol 0,25 % (p/v), de glycérol 30 % (v/v) et d'EDTA 50 mmol.L^{-1}) ou d'une solution identique en composition sans les colorants. La migration s'effectue à 135 V dans une solution de TBE 0,5 X : dans ces conditions, les fragments d'ADN, chargés négativement, migrent vers l'électrode positive à une vitesse dépendant de leur taille et de la concentration en agarose utilisée. Lorsque c'est nécessaire, un marqueur de poids moléculaire (1 kb ladder, Invitrogen) est également déposé afin d'estimer la taille des fragments.

Nom	Séquence
RT For 1	CCTCATGTGAAAGCGAATCTG
RT Rev 1	CACCAAGAACCAACCACCACG
RT For 2	GCTGGGGATCTGCTGGATCTTG
RT Rev 2	CTGTCTGAAATATGCGACTCTG
For C'	GAGGCGCTAGTTGCTCGG
Rev C	CGGCGGCGAGATCATTCT
For J	CCTCCAGGCCATGATTGA
Rev J'	CGCTTCGTCTTTCACCTA
For C	CTGTTCTACATGAGGTAAG
Rev C'	CATGGTCAAGACGTTACC
SIG LB1	CGGAACCACCATCAAACAG
For I1	CGCCAAAACCGTAAAATC
Rev I	GGACACTACCTGCATGAC
For I2	GACATCCATTGCTCCAGG
Rev I'	GCAGGGAAGTTTTCGGTTAC
For H'	ACGAACCATTCCCCGTAGA
For I	GGTTTCTAACCCTGCCCT
Rev I'	GGTGGAATAGCGATTTCTAT
Rev I2	TGAATGATGTTTGTTTCG
Rev J	CACATTTACCTTAAGCTCTTC
For S	GCATATCTTGGCTGGGCTT
Rev S	GGATTTTTGTTTCATTCTTCAG

TAB. 4.1 – Oligonucléotides utilisés pour l'étude du gène At5g61140

4.2.4.4 Quantification de l'ADN

Les fragments d'ADN à séquencer doivent être préalablement quantifiés. Pour cela 5 μL d'un marqueur de poids moléculaire dont les 14 bandes sont quantifiées (smartladder, EurogenTech) est déposé sur le gel à côté d'une fraction de l'échantillon d'ADN. L'intensité de la bande d'intérêt est comparée à l'intensité de la bande de l'échelle de poids moléculaire dont la taille est la plus proche.

4.2.4.5 Séquençage d'ADN

L'ADN à séquencer est d'abord amplifié par PCR, puis purifié afin de le débarrasser de l'excès des réactifs de la PCR. La purification est réalisée à l'aide du kit Wizard SV Gel and PCR clean-up System (Promega) utilisant une membrane qui lie l'ADN. Un volume égal à celui de la réaction de PCR de Membrane Binding Solution (isothiocyanate de guanidine 4,5 mol.L^{-1} , acétate de sodium 0,5 mol.L^{-1} , pH 5) est ajouté et le tout est transféré sur une colonne. Après une incubation de 1 min à température ambiante et une centrifugation à 13000 g de 1 min, l'ADN va se fixer à la membrane de la colonne. L'ADN fixé subit deux lavages successifs, avec 700 μL puis 500 μL de Wash Solution (acétate de potassium 10 mM, pH 5, EDTA 16,7 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, pH 8, éthanol 80 % (v/v)), le premier suivi d'une centrifugation d'une minute et le deuxième de 5 min (13000 g). Pour s'assurer que tout l'éthanol a bien été évacué, une nouvelle centrifugation de 1 min (13000 g) est effectuée. La colonne est ensuite transférée dans un tube eppendorf propre afin de récupérer l'ADN après son élution,

obtenue en ajoutant 50 μL d'eau « nuclease free » sur la membrane et en centrifugeant le tout une minute (13000 g) après une minute d'incubation.

L'ADN purifié est ensuite utilisé comme matrice pour réaliser une réaction de séquençage par PCR. Trente ng d'ADN à séquencer, ramenés à un volume de 14,5 μL , sont mélangés à 3,5 μL de tampon 5 X (Tris-HCl 400 mmol.L⁻¹, pH 9, MgCl₂ 10 mmol.L⁻¹), 1 μL de BDT (Big Dye Terminator mix, Applied Biosystems, tampon contenant la Taq, les dNTPs et les ddNTPs couplés à des fluorochromes) et 1 μL d'une amorce s'hybridant sur la région à séquencer, afin de générer une matrice simple brin. La réaction de PCR est constituée de 25 cycles successifs composés des trois étapes suivantes :

1. dénaturation de l'ADN à 96°C pendant 30 s
2. hybridation des oligonucléotides sur la matrice à 50°C pendant 5 s
3. élongation du brin néosynthétisé à 60°C pendant 4 min

La réaction s'achève par un abaissement de la température à 4°C pendant 10 min.

Les nouveaux produits PCR sont ensuite précipités en ajoutant 20 μL d'eau stérile et 60 μL d'isopropanol. Après 15 min de précipitation à température ambiante, les tubes sont centrifugés à 13000 g pendant 30 min, puis les culots d'ADN sont lavés avec 200 μL d'éthanol à 70 % (v/v). L'éthanol résiduel est ensuite éliminé en centrifugeant les tubes à l'envers pendant 1 min à 700 g. Enfin, les ADN sont repris dans 20 μL de formamide pendant 24 h avant d'être analysés par le séquenceur (ABI Prism 310 Genetic Analyser, Applied Biosystems).

4.2.4.6 Analyse de l'expression des gènes

4.2.4.6.1 Extraction d'ARN pour l'analyse en RT-PCR quantitative Les ARN sont extraits en utilisant le protocole du kit GenElute Mammalian Total RNA (Sigma) auquel est ajoutée une étape de traitement à la DNase (Qiagen). Les tissus utilisés (environ 50 mg de poids frais) sont congelés dans l'azote liquide avant d'être broyés, puis 350 μL de tampon de lyse additionné de β -mercaptoéthanol 1% (v/v) sont ajoutés afin d'extraire les ARN des cellules. Le tout est ensuite filtré sur une colonne qui retient les débris cellulaires, et 350 μL d'éthanol 70 % (v/v) sont alors ajoutés au filtrat qui est passé sur une seconde colonne. Cette étape permet la précipitation puis la fixation des ARN sur la colonne de silice à haute capacité. Un premier lavage avec 250 μL de wash solution 1 est réalisé, immédiatement suivi du traitement à la DNase (RNase-free DNase Set, Qiagen) : chaque échantillon est traité par un mélange de 10 μL de DNase et de 70 μL de RDD (RNase-free DNA Digest Buffer) pendant 15 min à température ambiante. Les ARN sont lavés une seconde fois avec 250 μL de wash solution 1, puis avec 500 μL de wash solution 2. Ils sont enfin élués avec 50 μL de tampon d'élution.

4.2.4.6.2 Extraction d'ARN pour l'analyse transcriptomique Après une semaine de culture *in vitro*, les plantes sont cultivées un mois dans une chambre de culture en jour court (8 h de jour, 16 h de nuit, 21°C, hygrométrie 70 %). Les rosettes de 6 plantes (pour un échantillon) par génotype sont coupées et aussitôt congelées dans l'azote liquide, puis conservées à -80°C avant d'être broyées

dans un mortier dans de l'azote liquide; les échantillons sont stockés à nouveau à -80°C . Le protocole, mis au point à l'URGV (unité de recherche en génomique végétale) où est faite l'analyse, nécessite l'utilisation d'un kit différent de celui utilisé en routine (voir paragraphe 4.2.4.6.1) : c'est le RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). Pour lyser les cellules, $450\text{ }\mu\text{L}$ de tampon RLT additionné de β -mercaptoéthanol 1 % (v/v) sont ajoutés à 15 mg de poudre végétale congelée. Le tout est vortexé et incubé à 56°C pendant 2 min. Le lysat est transféré sur une colonne qui permet de filtrer les débris cellulaires et qui est centrifugée 2 min à 13000 g. Les ARN sont précipités avec $225\text{ }\mu\text{L}$ d'éthanol à 95 % (v/v) et fixés à la membrane de silice d'une nouvelle colonne après 15 s de centrifugation à 13000 g. Les ARN sont lavés avec $350\text{ }\mu\text{L}$ de tampon RW1 (centrifugation 15 s à 13000 g) puis immédiatement traités à la DNase (RNase-free DNase Set, Qiagen) : sur chaque échantillon est déposé un mélange de $10\text{ }\mu\text{L}$ de DNase et de $70\text{ }\mu\text{L}$ de RDD (RNase-free DNA Digest Buffer) pendant 15 min à température ambiante. Les ARN sont lavés une seconde fois avec $350\text{ }\mu\text{L}$ de tampon RW1 (centrifugation 15 s à 13000 g). La colonne est lavée deux fois avec $500\text{ }\mu\text{L}$ de tampon RPE (15 s puis 2 min de centrifugation à 13000 g). Les ARN sont élués avec deux fois $25\text{ }\mu\text{L}$ d'eau RNase-free.

4.2.4.6.3 Electrophorèse et quantification d'ARN La qualité des ARN extraits est vérifiée par dépôt d'une fraction de $2\text{ }\mu\text{L}$ de l'échantillon, additionnés de $3\text{ }\mu\text{L}$ d'eau et de $5\text{ }\mu\text{L}$ de bleu de charge ($625\text{ }\mu\text{L.mL}^{-1}$ de formamide désionisée, $188\text{ }\mu\text{L.mL}^{-1}$ de formaldéhyde 37 % (p/v), $100\text{ }\mu\text{L.mL}^{-1}$ de MOPS $0,2\text{ mol.L}^{-1}$ dans de l'acétate de sodium $0,05\text{ mol.L}^{-1}$ additionnée d'EDTA $0,01\text{ mol.L}^{-1}$, pH 7, $67\text{ }\mu\text{L.mL}^{-1}$ de glycérol, $37\text{ }\mu\text{L.mL}^{-1}$ de bleu de bromophénol et xylène cyanol à 2 % (p/v), $5\text{ }\mu\text{L.mL}^{-1}$ de bromure d'éthidium à 10 mg.mL^{-1}) sur gel d'agarose 0,2 % (p/v) après une dénaturation de 10 min à 70°C . En vue d'une analyse par RT-PCR, qui nécessite l'utilisation de $5\text{ }\mu\text{g}$ d'ARN dans un volume de $10\text{ }\mu\text{L}$, ou pour vérifier qu'il y a suffisamment d'ARN pour l'analyse transcriptomique, la quantité d'ARN est évaluée au spectrophotomètre (NanoDrop spectrophotometer ND-1000, Thermo Scientific).

4.2.4.6.4 Transcription inverse La rétrotranscription des ARN en ADNc à l'aide du kit Superscript II RNase H-Reverse Transcriptase (Invitrogen) se décompose en 4 étapes. La première consiste à dénaturer les structures secondaires formées par les ARN. Un mélange composé des matrices d'ARN et de $1\text{ }\mu\text{L}$ d'oligo dT ($500\text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$), qui sert d'amorce à la synthèse du premier brin, est incubé 10 min à 70°C puis immédiatement placé dans la glace. Le premier brin peut alors être synthétisé : au mélange précédent est ajouté $1\text{ }\mu\text{L}$ de RNase Out ($40\text{ U.}\mu\text{L}^{-1}$) pour inhiber les RNases, $4\text{ }\mu\text{L}$ de tampon 5 X (Tris-HCl 250 mmol.L^{-1} pH 8,3, KCl 375 mmol.L^{-1} , MgCl_2 15 mmol.L^{-1}), $1\text{ }\mu\text{L}$ de dNTPs (10 mmol.L^{-1}) et $2\text{ }\mu\text{L}$ de DTT ($0,1\text{ mol.L}^{-1}$). Le milieu réactionnel est préchauffé pendant 2 min à 42°C puis la synthèse du premier brin débute lorsque $0,2\text{ }\mu\text{L}$ de la reverse transcriptase SuperScript II ($50\text{ U.}\mu\text{L}^{-1}$) est ajouté. Cette réaction dure 50 min à 42°C . Elle est ensuite stoppée en plaçant les échantillons 15 min à 70°C . La dernière étape consiste à dégrader les matrices d'ARN en traitant par $1\text{ }\mu\text{L}$ de RNase H ($2\text{ U.}\mu\text{L}^{-1}$) pendant 20 min à 37°C .

4.2.4.6.5 Quantification des ADNc par PCR quantitative Comme pour une PCR classique, la quantité de produit d'amplification augmente de façon exponentielle car le nombre de

copies est doublé à chaque cycle. Un plateau est atteint quand les produits nécessaires à la polymérisation deviennent limitants (dNTP, amorces). La courbe de la quantité de produit d'amplification en fonction du temps est une sigmoïde, mesurable ici en temps réelle par fluorométrie grâce à la sonde SYBR Green qui produit une fluorescence proportionnelle à la quantité d'ADN bicaténaire présente dans l'échantillon. Au voisinage du point d'inflexion de la sigmoïde, la quantité de produits d'amplification dépend principalement de la quantité de matrice présente initialement dans l'échantillon. Le nombre de cycles nécessaires pour atteindre ce point d'inflexion donne accès à une quantification de l'ADNc initialement présent, lorsqu'on le compare à celui d'un standard tel que l'ADNc du gène EF A4 (exprimé constitutivement et au même niveau dans toute la plante, à tous les stades de développement et dans toutes les conditions de culture) mesuré en parallèle. La courbe de fusion du produit de la réaction est déterminée par une montée à 95°C puis 30 s d'incubation à 65°C et la mesure de la décroissance de la fluorescence au cours de la montée lente en température de 65 à 95°C (0,1°C.s⁻¹). Cette courbe de fusion permet de déterminer la température de demi-dénaturation (T_m) qui est spécifique du produit amplifié. Le kit LightCycler DNA Master SYBR Green I (Roche) est utilisé. Le milieu réactionnel de 20 µL contient 5 µL d'ADNc (une dilution au 1/50 du produit de la RT-PCR), 1 µL de chaque amorce (10 mmol.L⁻¹), 2,4 µL de MgCl₂ 25 mmol.L⁻¹ et 2 µL de tampon FastStart Master SYBR Green (Roche). La réaction d'amplification se compose de 8 min de dénaturation et d'activation de la Taq à 95°C et d'un cycle répété 45 fois : 10 s de de dénaturation à 95°C, 4 s d'incubation à 59°C et 4 s d'élongation à 72°C.

Les couples d'amorces utilisés sont choisis par rapport à leur efficacité d'amplification. Celle-ci est déterminée à l'aide d'une gamme de dilution d'un ADNc standard sur laquelle la paire d'oligos est testée. La linéarité de la gamme doit être retrouvée par la quantification et l'efficacité d'amplification calculée grâce à la pente de la régression linéaire obtenue doit être assez proche de celle des amorces utilisées pour amplifier EF A4.

Les amorces utilisées pour amplifier l'ADNc correspondant au gène étudié ne doivent pas permettre l'amplification de l'ADN génomique, c'est pourquoi on les choisit de façon que la séquence d'ADN génomique qu'elles encadrent soit trop longue pour être amplifiée (voir tableaux 4.2 et 4.3)

Gène	Amorce For	Amorce Rev
<i>COR15A</i>	GCAACATCCTCGATGACCTCAACG	AGCTTCTTTACCCAATGTATCTGCGG
<i>ERD1</i>	AGAGCTGTGAAGAGGTCCCG	CCAATCTCAGCATGGATTCTTCCG
<i>RD29A</i>	CCGGTCTCTCTGCTTTCTGG	CCACTAAGATAGTCTGAAACAGCCGA
<i>RD22</i>	CGTCAGGGGCTGTTTCCACTGAG	AGTAGAACACCGCGAATGGGTA
<i>RD29B</i>	CTTCTTGCTTTCACCCTTGGTGT	TGTCAGGGTTGTATCCGACCTT
<i>EF1αA4</i>	CTTCTTGCTTTCACCCTTGGTGT	TGTCAGGGTTGTATCCGACCTT

TAB. 4.2 – Oligonucléotides utilisés pour la PCR quantitative

Gène	longueur ADNc	longueur génomique
<i>COR15A</i>	152 pb	408 pb
<i>ERD1</i>	149 pb	239 pb
<i>RD29A</i>	150 pb	258 pb
<i>RD22</i>	146 pb	234 pb
<i>RD29B</i>	148 pb	248 pb
<i>EF A4</i>	148 pb	248 pb

TAB. 4.3 – Taille des fragments d’ADNc et génomique amplifiés par les couples d’amorces utilisés pour la PCR quantitative

4.2.4.6.6 Analyse transcriptomique L’intégrité des ARN extraits par le kit Qiagen a été vérifiée par le bioanalyseur Agilent 2100 (Agilent Technologies). L’hybridation des puces Affymetrix a été réalisée à la plate-forme Transcriptome Affymetrix de l’URGV par Sandrine Balzergue. Un μg d’ARN est utilisé pour synthétiser des ARNc marqués à la biotine à l’aide du One-cycle cDNA synthesis kit (Affymetrix, Santa Clara, CA) qui permet d’obtenir des ADNc qui peuvent ensuite être transcrits *in vitro* en ARNc contenant des UTP marqués à la biotine. Après purification par le Sample Cleanup Module (Affymetrix) et quantification (RiboGreen RNA Quantification Reagent, Turner Biosystems), 15 μg d’ARNc marqués sont fragmentés puis hybridés à la puce (Affymetrix GeneChip Arabidopsis genome array). Celle-ci contient 22500 sets de sondes, représentant plus de 24000 gènes. Elle est ensuite lavée et révélée dans une station GeneChip Fluidics 450 (Affymetrix) pour finir par être scannée par le scanner GeneChip 3000 7G piloté par le logiciel GeneChip Operating Software (GCOS). Les données sont normalisées avec l’algorithme gcrma (Irizarry et al., 2003) implémenté sous R et disponible sous Bioconductor. La détermination des gènes différentiellement exprimés a été réalisée par un test T de Student en deux groupes. La variance de l’expression des gènes par groupe est considérée comme homoscedastique (variance commune pour tous les gènes) et les gènes avec une trop forte ou une trop faible variance ont été éliminés de l’analyse. Les p -value de chaque gène sont calculées par la méthode de Bonferroni avec un contrôle des faux-positifs par la méthode FWER (Family Wise Error State). Un gène est considéré comme exprimé différentiellement si sa p -value est inférieure à 0,05.

4.2.4.7 Analyse de Southern

Cette méthode repose sur la reconnaissance par une sonde, constituée d’un fragment d’ADN du gène étudié marqué radioactivement, de produits de digestion par des enzymes à faible probabilité de coupure, permettant d’établir un profil lié à la présence des sites de digestion autour de la séquence choisie comme sonde.

4.2.4.7.1 Amplification des fragments par PCR Les fragments sont amplifiés à partir d’ADN génomique à l’aide de la Phusion high fidelity DNA polymerase (Ozyme) qui permet d’obtenir des amplifications avec des extrémités franches et possède un système de correction des erreurs d’élongation, puis purifiées avec le kit Wizard SV Gel and PCR clean-up System (Promega) (voir paragraphe 4.2.4.5).

4.2.4.7.2 Clonage des fragments

Vecteur Le plasmide pCR-BluntII-TOPO (Invitrogen) de 3,5 kb a été utilisé pour cloner les fragments d'ADN génomique qui seront utilisés comme sondes. Il porte des gènes de résistance à la kanamycine et à la zéocine, une origine de réplication pUC, et un site de clonage TOPO qui permet le clonage de produits PCR à extrémités franches.

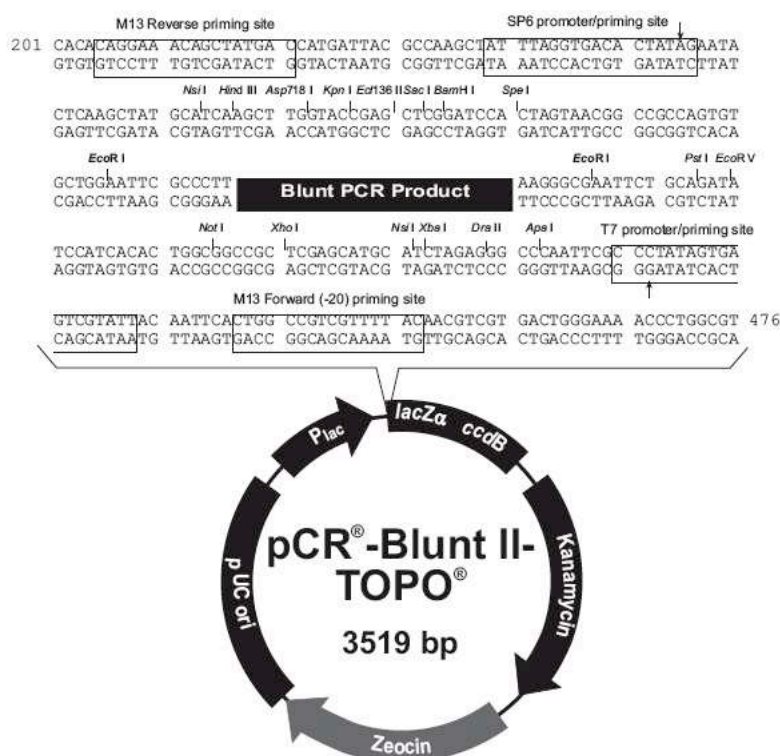


FIG. 4.2 – Plasmide utilisé pour le clonage des fragments d'ADN génomique amplifiés par PCR

Clonage des fragments dans le vecteur Les sondes purifiées sont ensuite clonées à l'aide du kit pCR-BluntII-TOPO (Invitrogen). Un à 2 μL de la sonde purifiée sont mélangés à 1 μL de la solution saline fournie diluée 4 fois, 1 μL de pCR-BluntII-TOPO et de l'eau pour compléter à 6 μL . Le tout est laissé à incuber 1 h à température ambiante.

Souche bactérienne La souche électrocompétente DH10B d'*Escherichia coli* utilisée pour la transformation avec le plasmide pCR-BluntII-TOPO a pour génotype : F⁻, mcrA, $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$, $\Phi80dlacZM15$, $\Delta lacW74$, deoR, recA1, endA1, araD139, $\Delta(ara, leu)7697$, galU, gal/K, λ , rspL, nupG (GibcoBRL).

Préparation des bactéries électrocompétentes Une culture bactérienne est réalisée sous agitation rotative à 180 rpm dans 3 x 500 mL de milieu LB inoculé par 1 mL d'une préculture de 5 mL d'*E. coli*. Lorsque la culture est en phase exponentielle de croissance (DO_{600 nm} environ

0,4), les bactéries sont centrifugées (6000 g, 10 min, 4°C) et les culots obtenus sont repris dans 500 mL d'une solution stérile aqueuse de glycérol à 10 % (v/v) à 4°C. Cette étape est répétée 4 fois dans des conditions de centrifugation identiques, les culots bactériens étant repris dans des volumes décroissants de glycérol 10 % (v/v) (250 mL, 125 mL, 5 mL puis 1 mL). Les bactéries sont ensuite aliquotées en microtubes par 10 μ L et stockées à -80°C avant utilisation.

Transformation des bactéries par électroporation La transformation des bactéries par le plasmide recombiné est réalisée par un choc électrique. Dans une cuve à électroporation de 1 mL, 3 μ L de plasmide sont mélangés à 10 μ L d'eau et 10 μ L de bactéries électrocompétentes. La cuve est ensuite placée dans un électroporateur (Gene Pulser II System, Bio-Rad) où une tension de 1,25 kV lui est appliquée. Après ajout de 750 μ L de LB destiné à favoriser la croissance des bactéries, celles-ci sont transférées dans un tube de 13 mL, qui est mis à incuber sous agitation rotative à 37°C pendant 1 h. Les bactéries transformées sont ensuite étalées sur du milieu LB additionné de kanamycine (100 μ g.mL⁻¹) et incubées de 16 à 24 h. Une PCR sur colonie avec les oligos utilisés pour amplifier la sonde permet de sélectionner une colonie portant un vecteur dans lequel la sonde est clonée. Cette colonie est reprise dans 4 mL de milieu LB additionné de kanamycine (100 μ g.mL⁻¹) et mise à incuber sous agitation rotative à 37°C entre 10 et 24 h.

4.2.4.7.3 Purification des sondes L'ADN plasmidique est extrait des bactéries (voir paragraphe 4.2.4.1.2), puis digéré 2 h à 37 °C par l'enzyme *Eco*RI (10 U. μ L⁻¹ Invitrogen), des sites de coupure *Eco*RI entourant le site où est clonée la sonde (figure 4.2.4.7.2). La digestion est faite dans un volume de 30 μ L, comprenant 5 μ L de plasmide extrait, 3 μ L de tampon R_{EA}ct 3 (Invitrogen) et 1 μ L d'enzyme *Eco*RI. La sonde est ensuite purifiée sur gel avec le kit Wizard SV Gel and PCR clean-up System (Promega) : l'intégralité des produits de digestion est déposée sur un gel. Après migration et visualisation aux UV, la bande dont la taille correspond à celle de la sonde est excisée du gel et transférée dans un tube eppendorf. La bande d'agarose est pesée afin de déterminer le volume de Membrane Binding Solution à ajouter (10 μ L pour 10 μ g de gel). Le tout est ensuite incubé à 50°C jusqu'à dissolution complète de l'agarose. La suite du protocole est similaire à celui décrit au paragraphe 4.2.4.5 à partir de l'application sur la colonne. Après élution, les acides nucléiques sont précipités avec 100 μ L d'éthanol 95 % (v/v) et 5 μ L d'acétate de sodium 3 mol.L⁻¹ pendant une heure à -20°C. Les tubes sont ensuite centrifugés 30 min à 13000 g, puis le culot est lavé deux fois avec 500 μ L d'éthanol 70 % (v/v) et séché au speed-vac, et enfin repris dans 30 μ L d'eau.

4.2.4.7.4 Radiomarquage des sondes Les sondes purifiées sont marquées par l'isotope radioactif ³²P du phosphore à l'aide du kit Prime-a-gene Labeling System (Promega). La technique utilisée est celle du « random priming » qui consiste à mettre le fragment d'ADN à marquer (dénaturé par une incubation de 2 min à 100°C) en présence du fragment de Klenow (sous-unité de l'ADN polymérase I dépourvue d'activité nucléasique 5'→3'). Des amorces hexanucléotidiques aléatoires qui se fixent à l'ADN dénaturé servent de départ à la synthèse du brin complémentaire par le fragment de Klenow à partir des 4 désoxyribonucléotides dont l'un est radioactif. Le mélange réactionnel de 50 μ L contient 25 ng d'ADN, 10 μ L de tampon de marquage, 400 μ g.mL⁻¹ de BSA,

20 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de dATP, dTTP, dGTP non marqués, 333 nmol.L^{-1} de dCTP marqué (soit 50 μCi de radioactivité) et 100 U.mL^{-1} de fragment de Klenow. Il est laissé à incuber une heure à température ambiante. La sonde doit ensuite être purifiée pour éliminer les nucléotides marqués non incorporés. Cela est fait à l'aide des colonnes illustra MicroSpin G-50 (GE Healthcare). Après agitation au vortex la colonne est centrifugée 1 min à 735 g. Elle est mise dans un tube propre, puis le mélange contenant la sonde marquée est appliqué sur le gel. La colonne est enfin centrifugée 2 min à 735 g : l'éluat contient la sonde marquée purifiée. Celle-ci est finalement dénaturée par 5 μL de soude 3 mol.L^{-1} pendant 5 min.

4.2.4.7.5 Digestion de l'ADN génomique L'ADN génomique est obtenu par l'extraction au CTAB (voir paragraphe 4.2.4.1.1) avec l'étape de RNase. Il est quantifié au spectrophotomètre (NanoDrop spectrophotometer ND-1000, Thermo Scientific). La réaction de digestion est menée dans 50 μL contenant 1 μg d'ADN, 1,25 μL de spermidine, 5 μL du tampon adapté à l'enzyme et 1 μL d'enzyme. Le tout est incubé pendant 16 h à 37°C. Les produits de restriction sont précipités par 100 μL d'éthanol à 95 % (v/v) et 5 μL d'acétate de sodium pendant une heure à -20°C. Après une heure de centrifugation à 13000 g (4°C) le culot est lavé deux fois par 500 μL d'éthanol 70 % (v/v), séchés au speed-vac et repris dans 10 μL d'eau et 2 μL de bleu de charge. Ce mélange est déposé sur un gel d'agarose 0,8 % (p/v) dans du TBE 1 X en présence de 15 μL de marqueur de poids moléculaire (1 kb ladder, Invitrogen). La migration à 35 V dure au minimum 16 h. Le gel est visualisé sous UV afin de vérifier que l'ADN est correctement digéré et a suffisamment migré.

4.2.4.7.6 Transfert de l'ADN sur la membrane L'ADN digéré est transféré du gel sur une membrane de nylon chargée positivement (GeneScreen Plus, NEN) qui constituera le support d'hybridation. Avant le transfert, les ADN sont dépurinés par une incubation du gel dans un bain d'HCl 0,25 mol.L^{-1} pendant 15 min. Après un rinçage, le gel est transféré pendant 30 min dans un bain de soude 0,4 mol.L^{-1} qui permet de dénaturer l'ADN. Afin de conserver cet état de dénaturation, le transfert se fait en milieu alcalin. Pour pouvoir transférer l'ADN d'un même gel sur deux membranes à la fois le gel est recouvert sur chacune de ses faces par (dans cet ordre) (figure 4.3) :

1. une membrane taillée un peu plus grand que le gel
2. deux feuilles de papier de 3 mm d'épaisseur (chromatography paper, Whatman) imbibées de soude 0,4 mol.L^{-1} , également un peu plus grandes que le gel
3. 6 cm de papier absorbant

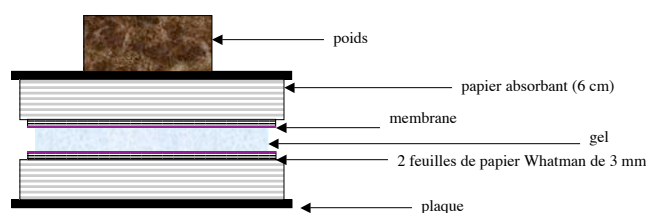


FIG. 4.3 – Montage pour le transfert de l'ADN du gel sur les membranes

Cette superposition est recouverte d'une plaque surmonté d'un poids qui permet un bon contact entre toutes les couches. Le phénomène de capillarité permet à la soude de migrer du gel vers le papier absorbant, entraînant avec elle l'ADN jusqu'à la membrane. Une nuit suffit pour que tout l'ADN se soit fixé sur les membranes. Celles-ci sont alors rincées par deux bains successifs dans du SSC 1 X.

4.2.4.7.7 Hybridation de la membrane A l'aide de pinces plates, la membrane est placée dans un tube de verre rempli de 13 mL de tampon Church et collée à la paroi. Le tube est mis au four à 62°C pendant au moins 2 h. Le tampon Church est ensuite renouvelé et la sonde marquée dénaturée est introduite dans le tube. L'hybridation est réalisée à 58°C pendant 24 h. Les associations aspécifiques sonde-ADN sont éliminées par deux lavages successifs : d'abord 15 min au LAV I (2 X SSC, 0,1 % SDS (v/v)) puis 5 min au LAV II (0,2 X SSC, 0,1 % SDS (v/v)). La membrane est ensuite séchée et emballée dans du film plastique.

4.2.4.7.8 Autoradiographie de la membrane La membrane est placée à -80°C au contact d'un film photographique (Biomax MS film, Kodak) entre deux écrans amplificateurs. Après plusieurs jours d'exposition le film est révélé.

4.2.4.8 Mise en évidence de la mutation *aba3-1* par marqueur dCAPS

Un marqueur *dCAPS* (derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) a été mis au point afin de pouvoir reconnaître des plantes portant la mutation *aba3-1* à l'état hétérozygote ou homozygote, de plantes sauvages au locus *ABA3*. Le site de restriction de l'enzyme *XmaI* est introduit dans la séquence sauvage par PCR avec une amorce « For » dégénérée pour deux nucléotides juste avant la mutation *aba3-1* (changement d'un G en A) de telle sorte que le mutant ne portera pas la séquence reconnue par l'enzyme. Le fragment obtenu après la PCR sur de l'ADN sauvage sera donc digéré par l'enzyme mais pas celui venant d'ADN portant la mutation *aba3-1*, générant une différence de taille de 20 pb entre les deux fragments après digestion, visible par migration sur un gel à 3 % d'agarose (p/v). Cette technique permet de reconnaître des plantes hétérozygotes pour *aba3-1*, pour lesquelles les deux bandes correspondant à de l'ADN sauvage et de l'ADN *aba3-1* seront visibles.

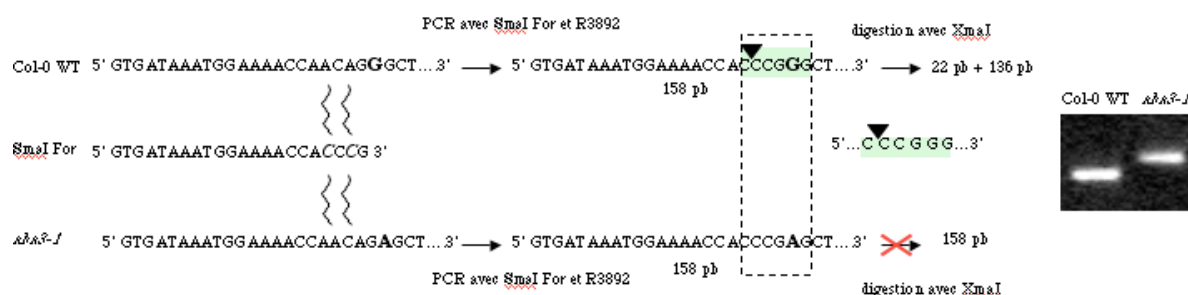


FIG. 4.4 – Principe du dCAPS

(tableau 4.4). Cinq μL de ce produit PCR sont ensuite digérés pendant 2 h à 37°C avec 2 μL de tampon NEB4 (Biolabs), 2 μL de BSA et 0,5 μL d'enzyme *Xma*I (Biolabs) dans un volume de 20 μL .

Nom	Séquence
<i>Sma</i> I For	GTGATAAATGGAAAACCACCCG
R3892	GCAGCAAGTCGAAAATGAGC

TAB. 4.4 – Amorces utilisées pour le dCAPS

Bibliographie

- Abe H, Urao T, Ito T, Seki M, Shinozaki K, et al. (2003) Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *The Plant Cell* 15 : 63–78, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12509522>, pMID : 12509522.
- Abe H, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao T, Iwasaki T, Hosokawa D, et al. (1997) Role of arabidopsis MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression. *The Plant Cell* 9 : 1859–68, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9368419>, pMID : 9368419.
- Ache P, Becker D, Ivashikina N, Dietrich P, Roelfsema MR, et al. (2000) GORK, a delayed outward rectifier expressed in guard cells of *Arabidopsis thaliana*, is a K(+)-selective, K(+)-sensing ion channel. *FEBS Letters* 486 : 93–8, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11113445>, pMID : 11113445.
- Addicott FT, Lyon JL, Ohkuma K, Thiessen WE, Carns HR, et al. (1968) Absciscic acid : a new name for abscisin II (dormin). *Science (New York, NY)* 159 : 1493, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5732498>, pMID : 5732498.
- Albrecht V, Weinl S, Blazevic D, D'Angelo C, Batistic O, et al. (2003) The calcium sensor CBL1 integrates plant responses to abiotic stresses. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology* 36 : 457–70, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14617077>, pMID : 14617077.
- Alexandersson E, Fraysse L, Sjövall-Larsen S, Gustavsson S, Fellert M, et al. (2005) Whole gene family expression and drought stress regulation of aquaporins. *Plant Molecular Biology* 59 : 469–84, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16235111>, pMID : 16235111.
- Allen GJ, Murata Y, Chu SP, Nafisi M, Schroeder JI (2002) Hypersensitivity of abscisic acid-induced cytosolic calcium increases in the *Arabidopsis* farnesyltransferase mutant *era1-2*. *The Plant Cell* 14 : 1649–62, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12119381>, pMID : 12119381.
- Anderson JP, Badruzsaufari E, Schenk PM, Manners JM, Desmond OJ, et al. (2004) Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 16 : 3460–79, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15548743>, pMID : 15548743.
- Audran, Borel, Frey, Sotta, Meyer, et al. (1998) Expression studies of the zeaxanthin epoxidase gene in *nicotiana plumbaginifolia*. *Plant Physiol* 118 : 1021–8, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9808747>, pMID : 9808747.
- Baker SS, Wilhelm KS, Thomashow MF (1994) The 5'-region of *Arabidopsis thaliana* *cor15a* has cis-acting elements that confer cold-, drought- and ABA-regulated gene expression. *Plant Molecular Biology* 24 : 701–13, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8193295>, pMID : 8

- Barrero JM, Piqueras P, González-Guzmán M, Serrano R, Rodríguez PL, et al. (2005) A mutational analysis of the ABA1 gene of *Arabidopsis thaliana* highlights the involvement of ABA in vegetative development. *Journal of Experimental Botany* 56 : 2071–83, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15983017>, pMID : 15983017.
- Bartels D, Sunkar R (2005) Drought and Salt Tolerance in Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* 24 : 23, URL <http://www.informaworld.com/10.1080/07352680590910410>.
- Blatt MR, Armstrong F (1993) K⁺ channels of stomatal guard cells : Absciscic-acid-evoked control of the outward rectifier mediated by cytoplasmic pH. *Planta* 191 : 330–341, URL <http://dx.doi.org/10.1007/BF00195690>.
- Boter M, Ruíz-Rivero O, Abdeen A, Prat S (2004) Conserved MYC transcription factors play a key role in jasmonate signaling both in tomato and *Arabidopsis*. *Genes & Development* 18 : 1577–91, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15231736>, pMID : 15231736.
- Boudsocq M, Barbier-Brygoo H, Laurière C (2004) Identification of nine sucrose nonfermenting 1-related protein kinases 2 activated by hyperosmotic and saline stresses in *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry* 279 : 41758–66, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15292193>, pMID : 15292193.
- Boursiac Y, Chen S, Luu DT, Sorieul M, van den Dries N, et al. (2005) Early effects of salinity on water transport in *Arabidopsis* roots. Molecular and cellular features of aquaporin expression. *Plant Physiology* 139 : 790–805, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16183846>, pMID : 16183846.
- Bray EA (2004) Genes commonly regulated by water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* 55 : 2331–41, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15448178>, pMID : 15448178.
- Chen Z, Hong X, Zhang H, Wang Y, Li X, et al. (2005) Disruption of the cellulose synthase gene, *At-CesA8/IRX1*, enhances drought and osmotic stress tolerance in *Arabidopsis*. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology* 43 : 273–83, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15998313>, pMID : 15998313.
- Chen Z, Zhang H, Jablonowski D, Zhou X, Ren X, et al. (2006) Mutations in *ABO1/ELO2*, a subunit of holo-Elongator, increase abscisic acid sensitivity and drought tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular and Cellular Biology* 26 : 6902–12, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16943431>, pMID : 16943431.
- Cheng WH, Endo A, Zhou L, Penney J, Chen HC, et al. (2002) A unique short-chain dehydrogenase/reductase in *Arabidopsis*

- Cho SK, Ryu MY, Song C, Kwak JM, Kim WT (2008) Arabidopsis PUB22 and PUB23 are homologous U-Box E3 ubiquitin ligases that play combinatory roles in response to drought stress. *The Plant Cell* 20 : 1899–914, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18664614>, pMID : 18664614.
- Choi H, Hong J, Ha J, Kang J, Kim SY (2000) ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. *The Journal of Biological Chemistry* 275 : 1723–30, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10636868>, pMID : 10636868.
- Christmann A, Hoffmann T, Teplova I, Grill E, Müller A (2005) Generation of active pools of abscisic acid revealed by in vivo imaging of water-stressed Arabidopsis. *Plant Physiology* 137 : 209–19, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15618419>, pMID : 15618419.
- Christmann A, Weiler EW, Steudle E, Grill E (2007) A hydraulic signal in root-to-shoot signalling of water shortage. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology* 52 : 167–74, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17711416>, pMID : 17711416.
- Clouse SD, Langford M, McMorris TC (1996) A brassinosteroid-insensitive mutant in Arabidopsis thaliana exhibits multiple defects in growth and development. *Plant Physiology* 111 : 671–8, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8754677>, pMID : 8754677.
- CORNFORTH JW, MILBORROW BV, RYBACK G, WAREING PF (1965) Chemistry and Physiology of /‘Dormins/’ In Sycamore : Identity of Sycamore /‘Dormin/’ with Abscisin II. *Nature* 205 : 1269–1270, URL <http://dx.doi.org/10.1038/2051269b0>.
- Coursol S, Fan LM, Stunff HL, Spiegel S, Gilroy S, et al. (2003) Sphingolipid signalling in Arabidopsis guard cells involves heterotrimeric G proteins. *Nature* 423 : 651–4, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12789341>, pMID : 12789341.
- Cutler S, Ghassemian M, Bonetta D, Cooney S, McCourt P (1996) A protein farnesyl transferase involved in abscisic acid signal transduction in Arabidopsis. *Science (New York, NY)* 273 : 1239–41, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8703061>, pMID : 8703061.
- D’Angelo C, Weinl S, Batistic O, Pandey GK, Cheong YH, et al. (2006) Alternative complex formation of the Ca-regulated protein kinase CIPK1 controls abscisic acid-dependent and independent stress responses in Arabidopsis. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology* 48 : 857–72, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17092313>, pMID : 17092313.
- de Torres-Zabala M, Truman W, Bennett MH, Lafforgue G, Mansfield JW, et al. (2007) Pseudomonas syringae pv. tomato hijacks the Arabidopsis abscisic acid signalling pathway to cause disease. *The EMBO Journal* 26 : 1434–43, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17304219>, pMID : 17304219.
- Delauney AJ, Hu CA, Kishor PB, Verma DP (19

- Doyle J, Doyle J (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12 : 13–15.
- Endo A, Sawada Y, Takahashi H, Okamoto M, Ikegami K, et al. (2008) Drought induction of Arabidopsis 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase occurs in vascular parenchyma cells. *Plant Physiology* 147 : 1984–93, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18550687>, pMID : 18550687.
- Estelle MA, Somerville C (1987) Auxin-resistant mutants of Arabidopsis thaliana with an altered morphology. *Molecular and General Genetics MGG* 206 : 200–206, URL <http://dx.doi.org/10.1007/BF00333575>.
- Finkelstein R, Reeves W, Ariizumi T, Steber C (2008) Molecular aspects of seed dormancy. *Annual Review of Plant Biology* 59 : 387–415, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18257711>, pMID : 18257711.
- Finkelstein RR, Gampala SSL, Rock CD (2002) Absciscic acid signaling in seeds and seedlings. *The Plant Cell* 14 Suppl : S15–45, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12045268>, pMID : 12045268.
- Finkelstein RR, Lynch TJ (2000) The Arabidopsis absciscic acid response gene ABI5 encodes a basic leucine zipper transcription factor. *The Plant Cell* 12 : 599–609, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10760247>, pMID : 10760247.
- Fujita M, Fujita Y, Maruyama K, Seki M, Hiratsu K, et al. (2004) A dehydration-induced NAC protein, RD26, is involved in a novel ABA-dependent stress-signaling pathway. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology* 39 : 863–76, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15341629>, pMID : 15341629.
- Fujita M, Fujita Y, Noutoshi Y, Takahashi F, Narusaka Y, et al. (2006) Crosstalk between abiotic and biotic stress responses : a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Current Opinion in Plant Biology* 9 : 436–42, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16759898>, pMID : 16759898.
- Fujita Y, Fujita M, Satoh R, Maruyama K, Parvez MM, et al. (2005) AREB1 Is a transcription activator of novel ABRE-dependent ABA signaling that enhances drought stress tolerance in Arabidopsis. *The Plant Cell* 17 : 3470–88, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16284313>, pMID : 16284313.
- Furihata T, Maruyama K, Fujita Y, Umezawa T, Yoshida R, et al. (2006) Absciscic acid-dependent multisite phosphorylation regulates the activity of a transcription activator AREB1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 : 1988–93, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16446457>, pMID : 16446457.
- Gao XQ, Chen J, Wei PC, Ren F, Chen J, et al. (2008) Array and distribution of actin filaments in guard cells contribute to the determination of stomatal aperture. *Plant Cell Reports* 27 : 1655–65, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18612643>, pMID : 18612643.

- Haake V, Cook D, Riechmann JL, Pineda O, Thomashow MF, et al. (2002) Transcription factor CBF4 is a regulator of drought adaptation in Arabidopsis. *Plant Physiology* 130 : 639–48, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12376631>, pMID : 12376631.
- Han MH, Goud S, Song L, Fedoroff N (2004) The Arabidopsis double-stranded RNA-binding protein HYL1 plays a role in microRNA-mediated gene regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 : 1093–8, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14722360>, pMID : 14722360.
- Hausstätter K, Andersson B, Adamska I (2001) A chloroplast DegP2 protease performs the primary cleavage of the photodamaged D1 protein in plant photosystem II. *The EMBO Journal* 20 : 713–22, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11179216>, pMID : 11179216.
- He Z, Wang ZY, Li J, Zhu Q, Lamb C, et al. (2000) Perception of brassinosteroids by the extracellular domain of the receptor kinase BRI1. *Science (New York, NY)* 288 : 2360–3, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10875920>, pMID : 10875920.
- Hedrich R, Busch H, Raschke K (1990) Ca²⁺ and nucleotide dependent regulation of voltage dependent anion channels in the plasma membrane of guard cells. *The EMBO Journal* 9 : 3889–92, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1701140>, pMID : 1701140.
- Himmelbach A, Hoffmann T, Leube M, Höhener B, Grill E (2002) Homeodomain protein ATHB6 is a target of the protein phosphatase ABI1 and regulates hormone responses in Arabidopsis. *The EMBO Journal* 21 : 3029–38, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12065416>, pMID : 12065416.
- Himmelbach A, Iten M, Grill E (1998) Signalling of abscisic acid to regulate plant growth. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences* 353 : 1439–44, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9800207>, pMID : 9800207.
- Hirayama T, Shinozaki K (2007) Perception and transduction of abscisic acid signals : keys to the function of the versatile plant hormone ABA. *Trends in Plant Science* 12 : 343–51, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17629540>, pMID : 17629540.
- Hong-Bo S, Li-Ye C, Ming-An S (2008) Calcium as a versatile plant signal transducer under soil water stress. *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 30 : 634–41, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18536032>, pMID : 18536032.
- Hosy E, Vavasseur A, Mouline K, Dreyer I, Gaymard F, et al. (2003) The Arabidopsis outward K⁺ channel GORK is involved in regulation of stomatal movements and plant transpiration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 : 5549–54, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12671068>, pMID : 12671068.
- Huang D, Jaradat MR, Wu W, Ambrose

- Hugouvieux V, Kwak JM, Schroeder JI (2001) An mRNA cap binding protein, ABH1, modulates early abscisic acid signal transduction in Arabidopsis. *Cell* 106 : 477–87, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11525733>, pMID : 11525733.
- Hundertmark M, Hincha DK (2008) LEA (late embryogenesis abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics* 9 : 118, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18318901>, pMID : 18318901.
- Hunt L, Mills LN, Pical C, Leckie CP, Aitken FL, et al. (2003) Phospholipase C is required for the control of stomatal aperture by ABA. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology* 34 : 47–55, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12662308>, pMID : 12662308.
- Hwang JU, Lee Y (2001) Abscisic acid-induced actin reorganization in guard cells of dayflower is mediated by cytosolic calcium levels and by protein kinase and protein phosphatase activities. *Plant Physiology* 125 : 2120–8, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11299391>, pMID : 11299391.
- Inoue T, Higuchi M, Hashimoto Y, Seki M, Kobayashi M, et al. (2001) Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from Arabidopsis. *Nature* 409 : 1060–3, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11234017>, pMID : 11234017.
- Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, et al. (2003) Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics (Oxford, England)* 4 : 249–64, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12925520>, pMID : 12925520.
- Ishitani M, Xiong L, Stevenson B, Zhu JK (1997) Genetic analysis of osmotic and cold stress signal transduction in Arabidopsis : interactions and convergence of abscisic acid-dependent and abscisic acid-independent pathways. *The Plant Cell* 9 : 1935–49, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9401119>, pMID : 9401119.
- Iuchi S, Kobayashi M, Taji T, Naramoto M, Seki M, et al. (2001) Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in Arabidopsis. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology* 27 : 325–33, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11532178>, pMID : 11532178.
- Jakoby M, Weisshaar B, Dröge-Laser W, Vicente-Carbajosa J, Tiedemann J, et al. (2002) bZIP transcription factors in Arabidopsis. *Trends in Plant Science* 7 : 106–11, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11906833>, pMID : 11906833.
- Jang HJ, Pih KT, Kang SG, Lim JH, Jin JB, et al. (1998) Molecular cloning of a novel Ca²⁺-binding protein that is induced by NaCl stress. *Plant Molecular Biology* 37 : 839–47, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9678579>, pMID : 9678579.
- Kant P, Kant S, Gordon M, Shaked R, Barak S (2007) STRESS RESPONSE SUPPRESSOR1 and STRESS RESPONSE SUPPRESSOR2, two DEAD-box RNA helicases that attenuate Arabidopsis responses to multiple abiotic stresses. *Plant Physiology* 145 : 814–30, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17556511>, pMID : 17556511.
- Kim S, Kang JY, Cho DI, Park JH, Kim SY (2004) ABF2, an ABRE-binding bZIP factor, is an essential component of glucose signaling and its overexpression affects multiple stress tolerance. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology* 40 : 75–87, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15361142>, pMID : 15361142.

- Kinoshita T, Nishimura M, Shimazaki K (1995) Cytosolic Concentration of Ca²⁺ Regulates the Plasma Membrane H⁺-ATPase in Guard Cells of Fava Bean. *The Plant Cell* 7 : 1333–1342, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12242406>, pMID : 12242406.
- Kirch HH, Schlingensiepen S, Kotchoni S, Sunkar R, Bartels D (2005) Detailed expression analysis of selected genes of the aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene superfamily in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 57 : 315–32, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15830124>, pMID : 15830124.
- Kjellbom, Larsson, Johansson, Karlsson, Johanson (1999) Aquaporins and water homeostasis in plants. *Trends in Plant Science* 4 : 308–314, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10431220>, pMID : 10431220.
- Klein M, Geisler M, Suh SJ, Kolukisaoglu HU, Azevedo L, et al. (2004) Disruption of AtMRP4, a guard cell plasma membrane ABC-type ABC transporter, leads to deregulation of stomatal opening and increased drought susceptibility. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology* 39 : 219–36, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15225287>, pMID : 15225287.
- Klein M, Perfus-Barbeoch L, Frelet A, Gaedeke N, Reinhardt D, et al. (2003) The plant multidrug resistance ABC transporter AtMRP5 is involved in guard cell hormonal signalling and water use. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology* 33 : 119–29, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12943546>, pMID : 12943546.
- Knight H (2000) Calcium signaling during abiotic stress in plants. *International Review of Cytology* 195 : 269–324, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10603578>, pMID : 10603578.
- Ko JH, Yang SH, Han KH (2006) Upregulation of an *Arabidopsis* RING-H2 gene, XERICO, confers drought tolerance through increased abscisic acid biosynthesis. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology* 47 : 343–55, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16792696>, pMID : 16792696.
- Koizumi M, Yamaguchi-Shinozaki K, Tsuji H, Shinozaki K (1993) Structure and expression of two genes that encode distinct drought-inducible cysteine proteinases in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* 129 : 175–82, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8325504>, pMID : 8325504.
- Koornneef M, Reuling G, Karssen CM (1984) The isolation and characterization of abscisic acid-insensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum* 61 : 377–383, URL <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3054.1984.tb06343.x>.
- Kotchoni SO, Kuhns C, Ditzer A, Kirch HH, Bartels D (2006) Over-expression of different aldehyde dehydrogenase genes in *Arabidopsis thaliana* confers tolerance to abiotic stress and protects plants against lipid peroxidation and oxidative stress. *Plant, Cell & Environment* 29 : 1033–48, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17080931>, pMID : 17080931.
- Kotoujansky A, Lemattre M, Boistard P (1982) Utilization of a thermosensitive episome bearing transposon TN10 to isolate Hfr donor strains of *Erwinia carotovora* subsp. *chrysanthemi*. *Journal of Bacteriology* 150 : 122–31, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6277860>, pMID : 6277860.
- Kudla J, Xu Q, Harter K, Gruissem W, Luan S (1999) Genes for calcineurin B-like proteins in *Arabidopsis* are differentially regulated by stress signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 : 4718–23, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10200328>, pMID : 10200328.

- Kuhn JM, Boisson-Dernier A, Dizon MB, Maktabi MH, Schroeder JI (2006) The protein phosphatase AtPP2CA negatively regulates abscisic acid signal transduction in Arabidopsis, and effects of abh1 on AtPP2CA mRNA. *Plant Physiology* 140 : 127–39, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16361522>, pMID : 16361522.
- Kutschera U, Schopfer P (1986) Effect of auxin and abscisic acid on cell wall extensibility in maize coleoptiles. *Planta* 167 : 527–535, URL <http://dx.doi.org/10.1007/BF00391229>.
- Kwak JM, Mori IC, Pei ZM, Leonhardt N, Torres MA, et al. (2003) NADPH oxidase AtrbohD and AtrbohF genes function in ROS-dependent ABA signaling in Arabidopsis. *The EMBO Journal* 22 : 2623–33, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12773379>, pMID : 12773379.
- Lee GJ, Pokala N, Vierling E (1995) Structure and in vitro molecular chaperone activity of cytosolic small heat shock proteins from pea. *The Journal of Biological Chemistry* 270 : 10432–8, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7737977>, pMID : 7737977.
- Lee KH, Piao HL, Kim HY, Choi SM, Jiang F, et al. (2006) Activation of glucosidase via stress-induced polymerization rapidly increases active pools of abscisic acid. *Cell* 126 : 1109–20, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16990135>, pMID : 16990135.
- Lefebvre V, North H, Frey A, Sotta B, Seo M, et al. (2006) Functional analysis of Arabidopsis NCED6 and NCED9 genes indicates that ABA synthesized in the endosperm is involved in the induction of seed dormancy. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology* 45 : 309–19, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16412079>, pMID : 16412079.
- Lemichez E, Wu Y, Sanchez JP, Mettouchi A, Mathur J, et al. (2001) Inactivation of AtRac1 by abscisic acid is essential for stomatal closure. *Genes & Development* 15 : 1808–16, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11459830>, pMID : 11459830.
- Lemtiri-Chlieh F, MacRobbie EAC, Webb AAR, Manison NF, Brownlee C, et al. (2003) Inositol hexakisphosphate mobilizes an endomembrane store of calcium in guard cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 : 10091–5, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12913129>, pMID : 12913129.
- Léon-Kloosterziel KM, Gil MA, Ruijs GJ, Jacobsen SE, Olszewski NE, et al. (1996) Isolation and characterization of abscisic acid-deficient Arabidopsis mutants at two new loci. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology* 10 : 655–61, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8893542>, pMID : 8893542.
- Leonhardt N, Kwak JM, Robert N, Waner D, Leonhardt G, et al. (2004) Microarray expression analyses of Arabidopsis guard cells and isolation of a recessive abscisic acid hypersensitive protein phosphatase 2C mutant. *The Plant Cell* 16 : 596–615, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14973164>, pMID : 14973164.
- Leung J, Merlot S, Giraudat J (1997) The Arabidopsis ABSCISIC ACID-INSENSITIVE2 (ABI2) and ABI1 genes encode homologous protein phosphatases 2C involved in abscisic acid signal transduction. *The Plant Cell* 9 : 759–71, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9165752>, pMID : 9165752.
- Li L, Kim BG, Cheong YH, Pandey GK, Luan S (2006a) A Ca²⁺ signaling pathway regulates a K⁺ channel for low-K response in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 : 12625–30, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16895985>, pMID : 16895985.

- Li S, Assmann SM, Albert R (2006b) Predicting essential components of signal transduction networks : a dynamic model of guard cell abscisic acid signaling. *PLoS Biology* 4 : e312, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16968132>, pMID : 16968132.
- Lim YS, Cha MK, Kim HK, Uhm TB, Park JW, et al. (1993) Removals of hydrogen peroxide and hydroxyl radical by thiol-specific antioxidant protein as a possible role in vivo. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 192 : 273–80, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8386507>, pMID : 8386507.
- Liotenberg S, North H, Marion-Poll A (1999) Molecular biology and regulation of abscisic acid biosynthesis in plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 37 : 341–350.
- Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, Abe H, Miura S, et al. (1998) Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 10 : 1391–406, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9707537>, pMID : 9707537.
- Liu X, Yue Y, Li B, Nie Y, Li W, et al. (2007) A G protein-coupled receptor is a plasma membrane receptor for the plant hormone abscisic acid. *Science (New York, NY)* 315 : 1712–6, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17347412>, pMID : 17347412.
- Liu Y, Bergervoet JHW, Vos CHR, Hilhorst HWM, Kraak HL, et al. (1994) Nuclear replication activities during imbibition of abscisic acid- and gibberellin-deficient tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seeds. *Planta* 194 : 368–373, URL <http://dx.doi.org/10.1007/BF00197537>.
- Lopez-Molina L, Chua NH (2000) A null mutation in a bZIP factor confers ABA-insensitivity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant & Cell Physiology* 41 : 541–7, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10929936>, pMID : 10929936.
- Magnan F, Ranty B, Charpentreau M, Sotta B, Galaud JP, et al. (2008) Mutations in AtCML9, a calmodulin-like protein from *Arabidopsis thaliana*, alter plant responses to abiotic stress and abscisic acid. *The Plant Journal* 9999, URL <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03622.x>.
- Magome H, Yamaguchi S, Hanada A, Kamiya Y, Oda K (2004) dwarf and delayed-flowering 1, a novel *Arabidopsis* mutant deficient in gibberellin biosynthesis because of overexpression of a putative AP2 transcription factor. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology* 37 : 720–9, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14871311>, pMID : 14871311.
- Mauch-Mani B, Mauch F (2005) The role of abscisic acid in plant-pathogen interactions. *Current Opinion in Plant Biology* 8 : 409–14, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15939661>, pMID : 15939661.
- McCourt P, Creelman R (2008) The ABA receptors - we report you decide. *Current Opinion in Plant Biology* 11 : 474–8, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18774332>, pMID : 18774332.
- Meinhard M, Grill E (2001) Hydrogen peroxide is a regulator of ABI1, a protein phosphatase 2C from *Arabidopsis*. *FEBS Letters* 508 : 443–6, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11728469>, pMID : 11728469.
- Merlot S, Leonhardt N, Fenzi F, Valon C, Costa M, et al. (2007) Constitutive activation of a plasma membrane H(+)-ATPase prevents abscisic acid-mediated stomatal closure. *The EMBO Journal* 26 : 3216–26, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17557075>, pMID : 17557075.

- Merlot S, Mustilli AC, Genty B, North H, Lefebvre V, et al. (2002) Use of infrared thermal imaging to isolate Arabidopsis mutants defective in stomatal regulation. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology* 30 : 601–9, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12047634>, pMID : 12047634.
- Mikami K, Katagiri T, Iuchi S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1998) A gene encoding phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase is induced by water stress and abscisic acid in Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology* 15 : 563–8, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9753781>, pMID : 9753781.
- Mishra G, Zhang W, Deng F, Zhao J, Wang X (2006) A bifurcating pathway directs abscisic acid effects on stomatal closure and opening in Arabidopsis. *Science (New York, NY)* 312 : 264–6, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16614222>, pMID : 16614222.
- Mizoguchi T, Irie K, Hirayama T, Hayashida N, Yamaguchi-Shinozaki K, et al. (1996) A gene encoding a mitogen-activated protein kinase kinase kinase is induced simultaneously with genes for a mitogen-activated protein kinase and an S6 ribosomal protein kinase by touch, cold, and water stress in Arabidopsis thaliana. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 : 765–9, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8570631>, pMID : 8570631.
- Monroe-Augustus M, Zolman BK, Bartel B (2003) IBR5, a dual-specificity phosphatase-like protein modulating auxin and abscisic acid responsiveness in Arabidopsis. *The Plant Cell* 15 : 2979–91, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14630970>, pMID : 14630970.
- Mori IC, Murata Y, Yang Y, Munemasa S, Wang YF, et al. (2006) CDPKs CPK6 and CPK3 function in ABA regulation of guard cell S-type anion- and Ca(2+)-permeable channels and stomatal closure. *PLoS Biology* 4 : e327, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17032064>, pMID : 17032064.
- Murata Y, Pei ZM, Mori IC, Schroeder J (2001) Abscisic Acid Activation of Plasma Membrane Ca²⁺ Channels in Guard Cells Requires Cytosolic NAD(P)H and Is Differentially Disrupted Upstream and Downstream of Reactive Oxygen Species Production in abi1-1 and abi2-1 Protein Phosphatase 2C Mutants. *Plant Cell* 13 : 2513–2523, URL <http://www.plantcell.org/cgi/content/abstract/13/11/2513>.
- Mustilli AC, Merlot S, Vavasseur A, Fenzi F, Giraudat J (2002) Arabidopsis OST1 protein kinase mediates the regulation of stomatal aperture by abscisic acid and acts upstream of reactive oxygen species production. *The Plant Cell* 14 : 3089–99, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12468729>, pMID : 12468729.
- Nakashima K, Kiyosue T, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1997) A nuclear gene, erd1, encoding a chloroplast-targeted Clp protease regulatory subunit homolog is not only induced by water stress but also developmentally up-regulated during senescence in Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology* 12 : 851–61, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9375397>, pMID : 9375397.
- Nambara E, Marion-Poll A (2005) Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annual Review of Plant Biology* 56 : 165–85, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15862093>, pMID : 15862093.
- Nanjo T, Kobayashi M, Yoshiba Y, Sanada Y, Wada K, et al. (1999) Biological functions of proline in morphogenesis and osmotolerance revealed in antisense transgenic Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology* 18 : 185–93, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10363370>, pMID : 10363370.
- Negi J, Matsuda O, Nagasawa T, Oba Y, Takahashi H, et al. (2008) CO₂ regulator SLAC1 and its homologues are essential for anion homeostasis in plant cells. *Nature* 452 : 483–6, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18305482>, pMID : 18305482.

- Nilson SE, Assmann SM (2007) The control of transpiration. Insights from Arabidopsis. *Plant Physiology* 143 : 19–27, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17210910>, pMID : 17210910.
- Nishimura N, Kitahata N, Seki M, Narusaka Y, Narusaka M, et al. (2005) Analysis of ABA hypersensitive germination2 revealed the pivotal functions of PARN in stress response in Arabidopsis. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology* 44 : 972–84, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16359390>, pMID : 16359390.
- North HM, Almeida AD, Boutin JP, Frey A, To A, et al. (2007) The Arabidopsis ABA-deficient mutant *aba4* demonstrates that the major route for stress-induced ABA accumulation is via neoxanthin isomers. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology* 50 : 810–24, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17470058>, pMID : 17470058.
- North HM, Frey A, Boutin JP, Sotta B, Marion-Poll A (2005) Analysis of xanthophyll cycle gene expression during the adaptation of Arabidopsis to excess light and drought stress : Changes in RNA steady-state levels do not contribute to short-term responses. *Plant Science* 169 : 115–124.
- Ogawa D, Yamaguchi K, Nishiuchi T (2007) High-level overexpression of the Arabidopsis HsfA2 gene confers not only increased thermotolerance but also salt/osmotic stress tolerance and enhanced callus growth. *Journal of Experimental Botany* 58 : 3373–83, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17890230>, pMID : 17890230.
- Okamoto M, Kuwahara A, Seo M, Kushiro T, Asami T, et al. (2006) CYP707A1 and CYP707A2, which encode abscisic acid 8'-hydroxylases, are indispensable for proper control of seed dormancy and germination in Arabidopsis. *Plant Physiology* 141 : 97–107, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16543410>, pMID : 16543410.
- Olsson ASB, Engström P, Söderman E (2004) The homeobox genes ATHB12 and ATHB7 encode potential regulators of growth in response to water deficit in Arabidopsis. *Plant Molecular Biology* 55 : 663–77, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15604708>, pMID : 15604708.
- Pandey GK, Cheong YH, Kim KN, Grant JJ, Li L, et al. (2004) The calcium sensor calcineurin B-like 9 modulates abscisic acid sensitivity and biosynthesis in Arabidopsis. *The Plant Cell* 16 : 1912–24, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15208400>, pMID : 15208400.
- Pandey GK, Grant JJ, Cheong YH, Kim BG, Li L, et al. (2005) ABR1, an APETALA2-domain transcription factor that functions as a repressor of ABA response in Arabidopsis. *Plant Physiology* 139 : 1185–93, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16227468>, pMID : 16227468.
- Pandey S, Assmann SM (2004) The Arabidopsis putative G protein-coupled receptor GCR1 interacts with the G protein alpha subunit GPA1 and regulates abscisic acid signaling. *The Plant Cell* 16 : 1616–32, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15155892>, pMID : 15155892.
- Pandey S, Chen JG, Jones AM, Assmann SM (2006) G-protein complex mutants are hypersensitive to abscisic acid regulation of germination and postgermination development. *Plant Physiology* 141 : 243–56, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16581874>, pMID : 16581874.
- Papp I, Mur L, Ágnes Dalmadi, Dulai S, Koncz C (2004) A mutation in the Cap Binding Protein 20 gene confers drought. *Plant Molecular Biology* 55 : 679–686, URL <http://dx.doi.org/10.1007/s11103-004-1680-2>.

- Pei ZM, Baizabal-Aguirre VM, Allen GJ, Schroeder JI (1998) A transient outward-rectifying K⁺ channel current down-regulated by cytosolic Ca²⁺ in *Arabidopsis thaliana* guard cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 : 6548–53, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9601004>, pMID : 9601004.
- Pei ZM, Kuchitsu K, Ward JM, Schwarz M, Schroeder JI (1997) Differential abscisic acid regulation of guard cell slow anion channels in *Arabidopsis* wild-type and *abi1* and *abi2* mutants. *The Plant Cell* 9 : 409–23, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9090884>, pMID : 9090884.
- Peiter E, Maathuis FJM, Mills LN, Knight H, Pelloux J, et al. (2005) The vacuolar Ca²⁺-activated channel TPC1 regulates germination and stomatal movement. *Nature* 434 : 404–8, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15772667>, pMID : 15772667.
- Pernas M, García-Casado G, Rojo E, Solano R, Sánchez-Serrano JJ (2007) A protein phosphatase 2A catalytic subunit is a negative regulator of abscisic acid signalling. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology* 51 : 763–78, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17617176>, pMID : 17617176.
- Perruc E, Charpentreau M, Ramirez BC, Jauneau A, Galaud JP, et al. (2004) A novel calmodulin-binding protein functions as a negative regulator of osmotic stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology* 38 : 410–20, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15086802>, pMID : 15086802.
- Posas F, Wurgler-Murphy SM, Maeda T, Witten EA, Thai TC, et al. (1996) Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 "two-component" osmosensor. *Cell* 86 : 865–75, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8808622>, pMID : 8808622.
- Qin F, Sakuma Y, Tran LSP, Maruyama K, Kidokoro S, et al. (2008) *Arabidopsis* DREB2A-interacting proteins function as RING E3 ligases and negatively regulate plant drought stress-responsive gene expression. *The Plant Cell* 20 : 1693–707, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18552202>, pMID : 18552202.
- Quettier AL, Bertrand C, Habricot Y, Miginiac E, Agnes C, et al. (2006) The *phs1-3* mutation in a putative dual-specificity protein tyrosine phosphatase gene provokes hypersensitive responses to abscisic acid in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology* 47 : 711–9, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16889651>, pMID : 16889651.
- Razem FA, El-Kereamy A, Abrams SR, Hill RD (2006) The RNA-binding protein FCA is an abscisic acid receptor. *Nature* 439 : 290–4, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16421562>, pMID : 16421562.
- Rentel MC, Lecourieux D, Ouaked F, Usher SL, Petersen L, et al. (2004) OXI1 kinase is necessary for oxidative burst-mediated signalling in *Arabidopsis*. *Nature* 427 : 858–61, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14985766>, pMID : 14985766.
- Reyes JL, Chua NH (2007) ABA induction of miR159 controls transcript levels of two MYB factors during *Arabidopsis* seed germination. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology* 49 : 592–606, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17217461>, pMID : 17217461.
- Saez A, Apostolova N, Gonzalez-Guzman M, Gonzalez-Garcia MP, Nicolas C, et al. (2004) Gain-of-function and loss-of-function phenotypes of the protein phosphatase 2C HAB1 reveal its role as a negative regulator of abscisic acid signalling. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology* 37 : 354–69, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14731256>, pMID : 14731256.

- Saez A, Robert N, Maktabi MH, Schroeder JI, Serrano R, et al. (2006) Enhancement of abscisic acid sensitivity and reduction of water consumption in Arabidopsis by combined inactivation of the protein phosphatases type 2C ABI1 and HAB1. *Plant Physiology* 141 : 1389–99, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16798945>, pMID : 16798945.
- Saito S, Hirai N, Matsumoto C, Ohigashi H, Ohta D, et al. (2004) Arabidopsis CYP707As encode (+)-abscisic acid 8'-hydroxylase, a key enzyme in the oxidative catabolism of abscisic acid. *Plant Physiology* 134 : 1439–49, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15064374>, pMID : 15064374.
- Sakuma Y, Liu Q, Dubouzet JG, Abe H, Shinozaki K, et al. (2002) DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of Arabidopsis DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 290 : 998–1009, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11798174>, pMID : 11798174.
- Sakuma Y, Maruyama K, Osakabe Y, Qin F, Seki M, et al. (2006a) Functional analysis of an Arabidopsis transcription factor, DREB2A, involved in drought-responsive gene expression. *The Plant Cell* 18 : 1292–309, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16617101>, pMID : 16617101.
- Sakuma Y, Maruyama K, Qin F, Osakabe Y, Shinozaki K, et al. (2006b) Dual function of an Arabidopsis transcription factor DREB2A in water-stress-responsive and heat-stress-responsive gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 : 18822–7, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17030801>, pMID : 17030801.
- Schroeder JI, Allen GJ, Hugouvieux V, Kwak JM, Waner D (2001) GUARD CELL SIGNAL TRANSDUCTION. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52 : 627–658, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11337411>, pMID : 11337411.
- Schroeder JI, Hagiwara S (1989) Cytosolic calcium regulates ion channels in the plasma membrane of *Vicia faba* guard cells. *Nature* 338 : 427–430, URL <http://dx.doi.org/10.1038/338427a0>.
- Schroeder JI, Keller BU (1992) Two types of anion channel currents in guard cells with distinct voltage regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 : 5025–9, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1375754>, pMID : 1375754.
- Schroeder JI, Raschke K, Neher E (1987) Voltage dependence of K channels in guard-cell protoplasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84 : 4108–4112, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16593851>, pMID : 16593851.
- Seki M, Narusaka M, Abe H, Kasuga M, Yamaguchi-Shinozaki K, et al. (2001) Monitoring the expression pattern of 1300 Arabidopsis genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray. *The Plant Cell* 13 : 61–72, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11158529>, pMID : 11158529.
- Seki M, Narusaka M, Ishida J, Nanjo T, Fujita M, et al. (2002) Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology* 31 : 279–92, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12164808>, pMID : 12164808.
- Seki M, Umezawa T, Urano K, Shinozaki K (2007) Regulatory metabolic networks in drought stress responses. *Current Opinion in Plant Biology* 10 : 296–302, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17468040>, pMID : 17468040.

- Sheen J (1996) Ca²⁺-dependent protein kinases and stress signal transduction in plants. *Science* (New York, NY) 274 : 1900–2, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8943201>, pMID : 8943201.
- Shen YY, Wang XF, Wu FQ, Du SY, Cao Z, et al. (2006) The Mg-chelatase H subunit is an abscisic acid receptor. *Nature* 443 : 823–6, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17051210>, pMID : 17051210.
- Shinwari ZK, Nakashima K, Miura S, Kasuga M, Seki M, et al. (1998) An Arabidopsis gene family encoding DRE/CRT binding proteins involved in low-temperature-responsive gene expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 250 : 161–70, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9735350>, pMID : 9735350.
- Silverstone AL, Mak PY, Martínez EC, Sun TP (1997) The new RGA locus encodes a negative regulator of gibberellin response in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 146 : 1087–99, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9215910>, pMID : 9215910.
- Simon M, Loudet O, Durand S, Berard A, Brunel D, et al. (2008) Quantitative Trait Loci Mapping in Five New Large Recombinant Inbred Line Populations of *Arabidopsis thaliana* Genotyped With Consensus Single-Nucleotide Polymorphism Markers. *Genetics* 178 : 2253–2264, URL <http://www.genetics.org/cgi/content/abstract/178/4/2253>.
- Simpson SD, Nakashima K, Narusaka Y, Seki M, Shinozaki K, et al. (2003) Two different novel cis-acting elements of *erd1*, a *clpA* homologous Arabidopsis gene function in induction by dehydration stress and dark-induced senescence. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology* 33 : 259–70, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12535340>, pMID : 12535340.
- Song CP, Agarwal M, Ohta M, Guo Y, Halfter U, et al. (2005) Role of an Arabidopsis AP2/EREBP-type transcriptional repressor in abscisic acid and drought stress responses. *The Plant Cell* 17 : 2384–96, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15994908>, pMID : 15994908.
- Suh SJ, Wang YF, Frelet A, Leonhardt N, Klein M, et al. (2007) The ATP binding cassette transporter AtMRP5 modulates anion and calcium channel activities in Arabidopsis guard cells. *The Journal of Biological Chemistry* 282 : 1916–24, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17098742>, pMID : 17098742.
- Sun W, Bernard C, van de Cotte B, Montagu MV, Verbruggen N (2001) At-HSP17.6A, encoding a small heat-shock protein in Arabidopsis, can enhance osmotolerance upon overexpression. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology* 27 : 407–15, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11576425>, pMID : 11576425.
- Sunkar R, Bartels D, Kirch HH (2003) Overexpression of a stress-inducible aldehyde dehydrogenase gene from Arabidopsis thaliana in transgenic plants improves stress tolerance. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology* 35 : 452–64, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12904208>, pMID : 12904208.
- Tan BC, Joseph LM, Deng WT, Liu L, Li QB, et al. (2003) Molecular characterization of the Arabidopsis 9-cis epoxycarotenoid dioxygenase gene family. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology* 35 : 44–56, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12834401>, pMID : 12834401.
- Tran LSP, Nakashima K, Sakuma Y, Osakabe Y, Qin F, et al. (2007a) Co-expression of the stress-inducible zinc finger homeodomain ZFHD1 and NAC transcription factors enhances expression of the ERD1 gene in Arabidopsis. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology* 49 : 46–63, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17233795>, pMID : 17233795.

- Tran LSP, Nakashima K, Sakuma Y, Simpson SD, Fujita Y, et al. (2004) Isolation and functional analysis of Arabidopsis stress-inducible NAC transcription factors that bind to a drought-responsive cis-element in the early responsive to dehydration stress 1 promoter. *The Plant Cell* 16 : 2481–98, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15319476>, pMID : 15319476.
- Tran LSP, Urao T, Qin F, Maruyama K, Kakimoto T, et al. (2007b) 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 : 20623–8, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18077346>, pMID : 18077346.
- Umezawa T, Okamoto M, Kushiro T, Nambara E, Oono Y, et al. (2006) CYP707A3, a major ABA 8'-hydroxylase involved in dehydration and rehydration response in Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology* 46 : 171–82, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16623881>, pMID : 16623881.
- Uno Y, Furihata T, Abe H, Yoshida R, Shinozaki K, et al. (2000) Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 : 11632–7, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11005831>, pMID : 11005831.
- Urao T, Yakubov B, Satoh R, Yamaguchi-Shinozaki K, Seki M, et al. (1999) A transmembrane hybrid-type histidine kinase in Arabidopsis functions as an osmosensor. *The Plant Cell* 11 : 1743–54, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10488240>, pMID : 10488240.
- Vahisalu T, Kollist H, Wang YF, Nishimura N, Chan WY, et al. (2008) SLAC1 is required for plant guard cell S-type anion channel function in stomatal signalling. *Nature* 452 : 487–91, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18305484>, pMID : 18305484.
- Verslues PE, Zhu JK (2007) New developments in abscisic acid perception and metabolism. *Current Opinion in Plant Biology* 10 : 447–52, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17875396>, pMID : 17875396.
- Ward JM, Schroeder JI (1994) Calcium-Activated K⁺ Channels and Calcium-Induced Calcium Release by Slow Vacuolar Ion Channels in Guard Cell Vacuoles Implicated in the Control of Stomatal Closure. *The Plant Cell* 6 : 669–683, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12244253>, pMID : 12244253.
- Wasilewska A, Vlad F, Sirichandra C, Redko Y, Jammes F, et al. (2008) An Update on Abscisic Acid Signaling in Plants and More ... *Mol Plant* 1 : 198–217, URL <http://mplant.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/1/2/198>.
- Wohlbach DJ, Quirino BF, Sussman MR (2008) Analysis of the Arabidopsis histidine kinase ATHK1 reveals a connection between vegetative osmotic stress sensing and seed maturation. *The Plant Cell* 20 : 1101–17, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18441212>, pMID : 18441212.
- Xie X, Wang Y, Williamson L, Holroyd GH, Tagliavia C, et al. (2006) The identification of genes involved in the stomatal response to reduced atmospheric relative humidity. *Current Biology : CB* 16 : 882–7, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16682349>, pMID : 16682349.
- Xing Y, Jia W, Zhang J (2007) AtMEK1 mediates stress-induced gene expression of CAT1 catalase by triggering H₂O₂ production in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* 58 : 2969–81, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17728292>, pMID : 17728292.

- Xing Y, Jia W, Zhang J (2008) AtMKK1 mediates ABA-induced CAT1 expression and H₂O₂ production via AtMPK6-coupled signaling in Arabidopsis. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology* 54 : 440–51, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18248592>, pMID : 18248592.
- Xiong L, Bh L, Ishitani M, Lee H, Zhang C, et al. (2001a) FIERY1 encoding an inositol polyphosphate 1-phosphatase is a negative regulator of abscisic acid and stress signaling in Arabidopsis. *Genes & Development* 15 : 1971–84, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11485991>, pMID : 11485991.
- Xiong L, Gong Z, Rock CD, Subramanian S, Guo Y, et al. (2001b) Modulation of abscisic acid signal transduction and biosynthesis by an Sm-like protein in Arabidopsis. *Developmental Cell* 1 : 771–81, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11740939>, pMID : 11740939.
- Xiong L, Ishitani M, Lee H, Zhu JK (2001c) The Arabidopsis LOS5/ABA3 locus encodes a molybdenum cofactor sulfurase and modulates cold stress- and osmotic stress-responsive gene expression. *The Plant Cell* 13 : 2063–83, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11549764>, pMID : 11549764.
- Xiong L, Lee H, Ishitani M, Tanaka Y, Stevenson B, et al. (2002a) Repression of stress-responsive genes by FIERY2, a novel transcriptional regulator in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 : 10899–904, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12149453>, pMID : 12149453.
- Xiong L, Schumaker KS, Zhu JK (2002b) Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *The Plant Cell* 14 Suppl : S165–83, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12045276>, pMID : 12045276.
- Xu J, Li HD, Chen LQ, Wang Y, Liu LL, et al. (2006) A protein kinase, interacting with two calcineurin B-like proteins, regulates K⁺ transporter AKT1 in Arabidopsis. *Cell* 125 : 1347–60, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16814720>, pMID : 16814720.
- Xu Q, Fu HH, Gupta R, Luan S (1998) Molecular characterization of a tyrosine-specific protein phosphatase encoded by a stress-responsive gene in Arabidopsis. *The Plant Cell* 10 : 849–57, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9596642>, pMID : 9596642.
- Yadav V, Mallappa C, Gangappa SN, Bhatia S, Chattopadhyay S (2005) A basic helix-loop-helix transcription factor in Arabidopsis, MYC2, acts as a repressor of blue light-mediated photomorphogenic growth. *The Plant Cell* 17 : 1953–66, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15923349>, pMID : 15923349.
- Yamaguchi-Shinozaki K, Koizumi M, Urao S, Shinozaki K (1992) Molecular Cloning and Characterization of 9 cDNAs for Genes That Are Responsive to Desiccation in Arabidopsis thaliana : Sequence Analysis of One cDNA Clone That Encodes a Putative Transmembrane Channel Protein. *Plant Cell Physiol* 33 : 217–224, URL <http://pcp.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/33/3/217>.
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1992) A novel Arabidopsis DNA binding protein contains the conserved motif of HMG-box proteins. *Nucleic Acids Research* 20 : 6737, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1480495>, pMID : 1480495.
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1994) A novel cis-acting element in an Arabidopsis gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *The Plant Cell* 6 : 251–64, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8148648>, pMID : 8148648.
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2006) Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annual Review of Plant Biology* 57 : 781–803, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16669782>, pMID : 16669782.

- Yoine M, aki Ohto M, Onai K, Mita S, Nakamura K (2006) The lba1 mutation of UPF1 RNA helicase involved in nonsense-mediated mRNA decay causes pleiotropic phenotypic changes and altered sugar signalling in Arabidopsis. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology* 47 : 49–62, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16740149>, pMID : 16740149.
- Yoshida R, Hobo T, Ichimura K, Mizoguchi T, Takahashi F, et al. (2002) ABA-activated SnRK2 protein kinase is required for dehydration stress signaling in Arabidopsis. *Plant & Cell Physiology* 43 : 1473–83, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12514244>, pMID : 12514244.
- Yoshida R, Umezawa T, Mizoguchi T, Takahashi S, Takahashi F, et al. (2006a) The regulatory domain of SRK2E/OST1/SnRK2.6 interacts with ABI1 and integrates abscisic acid (ABA) and osmotic stress signals controlling stomatal closure in Arabidopsis. *The Journal of Biological Chemistry* 281 : 5310–8, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16365038>, pMID : 16365038.
- Yoshida T, Nishimura N, Kitahata N, Kuromori T, Ito T, et al. (2006b) ABA-hypersensitive germination3 encodes a protein phosphatase 2C (AtPP2CA) that strongly regulates abscisic acid signaling during germination among Arabidopsis protein phosphatase 2Cs. *Plant Physiology* 140 : 115–26, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16339800>, pMID : 16339800.
- youn Kang J, in Choi H, young Im M, Kim SY (2002) Arabidopsis basic leucine zipper proteins that mediate stress-responsive abscisic acid signaling. *The Plant Cell* 14 : 343–57, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11884679>, pMID : 11884679.
- Zhang H, Ohyama K, Boudet J, Chen Z, Yang J, et al. (2008) Dolichol biosynthesis and its effects on the unfolded protein response and abiotic stress resistance in Arabidopsis. *The Plant Cell* 20 : 1879–98, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18612099>, pMID : 18612099.
- Zhang W, Qin C, Zhao J, Wang X (2004) Phospholipase D alpha 1-derived phosphatidic acid interacts with ABI1 phosphatase 2C and regulates abscisic acid signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 : 9508–13, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15197253>, pMID : 15197253.
- Zheng ZL, Nafisi M, Tam A, Li H, Crowell DN, et al. (2002) Plasma Membrane-Associated ROP10 Small GTPase Is a Specific Negative Regulator of Absciscic Acid Responses in Arabidopsis. *Plant Cell* 14 : 2787–2797, URL <http://www.plantcell.org/cgi/content/abstract/14/11/2787>.
- Zhou A, Wang H, Walker JC, Li J (2004) BRL1, a leucine-rich repeat receptor-like protein kinase, is functionally redundant with BRI1 in regulating Arabidopsis brassinosteroid signaling. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology* 40 : 399–409, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15469497>, pMID : 15469497.
- Zhu JK (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology* 53 : 247–73, URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12221975>, pMID : 12221975.

Annexe 1

Séquence des oligonucléotides utilisés pour la cartographie

Marqueur	Amorce For	Amorce Rev	Ta (°C)	Localisation
NGA 63	AACCAAGGCACAGAAGCG	ACCCAAGTGATCGCCACC	55	I N 3,2 Mb
msat 1.F28H19	CAATCAAGTAGGTAGACTCG	CGATTGTTTGCTAGATATGG	55	I S 20,5 Mb
msat 2.5	TGAGAGGGACAGATAGGAA	TGAGAGGGACAGATAGGAA	50	II N 0,3 Mb
NGA 1126	CGCTACGCTTTTCGGTAAAG	GCACAGTCCAAGTCACAACC	55	II S 11,9 Mb
msat 3.MIL23	CCAGACTGGTTTAATCAGTC	CCAATTTGCCTGTTGTAACC	50	III N 8,0 Mb
msat 3.11	CGCACTCTCTCGCCTAAGTG	CAAATTCCGTGGTCTCGATG	50	III S 20,4 Mb
msat 4.39	GTTATCACATTAAAATCACC	CCAATTGTAATATATGAACA	50	IV N 8,9 Mb
NGA 8	GAGGGCAAATCTTTATTTTCGG	TGGCTTTCGTTTATAAACATCC	50	IV S 4,7 Mb
NGA 139	AGAGCTACCAGATCCGATGG	GGTTTCGTTTCACTATCCAGG	55	V N 8,5 Mb
msat 5.K9I9	GATTCAGAGTTACGGTAACAG	CTATTGACAGTAAAGAGTCCG	50	V S 28 Mb

TAB. 5 – Oligonucléotides des marqueurs microsatellites répartis sur l'ensemble du génome utilisés pour la recherche de liaison ; localisation : numéro du chromosome, bras nord (N) ou bras sud (S) et position sur le chromosome (AGI).

Marqueur	Amorce For	Amorce Rev	Ta (°C)	Position
msat 5.13	GTTTCTTGGCTACTCCCAT	TTTGTGTTGGCTTAGTTCGT	54	21,9 Mb
msat 5.19	AACGCATTTGCTGTTTCCCA	ATGGTTATCTCATCTGGTCT	56	25,9 Mb
msat 5.K8A10	GAAGGTGAAGCCTACCTG	GAGATTTGTGTAAGTCTGAG	48	27,5 Mb

TAB. 6 – Oligonucléotides des marqueurs microsatellites sur le bras sud du chromosome V utilisés pour la cartographie du locus *has1*.

Marqueur	Amorce For	Amorce Rev	Ta (°C)	Position
msat 3.107	AGGGTTTCAACTTAGACG	TAGCCATAGGGTTTAGGG	50	2,1 Mb
MZB10	GGATTTTATGGTCATCTAG	CGAGTTAGTTTACTTGGG	50	2,77 Mb
F14P13	CCTCTCATTGTTTCTGTC	CTCTCTCACTCTGCTTAC	49	3,21 Mb
T7M13	GCAATAAATCAGTGACCA	AGGAAATAAAGGTGAAGG	50	3,35 Mb
F11B9-4	GGCATCTGAGTGACGATC	GCAGAACCTAACCCTAAG	52	3,554 Mb
F24K9-4	GAAGCATCCCTTTCTCCG	GAAATCACTCACACCAAG	52	3,651 Mb
msat 3.116	CTTGCCTTTTGATGATGG	CAAGAAGACCAGTTTTCC	50	3,728 Mb
msat 3.118	TTAATCAATCTAGTGACC	TCGGATGAAATCTAAAGC	46	6,1 Mb
msat 3.MJL14	GTATGTCTGAATCTAAAGTTC	CAACCCAATTTCTGGTCTCC	50	9,9 Mb

TAB. 7 – Oligonucléotides des marqueurs microsatellites situés sur le bras nord du chromosome III utilisés pour la cartographie du locus *has2*.

Marqueur	Amorce For	Amorce Rev	Ta (°C)	Position
ciw 6	CTCGTAGTGCACTTTCATCA	CACATGGTTAGGGAAACAATA	53	7,89 Mb
msat 4.101	TCAGAGTTTCGCAGCAAC	GGTCGGTTATTTCTGGATT	53	8,26 Mb
msat 4.103	GGACTAAGGAGTATGGAC	GTCTAAAAGTTTGTGATG	50	8,65 Mb
msat 4.105	GGATACCTATTTTGTAACG	CGTATTACCCACATACA	50	8,93 Mb
msat 4.15	TTTCTTGTCTTTCCCCTGAA	GACGAAGAAGGAGACGAAAA	50	9,36 Mb
F7J7	CATATGCATGACGGATGTTTTTC	CAATATGGAATATGTTTCACTT	55	11,3 Mb
F17L22-2	CATACATACATGATGTGC	TTCATAACACCAGCATGG	50	11,51 Mb
NGA 1107	GCGAAAAAACAAAAAATCCA	CGACGAATCGACAGAATTAGG	50	17,3 Mb

TAB. 8 – Oligonucléotides des marqueurs microsatellites situés sur le bras sud du chromosome IV utilisés pour la cartographie du locus *has3*.

La région de cartographie du locus *has4* étant assez proche de celle du locus *has3*, les marqueurs msat 4.15 et sont communs aux deux marches chromosomiques ; ils ne sont pas répétés dans le tableau de *has4*.

Marqueur	Amorce For	Amorce Rev	Ta (°C)	Position
F13C5-5	GAAATACAGTTATGGCGG	AAAGGGACAGAGATAGAG	50	10,35 Mb
T18B16-5	AGAAAGAGGTACACCAGG	GGAGGGACTTAATCTTGC	52	10,45 Mb
SNP4	CTCCGTATCCTTTCTTCTCG	GCTCACTACCTCGTTGTGCC	55	10,47 Mb
T18B16-7	CAGTGGACAAAGCAAACCTC	GATATTAGTATCATCTGACG	50	10,51 Mb
T5K18-6	CCTCCATGTGGACGATCC	CAACGGTTTACATAATAC	52	10,58Mb
F24J7-1	TTTTGGTTTGGATTTTGG	TTTGTTACTGGAATATGC	50	10,61 Mb
T16H5-2	CAACTTGGATAAGAATCG	TAACCGTGAAGTAGAATG	55	10,74 Mb
F20B18-2	ATTATTTTGGACTCGACG	TCGTTTATCATGTTTGG	48	13,3 Mb

TAB. 9 – Oligonucléotides des marqueurs microsatellites et SNP situés sur le bras sud du chromosome IV utilisés pour la cartographie du locus *has4*.

Annexe 2

Annotations des gènes cités dans l'analyse transcriptomique d'après www.arabidopsis.org

At1g16210 : similaire à une protéine de la famille des cupines

At1g19250 : monooxygénase dépendante des flavines impliquée dans la défense en réponse aux pathogènes

At1g26390 : protéine endomembranaire à domaine de de liaison au FAD impliquée dans le transport des électrons

At1g30900 : récepteur vacuolaire de tri putatif

At1g33840 : protéine inconnue

At1g33960 : induit par des gènes d'avirulence après une infection par *Pseudomonas syringae*

At1g58270 : protéine endomembranaire inconnue avec un domaine MATH

At1g60960 : membre de la familles isologue des transporteurs de Fe(II), impliqué dans le transport de cations et la réponse aux nématodes

At1g65500 : protéine endomembranaire inconnue

At1g68620 : hydrolase

At1g73260 : protéine mitochondriale de la famille des trypsines et inhibiteurs de protéases

At1g74590 : glutathione transférase impliquée dans le catabolisme des toxines

At1g75040 : protéine similaire à une thaumatine impliquée dans la réponse aux pathogènes

At1g75750 : protéine GAST1 régulée de façon antagoniste par les gibérellines et les brassinostéroïdes, impliquée dans la croissance cellulaire

At2g03760 : protéine similaire à une flavonole sulfotransférase, induite par l'acide salicylique, le méthyl-jasmonate et les attaques bactériennes

At2g04460 : élément transposable

At2g21640 : protéine inconnue impliquée dans la réponse au stress oxydatif

At2g26020 : défensine identique à une protéine antifongique

At2g29350 : SAG13, déshydrogénase à courte chaîne impliquée dans le vieillissement

At2g30695 : protéine chloroplastique inconnue impliquée dans le repliement et le transport des protéines

At2g30770 : cytochrome P450 putatif de la famille 71A impliqué dans la réponse à des pathogènes

At2g41730 : protéine inconnue

At2g43570 : chitinase putative, impliquée dans la formation de la paroi cellulaire, localisée dans l'apoplaste

At2g44240 : protéine inconnue impliquée dans la réponse au stress oxydatif

At2g45220 : protéine de la famille des pectinestérases impliquée dans la modification de la paroi cellulaire

At3g11340 : protéine de la familles des UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transférases

At3g13610 : oxidoréductase de la famille des oxygénases 2OG-Fe(II) impliquée dans la biosynthèse de la coumarine et la mort cellulaire

At3g26830 : enzyme à cytochrome P450 qui catalyse la conversion de l'acide dihydrocamalexique en camalexine, répondant à l'ABA

At3g30720 : protéine inconnue

At3g51860 : CAX3, échangeur de cations vacuolaire impliqué dans l'homéostasie du calcium

At3g57260 : β -1,3-glucanase impliquée dans l'acquisition de la résistance systémique et la réponse au froid

At4g00700 : protéine à domaine C2 de liaison au calcium/lipide

At4g02290 : glycosyl hydrolase endomembranaire impliquée dans le métabolisme des glucides

At4g10920 : co-activateur transcriptionnel impliqué dans l'activation de gènes pendant le développement et la réponse aux pathogènes

At4g11650 : protéine endomembranaire osmotine-like impliquée dans la réponse à des pathogènes

At4g12480 : protéine de transfert des lipides putative répondant à la vernalisation et induite par le froid

At4g12490 : protéine de la famille inhibiteur de protéases/réserves de la graine/ transfert de lipides (LTP)

At4g15610 : protéine membranaire intégrale

At4g28250 : protéine β -expansine/allergène impliquée dans la formation du syncytium

At4g39030 : EDS5, transporteur d'extrusion de toxines, impliqué dans la signalisation de l'acide salicylique pour la réponse aux pathogènes

At5g09570 : protéine chloroplastique inconnue

At5g10140 : FLC, flowering locus C, facteur de transcription à MADS-box impliqué dans la transition florale

At5g24240 : protéine de la famille des phosphatidylinositol 3- et 4-kinases/ ubiquitines

At5g36910 : thionine dont l'expression est faible chez les plantules et régulée par les rythmes circadiens

At5g39520 : protéine chloroplastique inconnue, induite par un stress salin ou osmotique

At5g44420 : défensine, répondant à l'éthylène et au jasmonate impliquée dans la réponse aux pathogènes

At5g51440 : petite protéine heat shock mitochondriale

At5g57560 : enzyme de modification de la paroi cellulaire régulée par des stimuli environnementaux

At5g61140 : protéine avec une DEAD-box et un site de liaison à l'ATP/GTP, similaire à une hélicase à ADN de levure et une hélicase à ARN

ATCG00130 : atpF, sous-unité F d'ATPase

ATCG00140 : atpH, sous-unité de l'ATPase III

ATCG00350 : psaA, protéine formant le centre réactionnel du photosystème I avec psaB

ATCG00500 : accD, sous-unité β de l'acétyl-CoA carboxylase plastidiale, impliquée dans la biosynthèse des acides gras

Annexe 3

Gènes significativement différentiellement exprimés dans la rosette entre *aba3-1* et le sauvage.

Gène	WT/ <i>aba3-1</i>	<i>p</i> -value	Annotation
At2g43570	-4,12	0	chitinase putative
At3g26830	-3,8	0	cytochrome P450 (biosynthèse de la camalexine)
At3g22600	-3,6	0	protéase LTP
At2g18660	-3,53	0	EXLB3, précurseur expansine-like B3 de la paroi cellulaire
At1g02930	-3,33	0	ERD11, glutathione transférase (réponse au stress hydrique)
At4g23150	-3,33	0	protéine kinase endomembranaire
At1g35230	-3,32	0	AGP5, protéine arabinogalactane
At3g57260	-3,27	0	β -1,3, glucanase
At1g75040	-3,22	0	similaire à une thaumatine
At1g33960	-3,16	0	induit par des gènes d'avirulence
At2g46400	-3,12	0	WRKY46, facteur de transcription
At1g57630	-2,95	0	protéine de résistance aux maladies (classe TIR)
At2g18690	-2,93	0	protéine inconnue
At5g13320	-2,92	0	GDG1 (défense contre les pathogènes)
At3g30720	-2,89	0	protéine inconnue
At3g50480	-2,89	0	homologue de RPW8 4
At5g39670	-2,85	0	protéine de liaison au calcium
At5g18470	-2,84	0	similaire à une curculine, de la famille des lectines
At4g00700	-2,81	0	liaison au calcium/ aux lipides
At5g44420	-2,78	0	défensine
At4g39030	-2,76	0	transporteur d'extrusion de toxines
At5g55450	-2,76	0	protéase de la famille LTP
At1g43910	-2,75	0	ATPase de type AAA
At4g12490	-2,75	0	protéase LTP
At5g52760	-2,71	0	protéine à domaine de liaison aux métaux
At4g02380	-2,69	0	AtLEA5
At5g17760	-2,67	0	ATPase de type AAA
At4g23140	-2,65	0	protéine kinase similaire à un récepteur
At5g02490	-2,64	0	protéine apparentée à une heat-shock

Gène	WT/ <i>aba3-1</i>	<i>p</i> -value	Annotation
At5g20230	-2,6	0	BCB, induit par le stress aluminium
At2g24850	-2,59	0	tyrosine aminotransférase, réponse au JA
At4g04500	-2,57	0	kinase identique à un récepteur-like riche en cystéine
At2g29350	-2,57	0	SAG13, déshydrogénase à courte chaîne
At2g30770	-2,56	0	cytochrome P450 71A putatif
At2g26020	-2,55	0	défensine
At4g11890	-2,54	0	protéine kinase
At1g13470	-2,52	0	protéine inconnue
At3g50930	-2,52	0	BCS1 ATPase de type AAA (synthèse du cytochrome BC1)
At5g10140	-2,51	0	FLC
At3g01290	-2,51	0	protéine de la famille band 7
At1g19020	-2,46	0,000001	protéine inconnue
At3g13610	-2,44	0,000001	oxydoréductase
At3g47480	-2,43	0,000001	protéine de liaison au calcium, famille EF hand
At4g14365	-2,43	0,000001	protéine de la famille zinc finger
At5g10760	-2,39	0,000002	aspartyl protéase
At4g21830	-2,38	0,000002	protéine à domaine méthionine sulfoxide reductase
At2g39210	-2,34	0,000004	noduline
At5g26920	-2,34	0,000004	protéine de liaison aux calmodulines
At2g29460	-2,33	0,000005	GST22, glutathione transférase
At2g43590	-2,28	0,000011	chitinase putative
At4g39670	-2,27	0,000015	protéine de liaison/transport des glycolipides
At5g50200	-2,25	0,000018	WR3 transporteur à haute affinité du NO ³⁻ (réponse aux lésions)
At5g38900	-2,24	0,000025	oxidoréductase DSBA
At1g30900	-2,23	0,000028	récepteur vacuolaire de tri putatif
At1g72060	-2,21	0,000039	inhibiteur d'aendopeptidase de type sérine
At2g32680	-2,18	0,000061	protéine de réponse aux maladies
At3g56710	-2,18	0,000068	SIB1 protéine de liaison à Sig1T4
At5g60950	-2,18	0,000058	COBL5, précurseur de COBRA-like
At3g25010	-2,17	0,000073	protéine de réponse aux maladies
At4g03450	-2,17	0,00008	protéine à répétition d'ankirines
At1g68620	-2,15	0,000101	hydrolase
At2g35980	-2,14	0,000115	YLS9 impliquée dans la sénescence
At1g65500	-2,13	0,000137	protéine endomembranaire inconnue
At1g15670	-2,12	0,000162	protéine F-box à répétitions de kelch
At1g78410	-2,12	0,000158	protéine à motif VQ
At1g80840	-2,12	0,000178	WRKY40, facteur de transcription induit par les pathogènes
At5g37600	-2,12	0,000162	GLN1, glutamine synthétase cytosolique

Gène	WT/ <i>aba3-1</i>	<i>p</i> -value	Annotation
At5g01540	-2,1	0,000235	kinase de lectine
At2g41100	-2,08	0,000316	AtCAL4 calmoduline-like
At3g01830	-2,08	0,000299	protéine de type calmoduline putative
At3g26210	-2,08	0,000305	cytochrome P450 putatif
At2g02930	-2,07	0,000364	GST16, glutathione transnférase
At5g40780	-2,07	0,00037	LHT1, transporteur d'histidine lysine
At5g52750	-2,06	0,00044	protéine de type association aux métaux lourds
At1g10340	-2,05	0,000471	protéine à répétition d'ankirines
At4g28390	-2,04	0,000581	AAC3, transporteur d'ADP/ATP mitochondrial
At5g24530	-2,03	0,000664	DMR6, oxygénase 2OG-Fe(II) putative
At1g73805	-2,02	0,000788	protéine de liaison aux calmodulines
At4g23810	-2,02	0,000767	WRKY53, facteur de transcription
At2g43510	-1,97	0,001679	protéine de la famille défensine-like
At3g45860	-1,95	0,002253	protéine kinase récepteur-like
At2g38470	-1,94	0,002721	WRKY33, facteur de transcription (réponse aux pathogènes)
At4g23220	-1,94	0,002514	protéine kinase
At5g45380	-1,94	0,002485	symporteur sodium : soluté
At2g04450	-1,92	0,003349	ATNUDT6, ADP-ribose diphosphatase
At5g64000	-1,91	0,004055	nucléotidase 3'(2'), 5'-bisphosphatase putative
At3g13790	-1,9	0,004525	ATCWINV1, invertase de la paroi cellulaire
At1g61800	-1,89	0,005385	GPT2, transporteur de glucose-6-phosphate/phosphate
At3g11010	-1,88	0,006352	ATRLP19, kinase de type récepteur (réponse aux maladies)
At1g45145	-1,87	0,00682	ATH5, thioréductine cytosolique
At4g17670	-1,87	0,007379	protéine associée à la sénescence
At3g48650	-1,85	0,009645	pseudogène
At3g60420	-1,85	0,009263	protéine inconnue
At5g20960	-1,85	0,009887	AAO1, aldéhyde oxydase (synthèse de l'auxine)
At1g66690	-1,84	0,010351	S-adénosyl-L-méthionine
At1g74710	-1,83	0,013389	EDS16, activité isochorismate synthase, synthèse du SA
At4g31800	-1,81	0,016714	WRKY18, facteur de transcription induit par les pathogènes
At3g52430	-1,79	0,02274	PAD4, lipase-like, impliqué dans la signalisation du SA
At2g04430	-1,78	0,026301	ATNUDT5, hydrolase
At2g40140	-1,78	0,024061	CZF1, facteur de transcription
At1g26380	-1,77	0,027194	protéine à domaine de liaison au FAD
At1g35710	-1,77	0,02796	protéine kinase à répétitions riches en leucines
At2g29120	-1,77	0,030133	GLR2.7, canal putatif d'ions (homéostasie du calcium)
At2g17040	-1,75	0,036978	ANAC034/035, facteur de transcription
At3g09270	-1,75	0,035819	ATGSTU8, glutathione transférase

Gène	WT/ <i>aba3-1</i>	<i>p</i> -value	Annotation
At3g25610	-1,75	0,035492	hydrolase de type haloacide déhalogénase
At2g31880	-1,74	0,043354	protéine à répétitions riches en leucines putative
At1g60960	2,72	0	famille des transporteurs de Fe(II)
At1g58270	2,29	0,00001	protéine endomembranaire à domaine MATH
At1g02205	2,17	0,000069	CER1, impliqué dans la production de cire
At2g42540	2,04	0,00059	COR15A (réponse aux stress froid et osmotique)
At1g26210	2	0,00104	protéine inconnue
At2g30695	1,94	0,002474	impliqué dans le repliement et le transport des protéines
At5g23750	1,91	0,004037	protéine de la famille remorine de liaison à l'ADN
At5g01520	1,82	0,014115	protéine à zinc finger
At4g30610	1,77	0,029244	BRS1, synthèse des brassinostéroïdes

TAB. 11 – Gènes significativement différentiellement exprimés dans la rosette chez *aba3-1* par rapport au sauvage. WT/*aba3-1* : rapport en log2 des niveaux d'expression du sauvage et d'*aba3-1*.

Résumé

L'acide abscissique (ABA) est une hormone cruciale pour la tolérance des plantes au déficit hydrique. Son accumulation induit rapidement à la fois la fermeture stomatique qui limite les pertes en eau et l'expression de gènes qui participent à des processus de protection et détoxification des cellules. La thermographie infrarouge permet d'observer en temps réel la différence de température entre des plantes « froides » aux stomates ouverts et des plantes « chaudes » aux stomates fermés. Afin d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans la réponse au déficit hydrique, cette technique a été utilisée pour rechercher des suppresseurs « chauds » de la mutation de déficience en ABA *aba3-1* chez *Arabidopsis thaliana*. Quatre mutants suppresseurs « chauds » récessifs, nommés *has aba3-1* (*hot ABA-deficient suppressors*), plus résistants qu'*aba3-1* à une déshydratation progressive ont été isolés et étudiés. Leur meilleure tolérance au stress hydrique n'est pas due à une accumulation accrue d'ABA. Des analyses phénotypiques et transcriptomiques ont été effectuées, notamment pour étudier leur réponse à différents types de stress hydrique et à un stress biotique et leur sensibilité à l'ABA dans plusieurs tissus. Les mutations *has* ont été sélectionnées en l'absence de la mutation *aba3-1* et certains phénotypes ont été étudiés dans ce fond sauvage. La mutation *has1* semble complexe, entraînant la disruption d'un gène codant pour une hélicase à ARN putative dont la mutation n'est pas seule responsable de tous les phénotypes de *has1 aba3-1*. La mutation *has2* diminue la perte en eau pendant une déshydratation rapide ou progressive, en contexte *aba3-1* ou sauvage. Son analyse transcriptomique a montré que le niveau d'expression de l'ensemble des gènes était proche du sauvage en accord avec la suppression de la sensibilité au déficit hydrique. La mutation *has3* semble induire une hypersensibilité à l'ABA au niveau des stomates et de la graine. Enfin, le suppresseur *has4 aba3-1* est affecté dans la sensibilité à l'ABA pour tous les tissus testés et montre les phénotypes stomatiques les plus marqués des quatre suppresseurs, qui semblent conservés chez *has4*. Ces observations ont conduit à cartographier en priorité ce locus. L'étude des 32 gènes de son intervalle de cartographie est bien avancée et devrait prochainement permettre d'identifier lequel est muté. La cartographie des loci *has2* et *has3* a réduit la région contenant ces mutations à des zones d'environ 0,5 et 1 Mb respectivement. Les quatre loci *has* sont distincts et leurs régions de cartographie ne contiennent pas de gènes déjà étudiés dont la mutation correspondrait à leur phénotype. Ce projet devrait donc conduire à l'identification d'au moins trois nouveaux gènes intervenant dans la tolérance au déficit hydrique.

Mots-clés : *Arabidopsis*, ABA, déficit hydrique, mutants, cartographie.

Abstract

Abscissic acid (ABA) is crucial for plant water deficit tolerance. Its accumulation rapidly stimulates stomatal closure thus limiting water loss and induces the expression of genes involved in cellular protection and detoxification. Infrared thermography allows real-time observation of temperature differences between « cold » plants with open stomata and « hot » plants with closed stomata. In order to identify new genes involved in the response to water deficit, this technique had been used in an ABA-deficient mutant *aba3-1* « hot » suppressor screen in *Arabidopsis thaliana*. Four « hot » recessive suppressor mutants, named *has aba3-1* (*hot ABA-deficient suppressors*), more resistant than *aba3-1* to a progressive dehydration had been isolated and were studied. ABA measurements showed that their phenotypes were not explained by increased ABA accumulation. Their biometric, water and biotic stress responses were examined as well as ABA-sensitivity in several tissues. In addition, microarray analysis of non-stressed leaf expression profiles was carried out. The *has* mutations have been selected without the *aba3-1* mutation and some phenotypes have been examined in this wild-type background. The *has1* mutation seems complex, causing the disruption of a gene coding for a putative RNA helicase, the mutation of which does not explain all of the *has1 aba3-1* phenotypes. The *has2* mutation decreases water loss on both rapid and prolonged water deficit in both wild-type and *aba3-1* contexts. Transcriptome analyses showed that gene expression in the *has2 aba3-1* mutant is close to that of wild-type in agreement with the suppression of *aba3-1* sensitivity to water deficit. The *has3* mutation seems to induce ABA hypersensitivity in stomata and seeds. Finally, *has4 aba3-1* has modified ABA sensitivity in all tissues tested and has the strongest suppression of water deficit phenotype of the four suppressors; these seem to be conserved in *has4*. Based on these characteristics, this locus was selected in priority for mapping. The analysis of the 32 genes within the mapping interval is well underway and the mutated gene should be identified soon. *has2* and *has3* loci mapping has identified intervals of 0.5 and 1 Mb respectively. The four *has* loci are distinct and their mapping regions do not contain any previous studied gene in which a mutation would match their phenotypes. This project should lead to the identification of at least three new genes involved into water deficit tolerance.

Key-words : *Arabidopsis*, ABA, water deficit, mutants, mapping.