



**HAL**  
open science

# Identification et caractérisation de gènes impliqués dans la variation de caractères quantitatifs affectés par la sécheresse chez le maïs

Laetitia Rennesson Virlouvét

## ► To cite this version:

Laetitia Rennesson Virlouvét. Identification et caractérisation de gènes impliqués dans la variation de caractères quantitatifs affectés par la sécheresse chez le maïs. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2011. Français. NNT : 2011PA112048 . tel-00738024

**HAL Id: tel-00738024**

**<https://theses.hal.science/tel-00738024>**

Submitted on 3 Oct 2012

**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.



ORSAY  
N° d'ordre :

UNIVERSITE PARIS-SUD 11  
U.F.R. SCIENTIFIQUE D'ORSAY

**THESE**

présentée pour obtenir le grade de

**DOCTEUR ES SCIENCES  
DE L'UNIVERSITE PARIS-SUD 11**

par

**Laetitia Virlouvét**

*Soutenue le 21 avril 2011*

**Identification et caractérisation de gènes impliqués  
dans la variation de caractères quantitatifs affectés  
par la sécheresse chez le maïs**

Devant la commission d'examen formée de :

Madame **Sylvie COURSOL**

Encadrant

Monsieur **Michel DRON**

Examineur

Monsieur **Bart PANIS**

Rapporteur

Monsieur **Peter ROGOWSKY**

Examineur

Madame **Dominique THIS**

Rapporteur

Monsieur **Michel ZIVY**

Directeur de thèse

## REMERCIEMENTS

En premier lieu, je tiens à remercier Michel et Sylvie de m'avoir accueillie en stage de Master, initiée à la protéomique, et surtout, confiée ce sujet de thèse si vaste, mais tellement passionnant. Votre encadrement m'a énormément permis de progresser tant sur le plan scientifique que sur le plan humain. Merci, de m'avoir guidée dans les réflexions pour la mise en place des manip et l'analyse des résultats, tout en me laissant faire mes propositions, encore souvent incomplètes et erronées. Merci Sylvie pour ta disponibilité, ton encadrement, tes relectures (très nombreuses de part mon niveau !) et surtout pour ton immense soutien à tous les moments critiques (très nombreux !! et qui tombaient toujours en même temps qu'un résultat à analyser !), notamment lors de la préparation des comités de thèse et des communications, en particulier celles de l'Ecole Européenne de Protéomique et du colloque de la FESBP.

Je remercie très chaleureusement les membres du jury, Dominique This et Bart Panis, pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail, ainsi que Peter Rogowsky et Michel Dron pour avoir accepté de le juger.

Je remercie également Christiane Laurière, Loïc Lepiniec et Michel Rossignol pour leur présence lors des comités de thèse, qui a permis de soulever des discussions scientifiques intéressantes et leur aide au cours de ce travail.

Evidemment, je remercie tous les membres de l'équipe GQMP, présents et passés, ainsi que la plateforme PAPPSO pour m'avoir permis de me sentir intégrée et appréciée dès mon arrivée, ainsi que pour avoir été toujours disponible quand j'avais besoin d'aide ou de conseils. Un grand merci particulier à Hélène qui a pris en charge la majorité des gels 2D et des Western blot, me permettant ainsi de gagner un temps incommensurable. Un grand merci également à Marpie pour tous ses conseils au labo et ses longues discussions en fin de journée, particulièrement pendant la rédaction, qui m'ont permis d'émettre un grand nombre d'idées que je ne me soupçonnais même pas d'avoir. Je n'oublie pas les stagiaires, William Bouard et Thomas Vain, dont l'encadrement a été une expérience très enrichissante. Merci à Ludovic pour avoir participé à l'encadrement de Thomas et pour tous ses conseils. Merci également à Anne, Carine, Jacques et Matthieu pour leur aide en biologie moléculaire.

Je voudrais également remercier l'ensemble des collaborateurs. Merci à Catherine Damerval pour son aide pour les analyses phylogénétiques (qui ne sont pas encore totalement terminées !!) et les relectures, Claude Welcker pour avoir initié le projet « QTL » avec l'équipe et ses remarques pendant sa réalisation. Je souhaite remercier

l'ensemble du personnel de la société Biogemma, en particulier Jean-Philippe Pichon pour l'analyse transcriptomique, Christophe Sallaud, Denise Gerentes, Jacques Rouster et Ingrid Doridant pour la production et la caractérisation des plantes transgéniques. Je remercie Sébastien Mongrand, René Lessire et Laetitia Fouillen du laboratoire de Biogenèse membranaire de Bordeaux, Valérie Méchin et Brigitte Pollet du Laboratoire Lignine et Tanin de Versailles, Graham Noctor, Guillaume Tcherkez et Françoise Gilard de la plateforme dMétabolisme-Métabolome d'Orsay pour leur savoir-faire et leurs conseils. Je souhaite également remercier Emmanuelle Issakidis-Bourguet, Martine Thomas, Pierre Crozet et Thomas Guérinier de l'IBP, ainsi que Philippe Robin de l'institut de Biochimie et Biophysique Moléculaire et Cellulaire, pour leur accueil chaleureux, leurs conseils pour l'utilisation des machines et le don de matériels très utiles pour mes analyses.

Je souhaite également remercier l'ensemble des membres, présents et passés de la ferme du Moulon, et en particulier Dominique de Vienne pour m'avoir accueilli dans son unité. Merci à toutes les personnes qui m'ont donnée un conseil même le plus infime. Merci à Olivier et Sylvie pour m'avoir permis de profiter de leur bureau mais aussi à Michel et Benoît et les « filles » pour le début de mon stage. Merci à Olivier pour toute son aide sur les quelques « bugs » informatiques (oui, tu arriveras à mettre tout le monde de la protéomique sur Protic !! et maintenant que j'ai fini je vais prendre le temps de mettre mes dernières manip !). Merci à l'ADAS et surtout aux responsables au Moulon, Nathalie et Sophie, pour les activités proposées qui m'ont permis de faire des pauses et de pouvoir reprendre avec plus d'élan quand la fatigue se faisait sentir. Merci principalement à Hélène qui m'a permis de me muscler afin de pouvoir soulever tout le matériel très « léger » de la 2D et surtout de tenir plus d'une journée avec une pipette à la main sans avoir peur de perdre mon bras tout menu. Merci à toutes les filles du club mosaïque pour m'avoir initiée à cette activité manuelle que je ne connaissais pas et pour tous les moments plein de rires. Un merci particulier à Valérie pour nos échanges gastronomiques (ne baisse pas les bras, tu auras le dernier mot sur les macarons, sûr !!). Et merci à tous ceux que j'ai oublié et qui ont participé, de près ou de loin, à ce travail.

Pour terminer, je voudrais remercier ma famille pour m'avoir toujours encouragée et soutenue. Merci à ma Maman pour avoir relu l'introduction de mon manuscrit même si elle ne comprenait pas tout. Et un énorme merci à Florian pour avoir été présent tout au long de mes études, m'avoir supportée et soutenue dans les moments les plus dur, et surtout pour avoir cru en moi depuis le début et encore maintenant pour la suite.

## ABREVIATIONS

2D	Gel d'électrophorèse bidimensionnel
°C	Degré Celsius
ABA	Acide Abscissique
ABAR	« ABA receptor »
ABF	« ABRE binding factor »
ABQA	« Advanced backcross QTL analysis »
ABRE	« ABA responsive element »
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADNg	ADN génomique
APX	Ascorbate peroxidase
AREB	« ABRE-binding protein »
ARN	Acide ribonucléique
ASI	« Anthesis-silking interval »
ASR	« ABA-, stress- and ripening-induced protein »
ATP	Adénosine tri-phosphate
BAC	« Bacterial Artificial chromosome »
BCAA	« Branched chain amino acid »
BCAT	« Branched chain amino transferase »
BSS1	« Bundle sheath strands 1 »
bZIP	« Basic region leucine zipper domain »
C <sub>3</sub>	Métabolisme photosynthétique générant un acide à 3 carbones
C <sub>4</sub>	Métabolisme photosynthétique générant un acide à 4 carbones
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CaM	Calmoduline
CAPS	« Cleaved amplified polymorphoc sequence »
CBL	« Calcineurines-B like »
CCaM	« Calcium/Calmoduline-dependant kinase »
CDPK	« Calcium-dependant protein kinase »
ChIP	« Chromatin ImmunoPrecipitation on Chip »
CIMMYT	Centre International pour l'Amélioration du Maïs et du Blé
Cl <sup>-</sup>	Chlore
cM	Centimorgan
CNRS	Centre National de la Recherche Scientifique
Coll.	Collaboration
CSP	« Cold shock protein »
DIM	« Detergent insoluble membrane »
DRE	« Dehydration responsive element »
DREB	« DRE binding element »
DTT	Dithiotréitol
eQTL	Expression Quantitative Trait Loci
ENR	Enoyl-ACP reductase
FDR	False discovery rate
GC-FID	Chromatographie à phase gazeuse avec détection par ionisation de flamme
GFP	Protéine fluorescente verte
GP	Grand prélèvement de sang
GQMP	Génétique Quantitative Moléculaire et Protéomique
Grx	Glutaredoxine
GTG	Protéine hétérotrimérique de type G
HK	Histidine kinase

HOG	« High-osmolarity glycerol »
HSP	« Heat shock protein »
HTGS	« High throughput genomic sequences »
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxyde d'hydrogène
ICC	« Intergovernmental panel on climate change »
IAM	Iodoacétamine
INRA	Institut National de Recherche Agronomique
IP	Inositol phosphate
IPMDH	Isopropylmalate dehydrogenase
IPTG	β-D-1-thiogalactopyranoside
JAP	Jour après pollinisation
K <sup>+</sup>	Potassium
LC-MS/MS	Liquide chromatographie-MS/MS
LEA	« Late embryogeneses abundant »
LTRE	« Low temperature responsive element »
MAPK	« Mitogen-activated protein kinase »
MAPKK	MAPK kinase
MAPKKK	MAPKK kinase
MIP	« major intrinsic protein »
MPa	MégaPascal
MPT	Modification post-traductionnelle
MS	Spectrométrie de masse
MYB	« Myeloblastosis oncogen »
MYC	« Myelocytomatosis oncogen »
NAC	« NAM, ATAF1,2,CUC2 »
NACR	« NAC recognition site »
NEM	N-éthylmaleimide
NILs	« Nearly isogenic lines »
NLS	« Nuclear localisation signal »
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Radicaux superoxide
OGM	Organisme génétiquement modifié
PCR	« Polymerase Chain Reaction »
PEG	Polyéthylène glycol
PEPC	Phosphoenolpyruvate carboxylase
pH	Potentiel hydrogène
PHS	Propyzamide hypersensitive
pI	Point isoélectrique
PIP	« Phosphatidylinositol phosphate »
PIP2	« Phosphatidylinositol phosphate kinase »
PQL	« Protein Quantity Loci »
PLC	Phospholipase C
PPase	Phosphatase de phosphoprotéine
PPi	Sérum pré-immun
PTPase	Phosphatase de phosphotyrosine
PWP	« Permanent wilting point »
PYL	« Protéine pyrabactin resistance-like »
PYR	« Protéine pyrabactin resistance »
qRT-PCR	« Quantitative Reverse Transcriptase-PCR »
QTL	« Quantitative Trait Locus »
RCAR	« Regulatory component of ABA receptor »
RFLP	« Restriction fragment length polymorphism »
ROS	« Reactive oxygen species »

RT	« Reverse transcription »
RWC	« Relative water content »
SAM	Selection assistée par marqueurs
SBPase	Sedoheptulose-1,7-bisphosphate
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SNF	« Sucrose non-fermenting »
SnRK	« SNF1-related kinase »
SOD	Superoxide dismutase
T / NT	Transformé / non transformé
T0	Transformant primaire
T1	Transformant de première génération
TE	Thiosterase
TIP	« Tonoplast intrinsic protein »
TPX	« Thioredoxin dependent peroxidase »
Trx	Thioredoxine
UMR	Unité Mixte de Recherche
VPD	Vapor pressure deficit
WMO	Organisation mondiale de météorologie
WUE	Water use efficiency

# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>A. La sécheresse chez les plantes.....</b>	<b>1</b>
<b>1. La sécheresse : définitions et risques liés au changement climatique.....</b>	<b>1</b>
1.1. Définition de la sécheresse.....	1
1.2. Changement climatique et risques de sécheresse.....	1
1.3. Stratégies mises en place face à la sécheresse.....	2
1.4. L'efficacité de l'utilisation de l'eau.....	3
<b>2. Les mécanismes physiologiques impliqués dans la réponse à la sécheresse.....</b>	<b>4</b>
2.1. La fermeture stomatique.....	4
2.2. La modification de la conductivité hydraulique.....	5
2.3. L'ajustement osmotique.....	5
2.4. La réduction de la croissance des parties aériennes.....	5
<b>3. Les mécanismes moléculaires impliqués dans la réponse à la sécheresse.....</b>	<b>6</b>
3.1. La perception du signal.....	6
3.2. La transduction du signal.....	7
3.2.1. Les glycérolipides.....	7
3.2.2. Le calcium.....	8
3.2.3. Les espèces réactives de l'oxygène.....	8
3.2.4. Les protéines kinases.....	9
3.2.5. Les protéines phosphatases.....	10
3.3. Les facteurs de transcription.....	10
3.3.1. Les facteurs de transcription dépendants de l'ABA.....	11
3.3.2. Les facteurs de transcription indépendants de l'ABA.....	12
3.4. Les fonctions des gènes induits par la sécheresse.....	12
3.4.1. Les aquaporines.....	12
3.4.2. Les protéases.....	13
3.4.3. La détoxification.....	13
3.4.4. Les protéines HSP.....	14
3.4.5. Les protéines LEA.....	14
<b>4. La sensibilité du maïs à la sécheresse.....</b>	<b>17</b>
4.1. La sensibilité du maïs à la sécheresse au stade reproducteur.....	17
4.2. La sensibilité du maïs à la sécheresse lors du développement végétatif.....	18
<b>B. L'amélioration de la réponse à la sécheresse.....</b>	<b>18</b>
<b>1. La transgénèse.....</b>	<b>19</b>
1.1. La transgénèse : définition et méthodologies.....	19
1.2. La transgénèse comme outil de connaissance de la fonction des gènes.....	20
1.3. La transgénèse comme outil pour l'amélioration de la tolérance à la sécheresse.....	21
<b>2. La sélection génétique « classique ».....</b>	<b>22</b>
2.1. La production d'hybrides plus tolérants à la sécheresse.....	22
2.2. Les ressources génétiques.....	23
<b>3. La sélection assistée par marqueurs.....</b>	<b>23</b>
3.1. La SAM : définition et exemples d'application.....	23
3.2. Un modèle éco-physiologique stable pour identifier des QTL de réponse à la sécheresse.....	25
3.3. Identification des régions chromosomiques conférant le phénotype.....	26
3.3.1. Le clonage positionnel.....	26
3.3.2. La stratégie gènes et protéines candidats.....	27
<b>C. Présentation du travail de thèse.....</b>	<b>28</b>

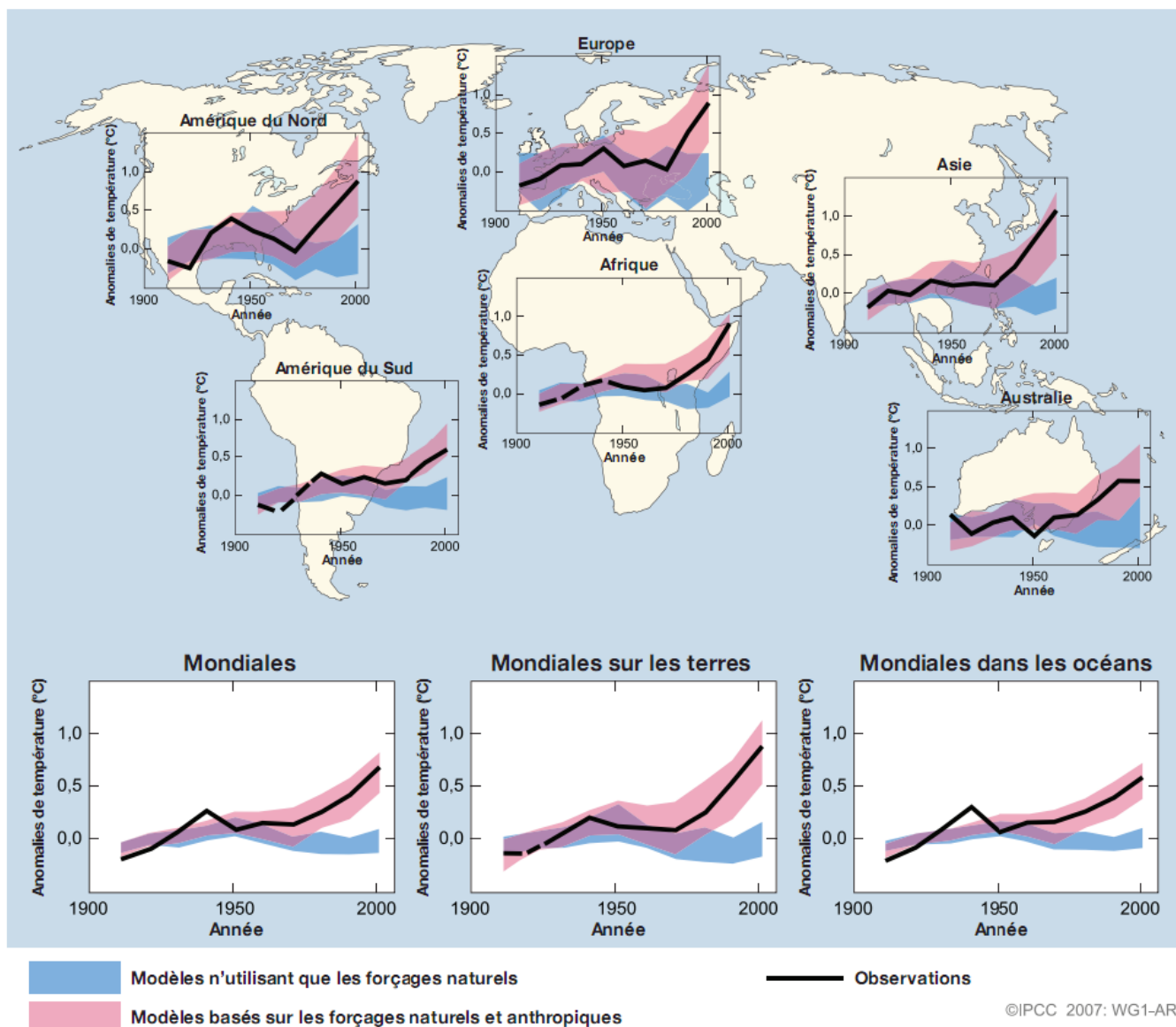


<b>CHAPITRE 1. IDENTIFICATION DE GENES ET DE PROTEINES CANDIDATS ASSOCIES A UNE REGION CHROMOSOMIQUE CONTENANT DES QTL DE REPONSES DE LA CROISSANCE FOLIAIRE ET DE LA PROTANDRIE AU DEFICIT HYDRIQUE.....</b>	<b>29</b>
<b>1. Objectif.....</b>	<b>29</b>
<b>2. Publication 1. Transcriptomic and proteomic profiling of bulked recombinant maize inbred lines highlight the importance of the monolignol and fatty acid biosynthetic pathways for responses of leaf growth and anthesis-silking interval to water deficit.....</b>	<b>31</b>
Abstract.....	33
Introduction.....	34
Results.....	36
Strategy to identify candidate genes in the targeted QTL region by bulked segregant-based analysis.....	36
The transcriptomics analysis reveals seven candidate genes.....	37
<i>ZmMYB31</i> expression correlated with that of monolignin-related target genes and with lignin monomeric composition and structure.....	39
The proteomic analysis reveals three candidate proteins.....	40
Identification of an additional candidate gene, <i>ZmFatA</i> , encoding a protein partner of the candidate protein <i>ZmENR1</i> .....	41
Discussion.....	42
Transcriptomic and proteomic analyses identified distinct candidate genes.....	42
Changes in expression and metabolite composition in relation to the maize leaf developmental gradient.....	43
The two candidate genes undergoing regulation by water deficit are involved in protein and lignin biosyntheses.....	45
Changes in the FA biosynthetic pathway between the two bulks of RILs.....	48
Conclusion.....	49
Methods.....	50
Acknowledgments.....	54
References.....	54
Supplemental data.....	74
<b>3. Supplément expérimental : production et caractérisation de plantes de maïs transgéniques sur-exprimant les gènes candidats <i>ZmMYB31</i> et <i>ZmFatA</i>.....</b>	<b>80</b>
3.1. Production des souches d'agrobactérie utilisées pour la transformation du maïs et contenant les gènes candidats <i>ZmMYB31</i> et <i>ZmFatA</i> .....	80
3.2. Sélection des lignées transgéniques primaires.....	81
3.3. Caractérisation des lignées transgéniques T1.....	82
3.3.1. Analyse de cinétiques de dessèchement des plantes T1.....	82
3.3.2. Abondance relative du transgène dans les plantes T1.....	83
3.4. Conclusion.....	83
<b>4. Discussion générale.....</b>	<b>85</b>
<b>5. Perspectives.....</b>	<b>88</b>
<b>CHAPITRE 2. CARACTERISATION FONCTIONNELLE DE LA PROTEINE CANDIDATE ZMASR1 ET ANALYSE DES MECANISMES DE REGULATION DES GENES ZMASR.....</b>	<b>90</b>
<b>1. Objectif.....</b>	<b>90</b>
<b>2. Implication de la protéine <i>ZmASR1</i> dans la régulation de la biosynthèse des acides aminés branchés et le maintien du rendement en condition de sécheresse.....</b>	<b>91</b>
2.1 Publication 2 : The <i>Zea mays</i> abscisic acid-, stress- and ripening-induced protein <i>ZmASR1</i> influences branched-chain amino acid biosynthesis and maintains kernel yield under water-limited condition in maize.....	91
Abstract.....	92
Introduction.....	93

<i>Results</i> .....	95
<i>ZmASR1</i> belongs to the maize <i>ASR</i> gene family that consists of at least nine members.....	95
Response of <i>ZmASR</i> transcript levels to water deficit and water stress-related treatments.....	97
<i>ZmASR1</i> is the primary detectable <i>ZmASR</i> protein responding to water deficit in leaves.....	98
Ectopic expression of <i>ZmASR1</i> maintains kernel yield under water-limited conditions.....	99
Transcriptomic, proteomic and metabolic adjustments in <i>ZmASR1</i> -OE plants...100	
<i>ZmASR1</i> -OE influences the expression of additional BCAA- and Pro-related target genes and a specific combination of metabolites.....	101
<i>Discussion</i> .....	102
Expression of <i>ASR</i> genes in response to water deficit in maize and other Poaceae species.....	102
<i>ZmASR1</i> maintained kernel yield under water deficit condition through a set of low-molecular-weight metabolites related to growth rate.....	104
Influence of <i>ZmASR1</i> on the expression of genes involved in BCAA biosynthesis.....	106
<i>Methods</i> .....	108
<i>Acknowledgments</i> .....	114
<i>References</i> .....	115
<i>Supplemental data</i> .....	137
2.2. Supplément méthodologique.....	152
<b>3. Suppléments expérimentaux et méthodologiques.....</b>	<b>154</b>
3.1. Etude de l'impact de la sur-expression du gène <i>ZmASR1</i> sur la régulation redox de la protéine <i>ZmIPMDH</i> .....	154
3.1.1. Introduction.....	154
3.1.2. Mise au point de conditions expérimentales permettant de visualiser les protéines <i>IPMDH</i> sous leurs formes réduites et oxydées.....	155
3.1.3. Influence de la protéine <i>ZmASR1</i> sur la régulation redox des protéines <i>IPMDH</i> chez le maïs .....	156
3.1.4. Conclusion.....	157
3.2. Mise en évidence de modifications post-traductionnelles par phosphorylation chez les protéines <i>ZmASR</i> .....	157
3.2.1. Introduction.....	157
3.2.2. Développement d'outils biochimiques pour étudier les MPTs des protéines <i>ZmASR</i> .....	158
3.2.2.1. Caractérisation des anticorps anti-famille <i>ASR</i> et anti <i>ZmASR1</i> .....	158
3.2.2.2. Caractérisation des protéines <i>GST-ZmASR1</i> et <i>ZmASR1</i> .....	160
3.2.3. Identification de sites de phosphorylations <i>in vitro</i> chez la protéine <i>ZmASR1</i> .....	161
3.2.4. Mise en évidence de phosphorylations <i>in vivo</i> chez les protéines <i>ZmASR</i> .162	
3.2.4.1. Analyse de fractions foliaires enrichies en phosphoprotéines à l'aide de l'anticorps anti- <i>ZmASR1</i> .....	162
3.2.4.2. Identification de sites de phosphorylation <i>in vivo</i> chez les protéines <i>ZmASR2</i> et <i>ZmASR3</i> .....	164
3.2.5. Conclusion.....	164
3.3. Matériel et méthodes.....	165
3.3.1. Matériel végétal et conditions de cultures.....	165
3.3.2. Protéines recombinantes et anticorps.....	165
3.3.3. Extraction et dosage des protéines en condition native.....	167

3.3.4. Analyses par électrophorèse monodimensionnelle.....	167
3.3.5. Western blot.....	168
3.3.6. Immunoprécipitation.....	168
3.3.7. Essai de phosphorylation <i>in vitro</i> .....	169
3.3.8. Digestion enzymatique des protéines en solution.....	171
3.3.9. Diméthylation des peptides sur colonnes.....	171
3.3.10. Enrichissement en phosphoprotéines.....	172
3.3.11. Enrichissement en phosphopeptides.....	172
3.3.12. Analyse des peptides par spectrométrie de masse.....	173
3.3.13. Visualisation de l'état redox des protéines.....	174
<b>4. Discussion générale et perspectives.....</b>	<b>175</b>
4.1. Analyse fonctionnelle de la protéine ZmASR1 par phénotypage au champ et caractérisation de ses cibles nucléiques, protéiques et métabolomiques .....	175
4.1.1. Effet de la protéine ZmASR1 sur le rendement au champ.....	175
4.1.2. Identification de gènes dont l'expression est affectée par la sur-expression du gène <i>ZmASR1</i> .....	176
4.1.3. Perspectives.....	177
4.2. Etude des mécanismes de régulation des gènes <i>ZmASR</i> .....	179
4.2.1. Analyse phylogénétique de la famille <i>ZmASR</i> .....	179
4.2.2. Mise en évidence d'une régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle des gènes <i>ZmASR</i> .....	180
4.2.3. Mise en évidence d'une phosphorylation des protéines ZmASR .....	181
4.2.4. Perspectives.....	183
<b>CONCLUSION GENERALE.....</b>	<b>185</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>186</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>201</b>
<i>Annexe 1. Brevet d'invention : obtention de plantes ayant une tolérance améliorée à un déficit hydrique grâce à un facteur de transcription R2R3-MYB de la sous-famille 4..</i>	<i>201</i>
<i>Annexe 2. Brevet d'invention : obtention de plantes ayant une tolérance améliorée à un déficit hydrique grâce à une protéine TE (acyl-ACP thioesterase) de type FatA.....</i>	<i>222</i>
<i>Annexe 3. Identification des sites de phosphorylation des protéines ZmASR2 et ZmASR3.....</i>	<i>246</i>

## **INTRODUCTION**



**Figure 1. Evolution des températures en surface aux échelles mondiale et continentale (d'après l'IPCC, 2007).** Les moyennes décennales des observations effectuées de 1906 à 2005 (ligne noire) sont reportées au centre de chaque décennie et sont relatives à la moyenne correspondante pour la période 1901–1950. Les lignes en pointillés sont utilisées lorsque la couverture spatiale est inférieure à 50%. Les bandes bleues représentent l'intervalle compris entre 5 et 95% pour 19 simulations de cinq modèles climatiques qui n'utilisaient que les forçages naturels produits par l'activité solaire et volcanique. Les bandes roses représentent l'intervalle compris entre 5 et 95% pour 58 simulations provenant de 14 modèles climatiques utilisant des forçages à la fois naturels et anthropiques.

---

## INTRODUCTION

### A. La sécheresse chez les plantes

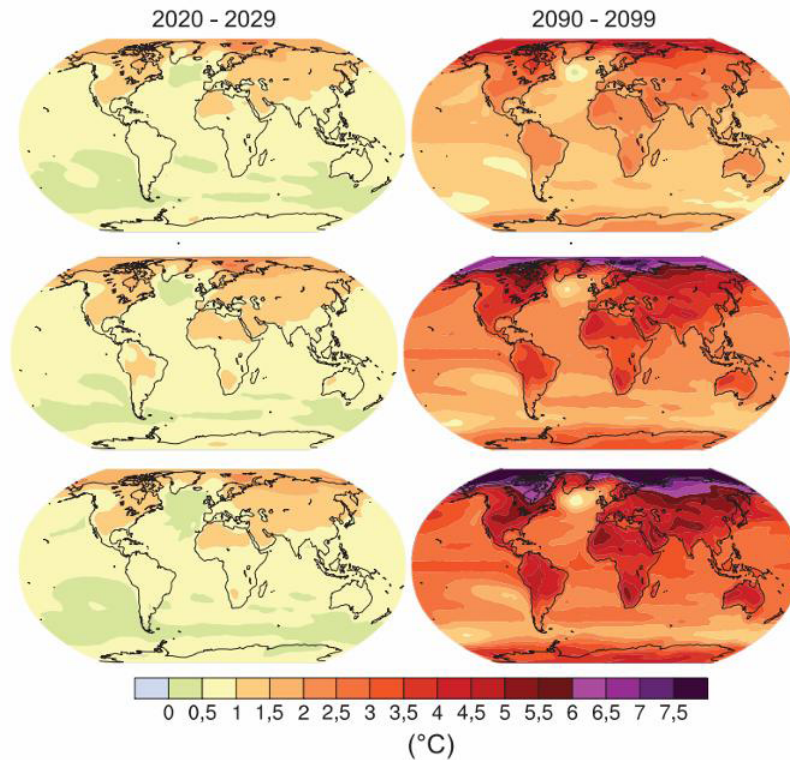
#### 1. La sécheresse : définitions et risques liés au changement climatique

##### *1.1. Définition de la sécheresse*

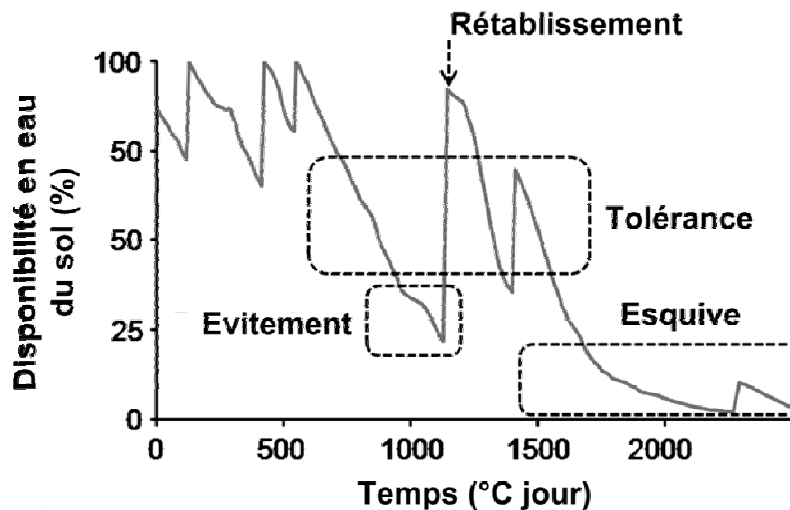
Le terme général de « sécheresse » recouvre des notions différentes. Nous distinguerons un manque d'eau « ponctuel » (sécheresse) d'un déficit en eau structurel (aridité). L'aridité est un déficit systématique de pluviométrie. Dans les régions dites arides, les précipitations sont inférieures à l'évapotranspiration potentielle. Près d'un tiers de la superficie totale du monde est constitué de terres arides. Par opposition, la sécheresse définit un déficit pluviométrique non systématique et est donc caractérisée par l'intensité de sa déviation par rapport à une valeur moyenne ou normale de pluviométrie (Jones, 1992). Différents éléments quantitatifs la caractérisent : la durée (sécheresse intermittente ou prolongée), la période d'occurrence, l'extension géographique, la dynamique de mise en place (brutale ou progressive) et l'époque d'apparition par rapport au cycle cultural. Ainsi lorsqu'on s'intéresse aux cultures de nos régions, une sécheresse correspond à un déficit en eau du sol et/ou de l'air entraînant au niveau de la plante entière une diminution de la quantité d'eau absorbée par la plante par comparaison avec la quantité d'eau évaporée. Cette différence entre l'eau absorbée et l'évaporation se caractérise par une diminution du rendement qui serait attendu en situation favorable ou de la qualité des produits récoltés (Voltas et al., 2005; Tardieu et al., 2007). L'eau disponible sous la forme de précipitations ou de ressources pour l'irrigation, joue en effet un rôle prépondérant dans la production alimentaire au niveau régional et mondial. Les terres irriguées, qui ne représentent que 18 % des terres agricoles mondiales, produisent un milliard de tonnes de blé par an, ce qui correspond à environ la moitié de l'approvisionnement total du monde. Cela s'explique par le rendement des cultures irriguées qui est de 2 à 3 fois plus élevé en moyenne que celui des terres non irriguées (FAO, 2003).

##### *1.2. Changement climatique et risques de sécheresse*

Le changement climatique observé, depuis quelques décennies, apparaît comme une cause profonde des modifications environnementales ayant un impact sur la production alimentaire. En effet, la structure associant l'organisation mondiale de météorologie (WMO) et les Nations Unies, connue sous l'acronyme d'ICC (« Intergovernmental Panel



**Figure 2. Modifications des températures en surface simulées pour le début et la fin du XXI<sup>e</sup> siècle par rapport à la période 1980–1999 (d’après l’IPCC, 2007).** Les panels représentent les moyennes des simulations faites à l’aide de modèles de circulation générale océan-atmosphère couplés pour les scénarios B1 (panels supérieurs), A1B (panels centraux) et A2 (panels inférieurs), moyennés sur les décennies 2020–2029 (panels de gauche) et 2090–2099 (panels de droite).



**Figure 3. Disponibilité en eau du sol durant le cycle de culture du blé à Roseworthy (Australie) pour la saison 2007 (adapté de Berger et al., 2010).** Chaque rectangle correspond à une stratégie mise en place par les plantes pour faire face à la limitation en eau : (1) la stratégie d’esquive implique une maturation précoce avant que le déficit hydrique ne devienne trop important ; (2) la stratégie d’évitement implique une conservation de l’eau dans les tissus pendant les périodes relativement courtes de stress sévère pour éviter des dégâts irréversibles ; (3) une tolérance consiste à maintenir les fonctions principales de la plante malgré un déficit hydrique.

on Climate Change »; <http://www.ipcc.ch/>), a montré un accroissement des températures moyennes mondiales de l'air et des océans prouvant une modification du système climatique sans équivoque, à l'échelle mondiale et régionale (Fig. 1, page 1 ; Bates et al., 2008). En France, les modèles de prévisions climatiques prévoient une augmentation de température de l'ordre de 2-3°C à 3-4°C (Fig. 2), avec une augmentation nettement plus marquée pour la saison la plus chaude (Météo France; <http://climat.meteofrance.com/>). Les effets de ce réchauffement climatique sur l'agriculture sont d'ores et déjà observables, avec un avancement avéré des dates de floraison en verger, de vendange et de moisson. En effet, l'augmentation des températures a des effets directs sur la demande en eau, en augmentant la demande évaporative par accroissement du déficit de saturation de l'air, et a des effets indirects sur le cycle de développement des cultures, en allongeant la période de végétation d'espèces pérennes et en raccourcissant le cycle d'espèces annuelles (Amigues et al., 2006). Dans le cas des précipitations, les modèles de répartition spatiale et temporelle, sont moins sûrs que ceux établis pour l'évolution des températures. Les scénarios disponibles prévoient plutôt une accentuation des différences régionales (Sud encore plus sec) et saisonnières (pluies plus abondantes en période hivernale et moindres en été), ainsi que des risques accrus d'événements extrêmes.

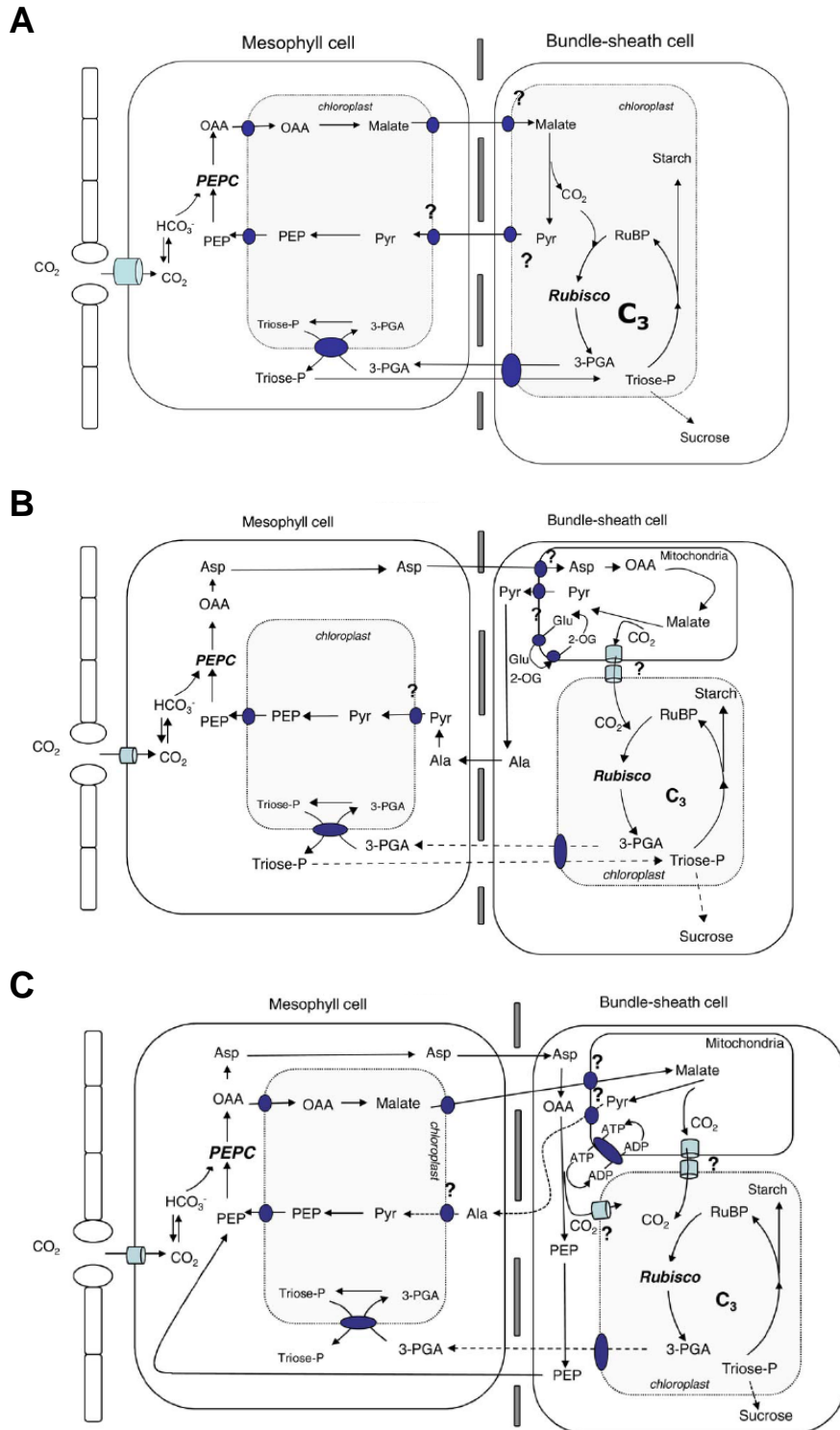
### ***1.3. Stratégies mises en place par les plantes face à la sécheresse***

Au cours de leur évolution, les plantes ont développé de nombreux mécanismes pour assurer leur survie et leur reproduction en condition de sécheresse. Les stratégies principales sont l'esquive, l'évitement et la tolérance (Fig. 3 ; Chaves et al., 2003 ; Barnabas et al., 2008).

Les plantes qui pratiquent l'esquive vont tout mettre en œuvre pour permettre la reproduction avant que le stress ne devienne trop important et réduisent ainsi le risque de perte de rendement en échange d'une réduction du rendement maximum atteignable. Dans ce cas, le mécanisme est privilégié dans la culture d'espèces ou de variétés terminant plutôt leur cycle de vie par une croissance plus rapide ou décalant leur cycle pour le placer pendant des périodes où les conditions sont favorables, comme les cultures d'hiver.

Les plantes qui pratiquent l'évitement vont éviter la déshydratation de leurs tissus tout en maintenant leur potentiel hydrique le plus élevé possible à l'aide de caractères adaptatifs permettant de réduire la perte en eau tout en améliorant la récupération de l'eau. La perte en eau par transpiration est minimisée en grande partie par la fermeture des stomates, au détriment de l'assimilation du carbone atmosphérique. On observe aussi un





**Figure 4. Représentation schématique des trois variantes de la photosynthèse de type  $\text{C}_4$  (d'après Weber et al. 2010).** (A) Photosynthèse  $\text{C}_4$  de type enzyme malique à NADP. (B) Photosynthèse  $\text{C}_4$  de type enzyme malique à NAD. (C) Photosynthèse  $\text{C}_4$  de type PEP-carboxykinase. 3-PGA : 3-phosphoglycérate ; Ala : alanine ; Asp : aspartate ;  $\text{C}_3$  : cycle de Benson-Calvin ; Glu : glutamate ;  $\text{HCO}_3^-$  : hydrogénocarbonate ; OAA : oxaloacétate ; PEP : phosphoenolpyruvate ; PEPC : phosphoenolpyruvate carboxylase ; Pyr : pyruvate ; RuBP : ribulose-1,5-bisphosphate ; Rubisco : ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase ; Triose-P : trioses phosphates.

épaississement cuticulaire. Une réduction de la surface d'évaporation est obtenue par un enroulement des feuilles, l'élimination des feuilles les plus âgées, ainsi qu'une diminution de la croissance. La récupération de l'eau peut aussi être augmentée par une croissance des racines qui vont aller chercher l'eau plus profondément (Sharp et al., 2004). Cette stratégie permet donc une survie au détriment de la productivité.

Les plantes tolérantes maintiennent leurs fonctions (croissance foliaire et reproductrice, nombre d'organes, transpiration et photosynthèse) malgré le déficit hydrique. Cela implique des ajustements osmotiques qui sont rendus possible par la rigidité des parois cellulaires et par de petites cellules. La tolérance à la sécheresse est aussi associée à une élimination efficace des espèces réactives de l'oxygène (« reactive oxygen species », ROS ; voir §1.3.4.3) formées lors de la perturbation du métabolisme (Barnabas et al., 2008 ; Chaves et al., 2003). Ces adaptations permettent le maintien du rendement maximal mais ont tendance à augmenter le risque de perte totale de rendement. Elles sont favorables en conditions modérément sèches, mais pourraient s'avérer contre-productives en situation de déficit hydrique plus sévère (ne permettant plus l'alimentation hydrique d'un couvert trop développé ou le remplissage de grains trop nombreux).

#### ***1.4. L'efficacité de l'utilisation de l'eau***

L'efficacité de l'eau (« water use efficiency », WUE) est définie comme le rapport entre la biomasse produite et l'eau transpirée pendant le même laps de temps. Elle varie selon les espèces et les climats considérés. La plupart des espèces ont tendance à montrer une augmentation de leur efficacité d'utilisation de l'eau quand le déficit hydrique est faible, ce qui résulte de la relation non-linéaire entre l'assimilation carbonique et la conductance stomatique (Chaves et al., 2003). La perte en eau est tout d'abord limitée par la fermeture des stomates induisant une réduction de la photosynthèse. Les cultures ayant la plus forte efficacité de l'eau correspondent à des plantes en  $C_4$ , telles que le maïs et le sorgho. En effet, ces plantes possèdent une « photosynthèse coopérative » (Karpilov, 1970) dont la finalité est l'assimilation du  $CO_2$  par la phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) dans les cellules du mésophylle (cycle  $C_4$  ; Fig. 4) pour le concentrer au site de la ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase (Rubisco) dans les cellules de la gaine périvasculaire (cycle de Benson-Calvin), ce qui a pour conséquence de réduire fortement l'activité oxygénase de cet enzyme et son corollaire la photorespiration au cours de laquelle une partie du carbone est perdue pour la plante (von Caemmerer and Furbank, 2003 ; Weber and von Caemmerer, 2010). Le bilan énergétique est défavorable par rapport aux plantes en  $C_3$ . Cependant, ce mécanisme d'adaptation est particulièrement performant en

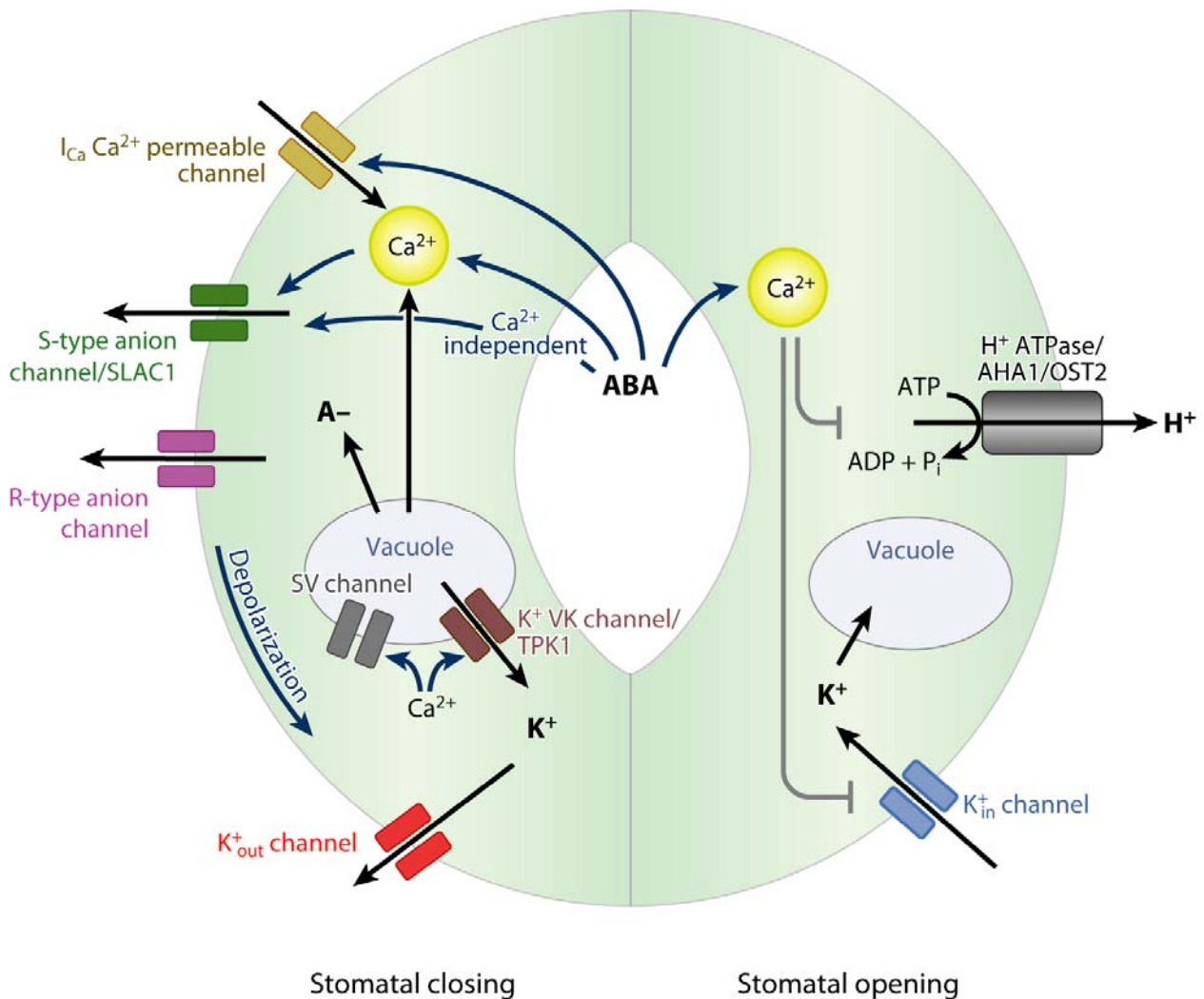
conditions hydriques limitantes et confère à la plante  $C_4$  la capacité d'une gestion optimale de son métabolisme carboné. En effet, en condition hydrique limitante, malgré la fermeture des stomates entraînant un déficit en carbone, le mécanisme  $C_4$  permet une concentration du  $CO_2$  dans la gaine périvasculaire induisant moins ou pas de photorespiration. De manière générale, les plantes  $C_4$  utilisent moitié moins d'eau que les plantes  $C_3$  pour produire une même quantité de matière sèche : 300 g d'eau/g de matière sèche contre 600 g d'eau pour les plantes  $C_3$ . Ces avantages physiologiques s'estompent pour des températures inférieures à  $25^\circ C$ , en-deçà desquelles les plantes  $C_3$  ont un rendement quantique plus élevé. Les plantes  $C_4$  sont donc avantagées dans les situations naturelles de faible humidité ambiante, de température élevée et de luminosité forte qui sont celles présentes dans les zones subtropicales semi-désertiques ou durant des périodes climatiques particulières, comme l'été sous nos latitudes.

## **2. Les mécanismes physiologiques impliqués dans la réponse à la sécheresse**

La réponse des plantes à la sécheresse s'effectue aux niveaux physiologique, cellulaire et moléculaire. Elle dépend de nombreux facteurs, tels que l'espèce et le génotype, la durée et la sévérité du déficit hydrique, l'âge et le stade de développement de la plante, l'organe, le type cellulaire et le compartiment subcellulaire affectés (Barnabas et al., 2008).

### **2.1. La fermeture stomatique**

La fermeture des stomates correspond à un mécanisme signalétique intervenant dans les premières minutes d'un déficit hydrique. Il s'agit de l'un des principaux moyens mis en place par la plante pour éviter les pertes excessives en eau (Wasilewska et al., 2008). Les stomates sont des pores microscopiques situés sur les feuilles (Casson and Hetherington, 2010). Ils sont formés par deux cellules de garde jointives qui, selon leur état de turgescence, vont modifier la taille du pore. La fermeture des stomates permet une diminution de la perte en eau mais elle provoque également une diminution de l'apport en  $CO_2$  destiné à la photosynthèse. L'acide abscissique (ABA), une phytohormone synthétisée notamment en réponse à un déficit hydrique, a été identifié comme l'un des signaux impliqués dans la régulation des stomates (Kim et al., 2010). L'ABA induit la fermeture des pores stomatiques en inhibant l'ATPase à protons et en activant un canal perméable au  $Ca^{2+}$  non sélectif, ainsi qu'un canal à  $Cl^-$ . Ces événements dépolarisent les membranes des cellules de garde, ce qui entraîne un transport des ions  $K^+$  vers le cytosol, puis du cytosol



**Figure 5. Mécanismes de signalisation de l'ABA dans les cellules de garde (d'après Kim et al., 2010).** Ce modèle simplifié se concentre sur la fonction des canaux ioniques et la transduction du signal ABA à travers les membranes plasmiques et vacuolaires dans les cellules de gardes. Les mécanismes impliqués dans la régulation de la fermeture et de l'ouverture des stomates sont représentés sur la cellule de garde située respectivement à gauche et à droite. ABA : acide abscissique ;  $I_{Ca}$   $Ca^{2+}$  permeable channel : canal calcique perméable ; S-type anion channel/SLAC1 : canal anionique lent de type S (SLAC1) ; R-type anion channel : canal anionique rapide de type R ; SV channel : canal tonoplastique lent (slow vacuolar) ;  $K^{+}$  VK channel : canal tonoplasmique spécifique du  $K^{+}$  (TPK1) ;  $K^{+}_{out}$  channel : canal  $K^{+}$  sortant ;  $K^{+}_{in}$  channel : canal  $K^{+}$  entrant ;  $H^{+}$  ATPase : pompe ATPase à  $H^{+}$ .

vers l'extérieur des cellules de garde (Fig. 5; Kim et al., 2010). Cette sortie entraîne une baisse de la pression osmotique et provoque une sortie d'eau des cellules, associées à une diminution de la turgescence. Par ailleurs, l'ABA est capable à la fois d'inhiber les canaux à  $K^+$  entrant, ce qui renforce la fermeture des pores stomatiques, et d'activer les canaux à  $K^+$  sortant, ce qui inhibe l'ouverture des pores stomatiques.

## ***2.2. La modification de la conductivité hydraulique***

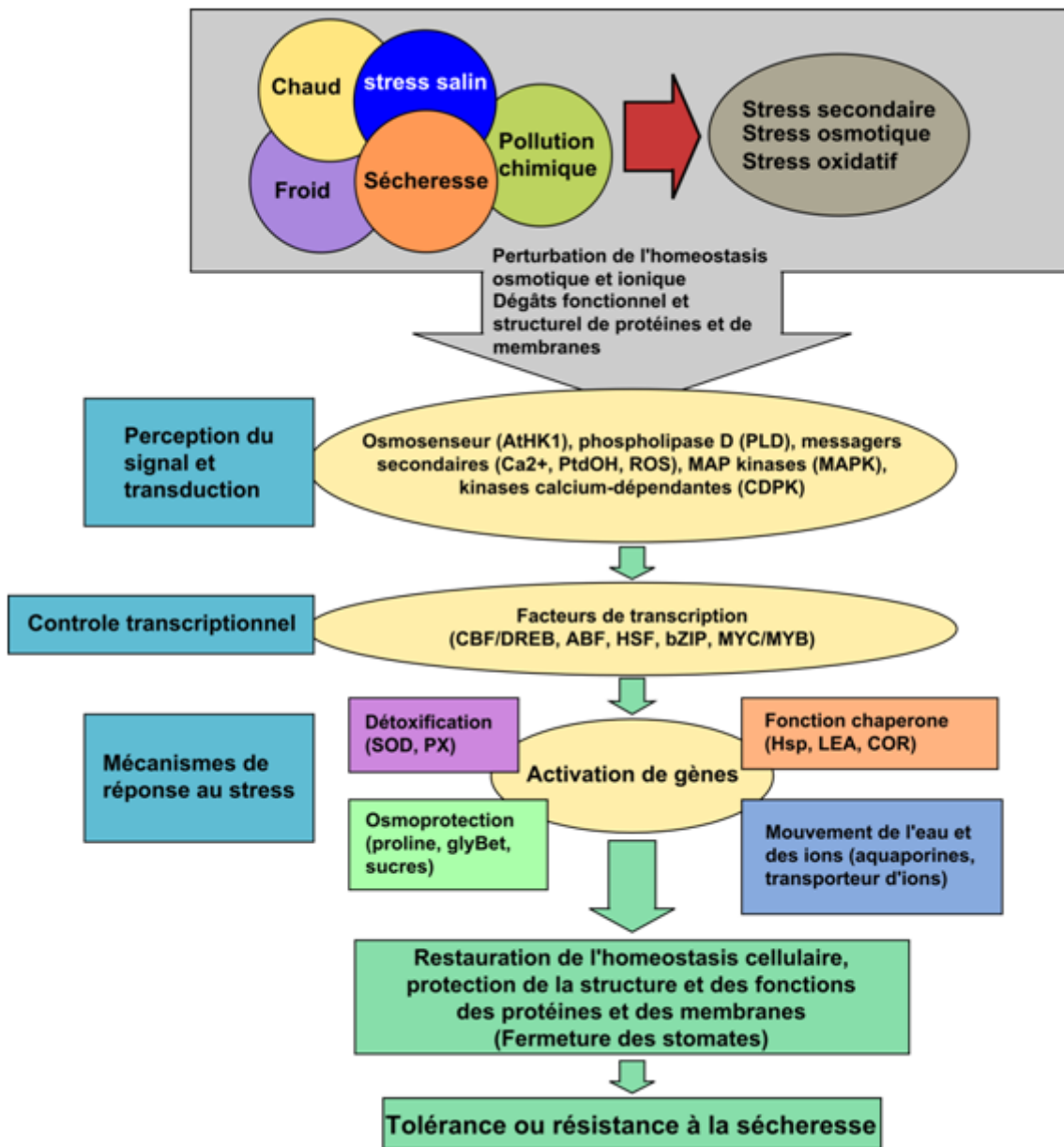
La modification de la conductivité hydraulique des tissus qui intervient dès le début d'un déficit hydrique, correspond à la modulation du trajet de l'eau. Les échanges transmembranaires de l'eau sont réalisés à travers des pores formés par des protéines membranaires, les aquaporines (voir § 1.3.4.1 ; Maurel et al., 2008). En cas de déficit hydrique, l'ouverture et la répartition des aquaporines dans les membranes sont modifiées, ce qui permet de moduler le trajet de l'eau au sein des tissus ou organes (Zhu et al., 2006) et d'adapter la conductivité hydrique, au sein de la plante, à l'eau dont elle dispose dans le sol.

## ***2.3. L'ajustement osmotique***

Pour limiter la perte en eau, les plantes sont capables de maintenir la turgescence de leurs cellules grâce à l'accumulation contrôlée de composés organiques appelés osmoprotectants. Ce phénomène correspond à l'ajustement osmotique. Les osmoprotectants sont des composés solubles, non chargés à pH neutre et compatibles, même à forte concentration avec les fonctions métaboliques. Ils permettent également une stabilisation des protéines et des membranes cellulaires contre l'effet de dénaturation engendré par le stress sur des fonctions cellulaires. Leur nature est très variable et dépend de la nature du stress et de l'espèce considérée. Il peut s'agir d'acides aminés, tels que la proline, la glycine bêtaïne, de sucres, tels que le saccharose et le trehalose, ou de polyols (Zhang et al., 1999 ; Abebe et al., 2003 ; Valliyodan and Nguyen, 2006).

## ***2.4. La réduction de la croissance des parties aériennes***

Le déficit hydrique se concrétise chez la plupart des espèces par un ralentissement de la mise en place de nouveaux organes aériens et par une réduction de la croissance des organes préexistants. Ces modifications résultent d'une diminution de la vitesse de division des cellules constituant les tissus végétaux (Granier et al., 2000) et d'une modification des propriétés physico-chimiques des parois entourant les cellules qui deviennent plus rigides,



**Figure 6. Mécanismes de réponses des plantes à un stress abiotique (adapté de Wang et al., 2003).**

Les stress abiotiques principaux, tels que la sécheresse, le stress salin, le froid, la chaleur et la pollution chimique, sont souvent connectés et causent des dégâts cellulaires et des stress secondaires, tels que les stress osmotique et oxydatif. Les signaux initiaux, tels que des effets osmotiques et ioniques, la température ou des changements de fluidité de la membrane, déclenchent des processus de signalisation permettant l'activation de facteurs de transcription qui eux-mêmes régulent l'expression de gènes impliqués dans le rétablissement de l'homéostasie cellulaire, la protection et/ou la réparation des protéines et des membranes endommagées.

ce qui empêche leur croissance (Cosgrove, 2005). Ces processus, à plus long terme, limitent les surfaces d'échange entre la plante et l'air et donc les pertes d'eau par transpiration. La réduction de croissance ne serait pas une conséquence passive du manque d'eau dans les cellules mais une réponse contrôlée et programmée de la plante dont le résultat est d'anticiper les événements sévères de stress hydrique. Cette réponse est donc préventive et non subie.

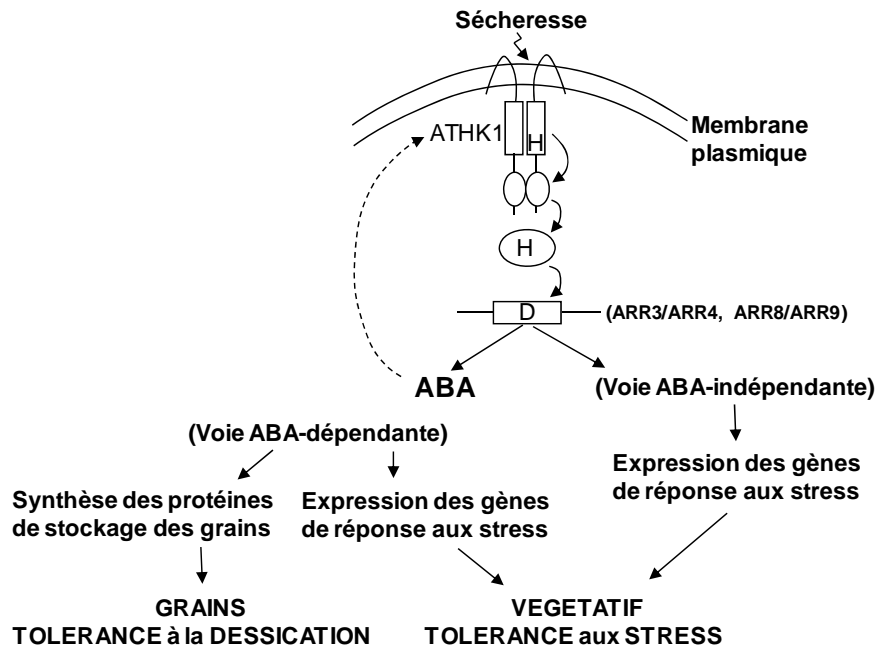
### **3. Les mécanismes moléculaires impliqués dans la réponse à la sécheresse**

Au niveau moléculaire, la réponse de la plante à un stress se traduit par une induction ou une répression de l'expression de nombreux gènes. Il est possible de classer leurs produits en deux grandes catégories : (i) les protéines impliquées dans la transduction du signal et le contrôle de la transcription telles que les protéines kinases, les phospholipases, les phosphatases ou les facteurs de transcription ; (ii) les protéines impliquées dans l'assimilation et le transport de l'eau et des ions, telles que les aquaporines et les transporteurs d'ions, et les protéines impliquées dans la protection des membranes et des protéines, telles que les protéines de choc thermique (« heat shock proteins, HSP), les protéines chaperonnes et les protéines LEA (« late embryogenesis abundant ») ; (iii) les protéines impliquées dans les mécanismes régulés, tels que le métabolisme carboné, les parois (Fig. 6 ; Wang et al., 2003).

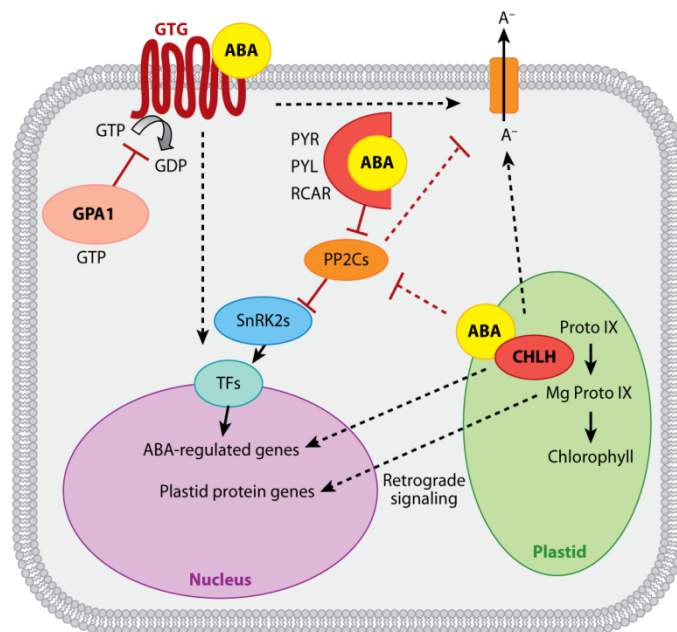
#### **3.1. La perception du signal**

Pour que la cellule réagisse au déficit hydrique, elle doit avant tout percevoir la contrainte, au niveau moléculaire, grâce à une conversion du stress perçu au niveau physique en signaux biochimiques et à une transduction du signal. Différents récepteurs ont été identifiés ces cinq dernières années.

Chez *Arabidopsis thaliana*, la protéine His kinase ATHK1 de la membrane plasmique complémente le mutant déficient de la protéine de levure SLN1, impliquée dans la voie HOG (« high-osmolarity glycerol ») MAPK (« mitogen-activated protein kinase »), un osmo-récepteur sensible au changement de turgescence, ce qui suggère une homologie de fonction (Urao et al., 1999 ; Reiser et al., 2003). Récemment, il a été suggéré que la protéine ATHK1 agirait comme un osmo-récepteur *in planta*, permettant la détection du déficit hydrique et l'initiation des réponses induites par cette contrainte (Fig. 7, page 7 ; Wohlbach et al., 2008). Elle serait non seulement impliquée dans la réponse au déficit hydrique pendant les premières étapes de la croissance végétative, mais aussi dans la



**Figure 7. Schéma du mécanisme potentiel d'action de la protéine ATHK1 dans les graines et les plantules (adapté de Wohlbach et al., 2008).** Après la perception de la sécheresse par la protéine ATHK1, une voie de signalisation impliquant des phosphorylations via les protéines « Arabidopsis response regulators » (ARR) 3 (ARR3)/ARR4 et/ou ARR8/ARR9, transmet un signal pour augmenter la transcription de gènes impliqués dans la biosynthèse de l'ABA, ce qui conduit à une accumulation de l'ABA qui à son tour induit la transcription de gènes sensibles à la sécheresse, y compris la protéine ATHK1.



**Figure 8. Mécanismes d'interaction de l'ABA avec ces trois types de récepteurs connus (d'après Cutler et al., 2010).** Les récepteurs de l'ABA actuellement connus correspondent à la sous-unité H de la chélatase de magnésium plastidiale (CHLH/ABAR), aux récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques (GTG) situés sur la membrane plasmique, et aux protéines Pyrabactin resistance/Pyrabactin Resistance 1-Like/Regulatory Component of ABA Receptor (PYR/PYL/RCAR) nucléocytoplasmiques. Les flèches en trait plein indiquent des interactions directes, alors que les flèches en pointillées indiquent des interactions inconnues. Les pointes de flèches indiquent des interactions positives, alors que les barres indiquent des répressions.



régulation de processus de dessiccation pendant la formation des graines (Wohlbach et al., 2008).

Par ailleurs, trois types de récepteurs percevant l'ABA ont récemment été identifiés : (i) la protéine plastidiale CHLH/ABAR (pour « ABA receptor ») correspondant à la sous-unité H (large sous-unité) de la chélatase de magnésium, un régulateur clé impliqué dans la biosynthèse des chloroplastes et la signalisation rétrograde plaste-noyau ; (ii) les récepteurs couplés aux protéines hétérotrimériques de type G (GTG) situés sur la membrane plasmique ; (iii) les protéines Pyrabactin resistance/Pyrabactin Resistance 1-Like/Regulatory Component of ABA Receptor (PYR/PYL/RCAR) nucléocytoplasmiques (Fig. 8). L'ensemble de ces protéines régule l'expression de gènes et l'activité de canaux dans les cellules de garde (pour revue voir Cutler et al., 2010).

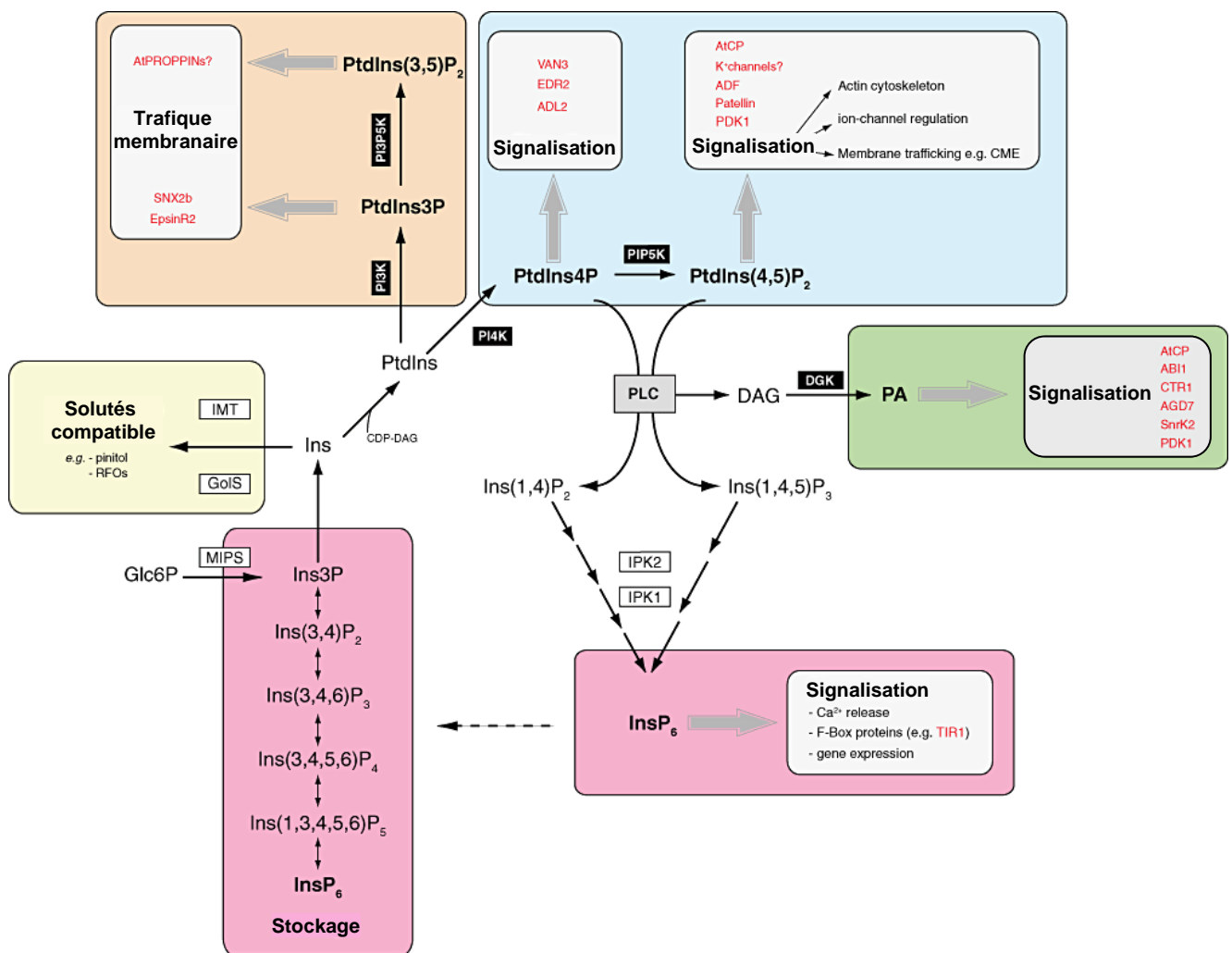
### ***3.2. La transduction du signal***

De nombreux messagers secondaires sont impliqués dans la cascade de transduction du signal lors de la réponse à un déficit hydrique. Parmi ceux-ci, on peut citer les glycérolipides qui jouent un rôle de perception et de transduction des stimuli externes au niveau de la membrane plasmique, le calcium, les ROS, des protéines kinases et phosphatases, et des facteurs de transcription.

#### ***3.2.1. Les glycérolipides***

Telle une barrière sélective entre les cellules et leurs environnements, la membrane plasmique joue un rôle clé dans la perception et la transmission d'informations externes. Pendant des stress osmotiques, des changements dans la composition en glycérolipides ont été détectés chez les plantes (Munnik et al., 1998). Le rôle majeur des glycérolipides est de servir de précurseurs pour la synthèse de messagers secondaires. Ainsi, dans les cellules de garde, l'inositol-1,4,5-trisphosphate (IP3), l'inositol hexakisphosphate (IP6), l'acide phosphatidique et les bases sphingoïdes phosphorylées sont des acteurs majeurs de la fermeture des stomates en réponse à l'ABA (Pata et al., 2010 ; Kim et al., 2010).

L'IP3 et l'acide phosphatidique s'avèrent également jouer un rôle en réponse au déficit hydrique dans d'autres organes de la plante (Fig. 9, page 8 ; Munnik and Vermeer, 2010). La phospholipase C (PLC) produit l'IP3 à partir de phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP2), lui-même produit par une phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase (PIP5K). Lors d'un stress osmotique, les teneurs en PIP2 et IP3 augmentent globalement de façon rapide (DeWald et al., 2001), de même que le transcrit codant la PIP5K (Mikami



**Figure 9. Variations du métabolisme des polyphosphoinositides et des inositolphosphates en réponse à la sécheresse (adapté de Munnik et al., 2010).** Les variations métaboliques induites par la sécheresse peuvent contribuer à la tolérance au déficit hydrique de deux façons : (i) activation de voies de signalisation; (ii) production d'osmoprotectants. La voie de signalisation implique une phospholipase C (PLC) qui hydrolyse le phosphatidylinositol (PtdIns, PI) et/ou le phosphatidylinositolbisphosphate (PtdInsP<sub>2</sub>, PIP<sub>2</sub>) en inositol bisphosphate (InsP<sub>2</sub>, IP<sub>2</sub>) ou inositol trisphosphate (InsP<sub>3</sub>, IP<sub>3</sub>) qui peut être à son tour phosphorylé en inositol hexakisphosphate (InsP<sub>6</sub>, IP<sub>6</sub>) par les inositol phosphate multikinases (IPK2 et IPK1), ainsi qu'en diacylglycérol (DAG), converti à son tour en acide phosphatidique (PA). L'IP<sub>6</sub> produit induit la libération de calcium intracellulaire, régule l'expression de gènes et/ou active des voies de signalisation dépendantes des F-box. L'IP<sub>6</sub> peut être également produit via un mécanisme « indépendant des lipides » suite à la phosphorylation de l'IP<sub>3</sub> issu du glucose-6-phosphate (Glc6P). L'IP<sub>6</sub> ainsi formé agit alors comme un osmoprotectant en condition de stress. Les polyphosphoinositides sont produits par des protéines kinases et des phosphatases avec des phosphates en position D3, D4 et/ou D5. Chaque polyphosphoinositide est impliqué dans des voies de signalisation distinctes et a des cibles différentes indiquées en rouge.

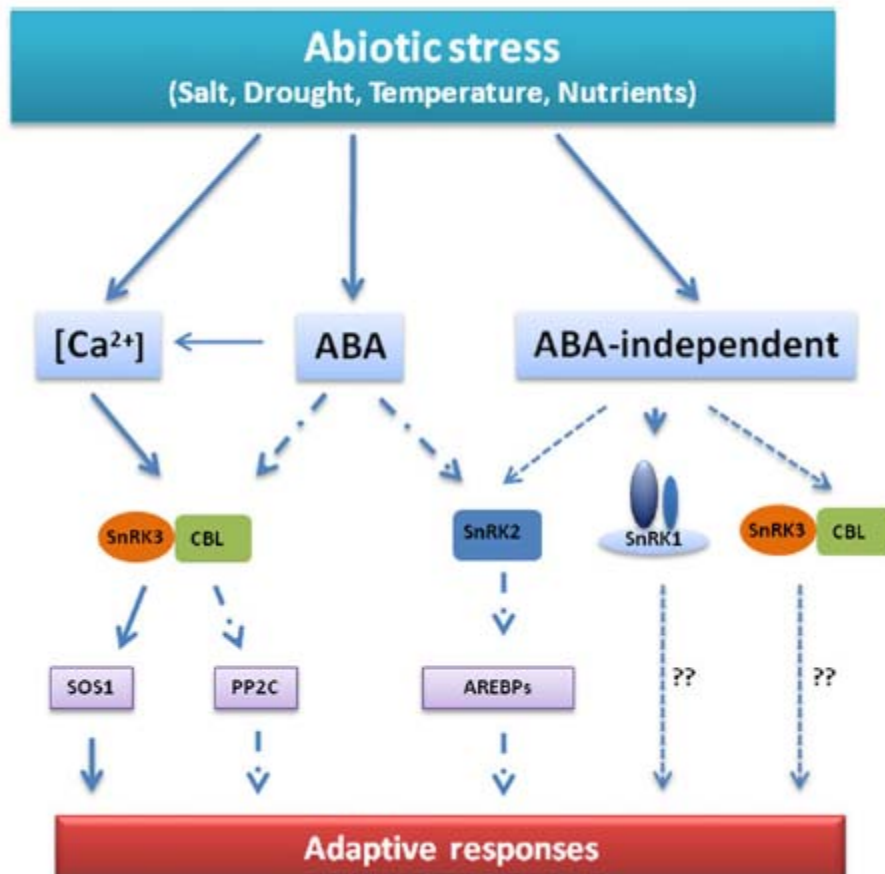
et al., 1998). Par ailleurs, il a été montré qu'une mutation dans le gène *FRY1* codant une inositol polyphosphate-1- phosphatase impliquée dans le catabolisme de l'IP3, augmente l'expression des gènes de réponse à l'ABA et au stress, ainsi qu'une hypersensibilité à l'ABA et au stress au niveau de la graine et du développement de la plantule (Xiong et al., 2001).

### 3.2.2. *Le calcium*

Le calcium est un messager secondaire majeur de la signalisation du déficit hydrique (Knight, 2000 ; Dodd et al., 2010). Il est probable que les mécanismes aboutissant à l'augmentation de calcium soient assez semblables dans les cellules de garde et dans les autres cellules. Comme plusieurs pics de calcium sont détectés lors d'un déficit hydrique, il est possible que la perception même du déficit provoque le premier pic, qui serait responsable en particulier de l'accumulation d'ABA (Xiong et al., 2002). Il semblerait que des données importantes du signal véhiculé par le calcium soient « codées » dans la cinétique, l'amplitude et la durée des pics, que l'on appelle « signature calcique » qui serait traduite par des effecteurs en aval, tels que les protéines calcium-dépendantes protéines kinases (CDPK), les calmodulines (CaM), les CCaMK (calcium/calmoduline-dépendantes kinases) et les protéines CBL (« calcineurines-B like ») (Hong-Bo et al., 2008 ; Dodd et al., 2010).

### 3.2.3. *Les espèces réactives de l'oxygène*

Les cellules végétales produisent des ROS, tels que les radicaux superoxide ( $O_2^{\circ-}$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et les radicaux hydroxyles, de manière continue, suite à des activités cellulaires normales, telles que la photorespiration et la  $\beta$ -oxydation d'acides gras. Ces composés sont de plus produits après une exposition à un stress abiotique (Jaspers and Kangasjarvi, 2010). Ils peuvent devenir toxiques pour la cellule (voir § 1.3.4.3), comme servir de molécules de signalisation (Xiong et al., 2002). Jusqu'à présent, les événements connus pour être régulés par le peroxyde d'hydrogène sont la mobilisation du calcium, la phosphorylation des protéines ainsi que l'expression des gènes en réponse à divers stress. Le peroxyde d'hydrogène peut interagir avec des protéines clés de la signalisation et avec les résidus cystéines oxydés des protéines altérant ainsi leur conformation et leur activité.



**Figure 10. Diagramme schématisant des voies de signalisation dépendante ou non du calcium et du signal ABA impliquant les protéines kinases SnRK1, SnRK2 et SnRK3 (d'après Coello et al., 2010).** L'accumulation de sels dans le cytoplasme déclenche le signal calcique qui est perçu par le complexe connu sous le nom de « SnRK3/calcalcineurin B-like (CBL) calcium-binding protein complex (SOS2/SOS3) ». Le signal ABA régule l'activité de la protéine SnRK2 qui, à son tour, active les facteurs de transcription AREBPs qui régulent l'expression de gènes de réponses. Le signal ABA pourrait aussi réguler l'activité de la protéine SnRK3 par la fixation de la protéine PP2C. D'autres stress abiotiques, comme le manque en aliments nutritifs, induisent ou répriment l'expression/l'activité des protéines SnRKs.

### 3.2.4. Les protéines kinases

Les kinases catalysent la phosphorylation des protéines, c'est-à-dire l'ajout d'un ion phosphate à une protéine. Ce mécanisme est connu pour être impliqué dans l'activation et l'inactivation des activités enzymatiques, ainsi que dans la modulation des interactions protéines-protéines dans le cadre des réseaux de signalisation (Schulze, 2010). Chez les végétaux, de nombreuses protéines kinases ont été identifiées comme répondant à différents stress et en particulier le stress osmotiques. De plus, ils existent différentes voies de signalisation activées et/ou comprenant différents types de protéines kinases dont certaines grandes familles sont mentionnées ci-dessous.

Les cascades de MAP kinase (« mitogen-activated protein kinase », MAPK) jouent un rôle important dans la réponse à divers stress abiotiques, dont la sécheresse. Les cascades MAPK sont composées de trois protéines kinases : MAPK, MAPK kinases (MAPKK) et MAPKK kinases (MAPKKK), qui sont liées de façons diverses aux récepteurs en amont et aux cibles en aval (Zhang et al., 2006 ; Rodriguez et al., 2010).

Les CDPK sont des kinases dépendantes directement ou indirectement du calcium, ainsi que d'autres messagers, tels que les phospholipides. Les substrats potentiels des CDPK sont impliqués dans de nombreux mécanismes, tels que le métabolisme du carbone et de l'azote, la synthèse des phospholipides, le transport des ions et de l'eau, l'organisation du cytosquelette, la transcription et les réponses à des hormones, ainsi que la transduction du signal sécheresse (Bartels and Sunkar, 2005 ; Klimecka and Muszynska, 2007 ; Dodd et al., 2010).

Les protéines SnRK (« SNF-1 related kinase ») sont apparentées à une famille de protéines kinases jouant un rôle important dans la signalisation énergétique chez la levure (protéine kinase SNF1, « sucrose non-fermenting 1 ») et chez les mammifères (protéine kinase activée par le 5'-AMP). Elles sont classées en trois sous-familles : SnRK1, SnRK2 et SnRK3 (Fig. 10 ; Coello et al., 2010). Alors que la sous-famille SnRK1 ne compte que deux membres actifs, les sous-familles SnRK2 et SnRK3 comptent 10 à 25 membres. Il a été montré que la protéine AtSnRK1 jouait un rôle clé dans la signalisation énergétique et l'homéostasie métabolique en régulant l'expression d'un grand nombre de gènes via la signalisation des sucres et de l'ABA (Baena-Gonzalez and Sheen, 2008 ; Halford and Hey, 2009). La protéine AtOST1 fait partie de la sous-famille SnRK2 qui contrairement à la sous-famille SnRK1, n'a pas d'homologues chez les mammifères et les levures, et dont la plupart des membres sont activés par un stress osmotique (Boudsocq et al., 2004). La protéine AtOST1 présente également la particularité (comme deux autres membres de la sous-famille SnRK2) d'être activée par l'ABA et joue un rôle clé dans la fermeture

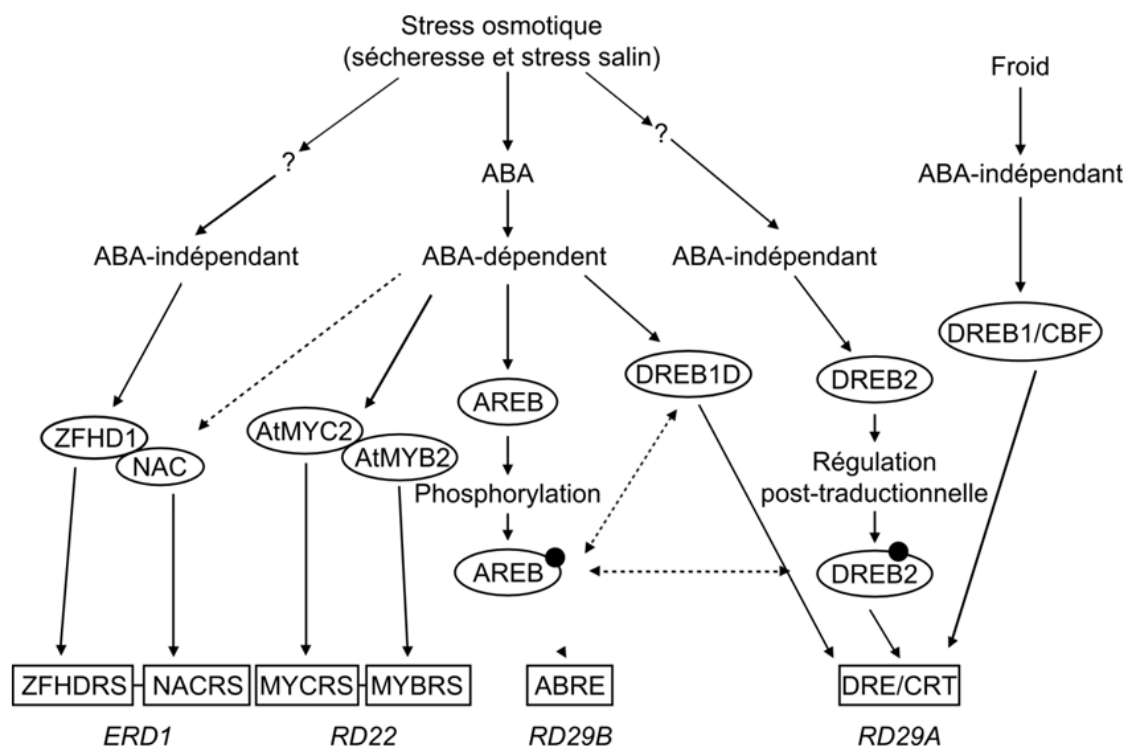
stomatique et l'homéostasie métabolique (Assmann, 2003 ; Zheng et al., 2010). Les membres de la sous-famille SnRK3 correspondent à des protéines ScaBP (« SOS3-like calcium sensor binding protein »)/CIPK (« CBL(cobalamin)-interacting protein kinases ») (Luan et al., 2009). Ils sont impliqués dans les réponses au stress salin et les voies de signalisation des sucres et de l'ABA dépendantes du calcium (Coello et al., 2010).

### 3.2.5. *Les protéines phosphatases*

Les protéines phosphatases catalysent la déphosphorylation des protéines, c'est-à-dire l'élimination d'un groupe phosphate par hydrolyse. Comme son corollaire, la phosphorylation, ce mécanisme est connu pour être impliqué dans les réseaux de signalisation. Il existe deux groupes importants de phosphatases : les phosphatases de phosphoprotéines ou PPases qui déphosphorylent des résidus Ser et Thr et les phosphatases de phosphotyrosines ou PTPases qui déphosphorylent des résidus Tyr. Il y a quatre familles de PPases (PP1, PP2A, PP2B et PP2C) et trois de PTPases (les PPTases similaires à des récepteurs, les intracellulaires et celles présentant une double-spécificité ou DsPTP) (Bartels and Sunkar, 2005). Diverses phosphatases, dont les PP2C, sont connues pour être impliquées dans la signalisation osmotique et celle de l'ABA (Kim et al., 2010 ; Cutler et al., 2010). 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). 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). Il a récemment été montré que la protéine kinase AtOST1, dont l'activité kinase est stimulée par l'ABA, est une cible directe du complexe formé par les protéines PYR/PYL/RCAR et la protéine phosphatase de type A connue aussi sous le nom de PP2C (Vlad et al., 2010). La fixation de l'ABA sur ce complexe lève l'inhibition qu'il exerçait sur la protéine AtOST1, lui permettant ainsi de phosphoryler ses cibles, dont le facteur de transcription ABF3 (« ABA-responsive-element Binding Factor 3 » ; Sirichandra et al., 2010).

### 3.3. *Les facteurs de transcription*

Malgré la nature complexe des réponses au déficit hydrique chez les plantes, il a été établi que l'ABA jouait un rôle important dans la réponse à cette contrainte. Il a été montré que de nombreux gènes induits par le déficit hydrique sont sous le contrôle de l'ABA, alors



**Figure 11. Spécificité et interaction des voies régulant de l'expression de gènes en réponse à des stress osmotique et froid (adapté de Tran et al., 2010).** Les éléments *cis* et les facteurs de transcription sont respectivement indiqués par des rectangles et des ovals. Les points noirs indiquent les modifications des facteurs de transcription. Les flèches en pointillé indiquent des régulations potentielles. Les doubles flèches en pointillé indiquent des interactions potentielles.

que d'autres ne sont pas affectés par l'ABA. Les travaux réalisés ces dernières années ont ainsi permis d'identifier deux voies de régulation de l'expression des gènes en réponse à la sécheresse : l'une dépendante de l'ABA et l'autre indépendante de l'ABA (Fig. 11 ; Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2007).

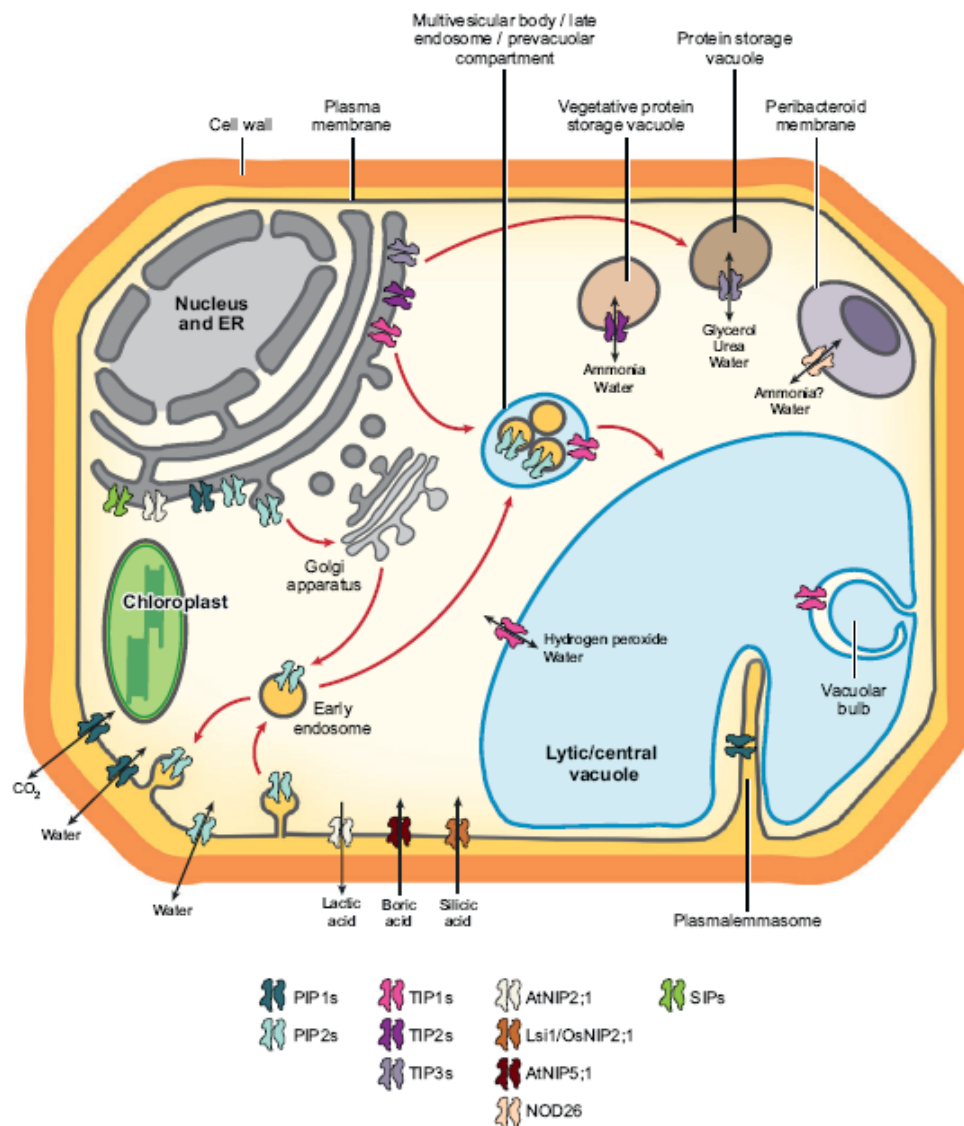
### 3.3.1. Les facteurs de transcription dépendants de l'ABA

De nombreux gènes régulés par l'ABA présentent dans leur région promotrice des éléments *cis* spécifiques permettant la régulation de leur transcription par différents facteurs de transcription, tels que les facteurs de transcription de type MYB (« Myeloblastis oncogen »), MYC (« Myelocytomatosis oncogen ») ou bZIP (« basic leucine zipper »).

La voie la mieux étudiée implique des éléments *cis* de type ABRE (« ABA-responsive element ») qui partagent un motif central palindromique conservé, constitué des bases PyACGTGGC. Ces éléments ont été mis en évidence pour la première fois dans le promoteur du gène *Em* du blé (Marcotte et al., 1989) et dans celui du gène *rab16A* du riz (Mundy et al., 1990). Chez de nombreuses espèces, l'unité promotrice minimale est constituée de deux motifs ABRE. C'est notamment le cas du promoteur du gène *RD29B* d'*A. thaliana* (Nakashima et al., 2006). Les facteurs de transcription se fixant sur les séquences ABRE appartiennent à la famille des facteurs de transcription bZIP. Ils sont communément désignés sous le nom de protéines AREB (« ABRE-binding protein ») ou ABF (« ABRE-binding factor »). L'activation de ces facteurs nécessite un signal dépendant de l'ABA qui pourrait être une phosphorylation.

Les facteurs de transcription MYB sont caractérisés par la présence de domaines conservés de fixation à l'ADN (Dubos et al., 2010). Le domaine MYB est généralement composé de une à quatre répétitions non complètes, constituées chacune d'environ 52 acides aminés formant des hélices  $\alpha$  qui permettent une conformation nécessaire pour la fixation à l'ADN. Chez les végétaux, les protéines MYB sont classées en trois groupes majoritaires : (1) le groupe R2R3-MYB caractérisé par deux répétitions ; (2) le groupe R1R2R3-MYB caractérisé par trois répétitions ; (3) un groupe hétérogène regroupant les protéines proches des MYB. Le groupe des protéines R2R3-MYB est celui qui a été le plus étudié ces dernières années et qui comprend le plus de membres. Ceux-ci sont impliqués dans le contrôle de nombreux processus physiologiques et biochimiques, tels que le métabolisme primaire et secondaire, l'identité des cellules et leur cycle, la formation des fleurs et des graines et la réponse à divers stress abiotiques et biotiques.





**Figure 12. Schéma des fonctions multiples des aquaporines chez les plantes (d'après Maurel et al., 2008).** Les isoformes des sous-familles PIP1 et PIP2 utilisent la voie de sécrétion qui permet le transfert du réticulum endoplasmique (ER) vers la membrane plasmique en passant par l'appareil de golgi. Les PIPs subissent aussi des cycles répétés d'endocytose à travers les compartiments cellulaires avant de devenir éventuellement des cibles des vacuoles. Les protéines TIP1 ont été découvertes dans la membrane des vacuoles. La protéine AtTIP1.1 est localisée dans des invaginations de la vacuole sphériques (« vacuolar bulb »), dans les cellules de l'épiderme des jeune cotylédons ou des racines en réponse à un stress salin. Les protéines TIP2s et TIP3s sont préférentiellement associées aux vacuoles et permettent l'accumulation des protéines de stockage dans respectivement les organes végétatifs et les grains.

### 3.3.2. Les facteurs de transcription indépendants de l'ABA

Dans le cas des mécanismes de régulation indépendants de l'ABA, deux types de facteurs de transcription sont impliqués : les facteurs NAC (« NAM, ATAF1,2, CUC2 ») spécifiques des plantes qui se fixent sur des motifs NACR (« NAC recognition site », séquence consensus ACACGCATGT), alors que les facteurs DREB (« Dehydration responsive element binding protein ») se fixent sur des motifs DRE (« dehydration responsive element », séquence consensus TACCGACAT). Le gène *RD29A/COR78/LTI78* est connu pour être induit par la sécheresse, le froid et l'ABA. Des expériences de délétion et de substitution de bases de son promoteur ont montré qu'une séquence DRE de 9 paires de base (pb) est un élément *cis* essentiel dans l'induction ABA indépendante de *RD29A* en réponse à la sécheresse et au froid. Contrairement aux éléments ABRE, une seule copie de DRE est suffisante pour activer l'expression du gène. Le motif A/GCCGAC qui forme le cœur de la séquence DRE est retrouvé dans des éléments *cis* similaires mis en évidence dans les promoteurs de gènes régulés par le froid nommés CRT (« C-repeat ») et LTRE (« low temperature responsive element »).

### 3.4. Les fonctions des gènes induits par la sécheresse

Comme cela a déjà été dit précédemment, deux types de gènes sont induits par la sécheresse. Les gènes codant les protéines impliquées dans la régulation du signal ont d'ores et déjà été présentés dans le paragraphe 1.3.2. Le présent paragraphe est donc focalisé sur les gènes codant des protéines impliquées dans la mise en place de l'ajustement osmotique, la détoxification de la cellule et la protection des protéines et des structures cellulaires.

#### 3.4.1. Les aquaporines

Les aquaporines forment des canaux spécifiques, situés sur les membranes plasmiques ou vacuolaires, permettant le transport de l'eau et/ou de petits solutés neutres (urée, acide borique) ou de gaz (ammonium, dioxyde de carbone). Elles facilitent ainsi l'équilibre osmotique en permettant une diffusion de l'eau. Elles permettent également une régulation du transport de l'eau entre différents types de cellules et organes afin d'optimiser son utilisation pendant le stress (Fig. 12 ; Maurel et al., 2008). Elles font partie de la famille des MIP (« major intrinsic protein ») et sont divisées en deux groupes : les protéines TIP (« tonoplast intrinsic proteins ») sont situées dans la membrane vacuolaire, alors que les protéines PIP (« plasma membrane intrinsic proteins ») sont situées dans la

membrane plasmique. Chez *A. thaliana*, il existerait au moins 30 aquaporines. Certaines, telles que la protéine RD28 (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 1992), sont induites par différents types de déficit hydrique, alors que d'autres sont réprimées par le déficit hydrique. Cette régulation permet de jouer sur les flux d'eau et du même coup l'ajustement osmotique (Bartels and Sunkar, 2005 ; Alexandersson et al., 2005).

#### 3.4.2. Les protéases

Les protéases correspondent à des enzymes qui catalysent les coupures des liaisons peptidiques entraînant ainsi une dégradation des protéines. Une augmentation de la protéolyse lors d'un déficit hydrique permet 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'*A. thaliana* 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, la protéine AtDegP2, est induite par une déshydratation et un stress salin. Elle est impliquée dans le clivage de la protéine D1 photo-endommagée (Haussuhl et al., 2001).

#### 3.4.3. La détoxification

Les ROS sont fortement induites en réponse aux stress et possèdent des effets délétères sur les structures biologiques, comme l'oxydation de l'ADN, des protéines et des lipides membranaires (Xiong et al., 2002). Divers mécanismes ont été développés pour éliminer les ROS. L'élimination est principalement réalisée par des composés antioxydants, tels que l'acide ascorbique (AsA), le glutathion (GSH), la thioredoxine (Trx), la ferredoxine et les caroténoïdes, et par des enzymes permettant une élimination des ROS, tels que la catalase, la superoxyde dismutase (SOD), l'ascorbate peroxydase (APX) et la glutathione reductase. La SOD, qui catalyse la conversion des anions superoxyde en peroxyde d'oxygène et en eau, est induite par l'ABA et la sécheresse, alors que la catalase est induite par le peroxyde d'hydrogène. Les ascorbate peroxydases sont induites par l'ABA, la sécheresse et l'éthylène.

Les peroxyredoxines permettent de détoxifier les peroxydes (eau oxygénée, hydroperoxydes) en les réduisant en alcool. Elles 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'une déshydratation, la peroxyredoxine TPX1 (« thioredoxin dependent peroxidase ») a été identifiée (Seki et al., 2002). D'autres protéines, telles que les Trx ou les sulfoxides reductases, sont impliquées dans la détoxification des effets des ROS. Néanmoins, si certaines sont induites par une déshydratation, leur rôle dans la tolérance à ce stress demande encore à être déterminé (Bartels and Sunkar, 2005).

#### 3.4.4. Les protéines HSP

Pendant les stress, de nombreuses protéines subissent des modifications structurales et des changements fonctionnels. Il est par conséquent très important, pour la survie de la cellule soumise à un stress, de maintenir ces protéines dans une conformation fonctionnelle, d'éviter l'agrégation de protéines dénaturées et d'éliminer les polypeptides non fonctionnels et potentiellement dangereux. Les protéines HSP sont une classe de protéines chaperonnes initialement découvertes en raison de leur induction par la chaleur. Leur rôle crucial est la protection, le maintien et la régulation de la conformation des protéines, de leur assemblage, de leur localisation et de leur dégradation dans de nombreux processus cellulaires. Elles sont également impliquées dans la stabilisation des protéines et des membranes. Elles permettent ainsi une protection des plantes lors de stress par un rétablissement de la conformation initiale des protéines et de l'homéostasie cellulaire (pour revue voir Wang et al., 2004).

#### 3.4.5. Les protéines LEA

Les protéines LEA ont été initialement découvertes en raison de leur accumulation tardive (phase de maturation) au cours de l'embryogénèse des graines de coton (Dure and Galau, 1981). Elles ont par la suite été découvertes dans les graines d'autres espèces, ainsi que dans les tissus végétatifs, en particulier en réponse à des stress abiotiques, tels que la sécheresse, le froid et le stress salin (Hand et al., 2010). Omniprésentes chez les plantes, ces protéines sont également présentes chez d'autres organismes, tels que les bactéries et les animaux (Hand et al., 2010). Elles sont principalement composées d'acides aminés, tels que la Gly, l'Ala, la Glu, la Lys/Arg et la Thr, dans des régions répétées ordonnées, ce qui leur confère un caractère fortement hydrophile, et sont généralement dépourvues ou ont une faible proportion en résidus Cys et Trp. La prédiction des structures secondaires suggère qu'une majorité de protéines LEA existent en condition hydratée sous des formes non-structurées et en condition de déficit hydrique sous une forme structurée tel que des dimères (Hong-Bo et al., 2005).

Chez les végétaux, Battaglia et al. (2008) ont identifié sept groupes sur la base de leur similitude de séquence. Les protéines LEA des groupes 1, 2, 3 et 4 se distinguent par la présence de motifs particuliers : (1) les protéines du groupe 1 sont caractérisées par un motif de 20 acides aminés hydrophiles ; (2) les protéines du groupe 2, connues aussi sous le nom de déhydrines, possèdent aux moins deux des trois segments conservés, Y-, S-, et K-, dans des ordres différents ; (3) les protéines du groupe 3 sont caractérisées par un motif répété de 11 résidus formant des hélices  $\alpha$  ; (4) les protéines du groupe 4 sont caractérisées par une région N-terminale conservée de 70-80 résidus formant également des hélices  $\alpha$ . Contrairement à la majorité des protéines LEA, les protéines du groupe 5 se distinguent par la présence de nombreux résidus hydrophobes. Les protéines LEA du groupe 6 correspondent à des protéines dont la taille est petite (7 à 14 kDa). Les protéines du groupe 7, aussi connues sous le nom de protéines ASR (« ABA-, stress- and ripening-induced proteins »), correspondent à des protéines très hydrophiles, de petites tailles, largement répandues dans le règne végétal, à l'exception notable des Brassicacées dont *A. thaliana*. Elles sont caractérisées par un motif de 18 à 20 acides aminés riche en His situé en N-terminal et par deux domaines ABA/WDS (« Water deficit Stress ») situés en C-terminal.

Les gènes *LEA* présentent la caractéristique d'être régulés, au niveau transcriptionnel via un mécanisme dépendant de l'ABA (Wang et al., 2003). Chez *A. thaliana*, il a ainsi été montré que 28 des 50 gènes *LEA* identifiés présentaient une dérégulation de leur expression chez au moins un mutant déficient en ABA (Bies-Etheve et al., 2008). Par ailleurs, la plupart des gènes *ASR* identifiés sont régulés par l'ABA (Vaidyanathan et al., 1999 ; Hara et al., 2002 ; Sugiharto et al., 2002 ; Rabbani et al., 2003 ; Shen et al., 2005 ; Yang et al., 2005). Cependant, certaines déhydrines ne sont pas régulées par l'ABA. Il en est de même pour le gène *ASR* connu sous le nom de *DS2* qui est induit par la sécheresse indépendamment de l'ABA (Doczi et al., 2005). De plus, les modifications post-traductionnelles, telles que la phosphorylation, pourraient être mis en jeu. La protéine OsASR5 est ainsi présente sous la forme d'un train de spots sur gels d'électrophorèse bidimensionnelle (2D ; Salekdeh et al., 2002). De plus, des expériences de Western blot avec un anticorps dirigé contre des Ser phosphorylées ont récemment montré que cette protéine possédait au moins une Ser phosphorylée (Ke et al., 2009).

Peu d'informations sont à ce jour disponibles sur la fonction des protéines LEA. Plusieurs hypothèses ont été avancées (Goyal et al., 2005 ; Grelet et al., 2005 ; Tunnacliffe and Wise, 2007 ; Hand et al., 2010) :

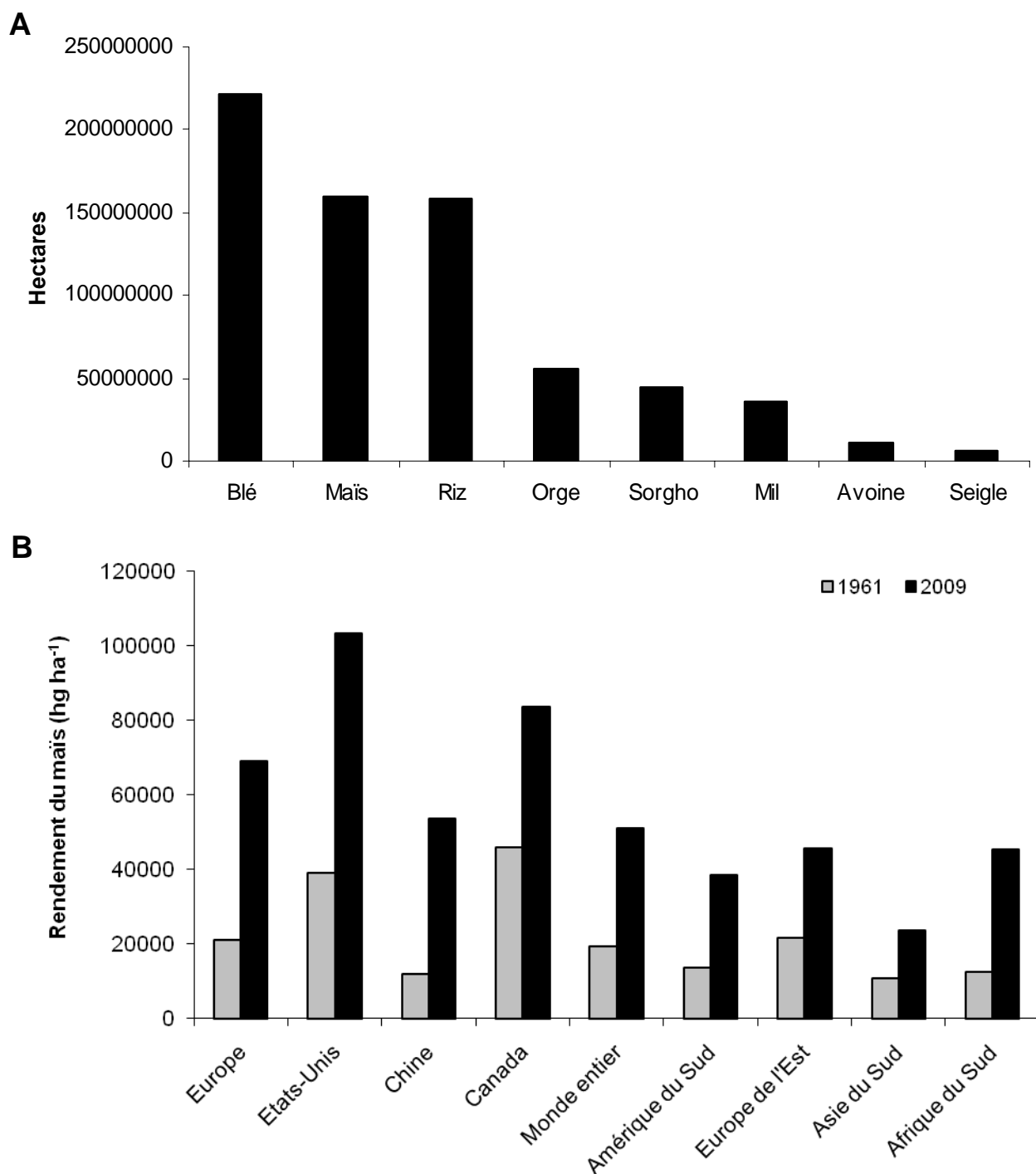
(1) En raison de leur absence de structure secondaire et de leur nature hydrophile, les protéines LEA auraient une fonction protectrice car elles diminueraient l'agrégation de polypeptides partiellement dénaturés produits en condition de stress.

(2) Etant hydrophiles, les protéines LEA sont également capables de fixer des molécules d'eau et pourraient donc avoir un rôle de tampon d'hydratation en ralentissant la perte en eau.

(3) Les protéines LEA pourraient aussi assurer une stabilisation stérique dans la mesure où elles peuvent se positionner à différents endroits de la cellule et s'associer aux membranes. Elles agiraient alors comme un tampon mécanique, évitant une diminution trop importante de la taille des cellules par une stabilisation membranaire.

(4) les protéines LEA pourraient enfin avoir un rôle de séquestration des ions dans la mesure où elles sont riches en acides aminés chargés. Elles éviteraient ainsi des dommages cellulaires induits par l'augmentation de la concentration ionique en cas de stress hydrique.

Les données obtenues *in vivo* montrent que certaines protéines LEA se fixent à des vésicules lipidiques, alors que d'autres fixent des métaux ou des radicaux hydroxyles. Dans ce dernier cas, ces protéines LEA pourraient protéger les membranes lipidiques contre les peroxydases ou les enzymes sensibles au froid. Dans le cas particulier des protéines ASR, il a été montré que la protéine ASR1 de tomate (*Solanum lycopersicon* ASR1 ; SlASR1) et la protéine VvMSA (*Vitis vinifera*, maturation, stress, ABA) sont capables de se fixer à l'ADN de manière dépendante du zinc (Cakir et al., 2003 ; Kalifa et al., 2004 ; Rom et al., 2006 ; Maskin et al., 2007 ; Shkolnik and Bar-Zvi, 2008). Il a donc été proposé que ces protéines réguleraient la transcription de gènes impliqués dans la signalisation des sucres dans les fruits ou dans la réponse aux stress abiotiques dans les tissus végétatifs (Cakir et al., 2003 ; Kalifa et al., 2004 ; Frankel et al., 2007 ; Yang et al., 2008). Néanmoins, la protéine SlASR1 et la protéine ASR de *Lilium longiflorum*, connue sous le nom de protéine LLA23, pourraient également avoir une fonction de protection similaire à celle des protéines chaperonnes (Yang et al., 2005 ; Konrad and Bar-Zvi, 2008). En effet, lors d'essai d'inactivation d'activité enzymatique et de protéines, par dénaturation thermique, il a été montré que l'addition de la protéine SlASR1 purifiée permettait une stabilisation des protéines (Konrad and Bar-Zvi, 2008). Dans ce contexte, il est intéressant de noter que les protéines ASR seraient localisées à la fois dans le cytosol et le noyau (Kalifa et al., 2004 ; Takasaki et al., 2008). Un signal de localisation nucléaire (NLS) a été mis en évidence expérimentalement, grâce à la fusion avec des protéines fluorescentes, en C-terminal pour la protéine VvMSA (Cakir et al., 2003) et la protéine LLA23 (Wang et al., 2005).



**Figure 13. Les cultures céréalières et du maïs mondiales (adapté de FAOSTAT, 2010).** (A) La surface des cultures céréalières mondiales annuelles entre 2007 et 2009. (B) Les tendances du rendement des cultures de maïs dans différentes régions du monde en 1961 (gris) et 2009 (noir).

Néanmoins, ces études étaient basées sur l'utilisation de gènes rapporteurs, ce qui peut modifier la localisation subcellulaire de la protéine. Des études de microscopie confocale ont récemment montré que la protéine SIASR1 native était majoritairement localisée dans le cytosol en condition normale, comme en condition de stress osmotique (Urtasun et al., 2010).

#### **4. La sensibilité du maïs face à la sécheresse**

Le maïs (*Zea mays* L.) est une angiosperme monocotylédone de la famille des Poacées. C'est une espèce diploïde comportant dix paires de chromosomes. L'ancêtre du maïs est la téosinte avec laquelle il peut toujours s'hybrider. La culture du maïs a probablement commencé en Amérique centrale, notamment au Mexique, il y a plus de 7 000 ans. A la fin du 15<sup>ème</sup> siècle, après la découverte du continent américain par Christophe Colomb, le maïs a été introduit en Europe par l'Espagne. Il s'est ensuite répandu sous les climats chauds du bassin méditerranéen puis, un peu plus tard, en Europe du Nord. Mangelsdorf et Reeves (1939) ont montré que la culture du maïs se pratique dans toutes les régions agricoles du globe qui s'y prêtent et que du maïs est récolté quelque part dans le monde tous les mois de l'année.

Au niveau mondial, le maïs représente la seconde céréale mondiale après le blé pour l'alimentation directe ou indirecte de l'homme, et comme matière première pour la fabrication d'amidon, d'huiles, de protéines, de boissons alcooliques, d'édulcorants alimentaires et, plus récemment, de carburant (Fig. 13). En France, elle demeure la deuxième plante céréalière cultivée après le blé avec 1,679 millions d'hectares cultivés en 2009 ayant conduits à une production d'environ 15,3 million de tonnes (<http://faostat.fao.org>).

##### **4.1. La sensibilité du maïs à la sécheresse au stade reproducteur**

Le maïs est une graminée annuelle allogame et monoïque. Les fleurs mâles sont groupées sur la panicule terminale ramifiée, alors que les fleurs femelles sont rassemblées sur un ou plusieurs épis situés à l'extrémité de courtes ramifications naissant à l'aisselle des feuilles dans le deuxième tiers de la plante. Contrairement à d'autres espèces de céréales comme le blé ou l'orge, l'effet néfaste d'une sécheresse sur la production de grains n'est pas dû chez le maïs, à une stérilité des grains de pollen, mais à une augmentation du délai entre la floraison mâle et la floraison femelle (Westgate and Steudle, 1985). Ce phénomène, connu sous le terme de protandrie (ou ASI en anglais pour



« *anthesis-silking interval* »), limite le nombre d'évènements de fécondation et donc la production de grains (Barnabas et al., 2008). De plus, En cas de déficit hydrique, il est fréquent que dans les quelques jours suivant la fécondation, le développement de l'ovule fécondé s'arrête. Bien que la différence visuelle entre les grains qui vont avorter et les grains sains ne soit détectable qu'une dizaine de jours après la fécondation, il apparaît expérimentalement que l'avortement est initié très tôt, avant même que l'embryon ait eu le temps de se développer. Les mécanismes qui conduisent à cet avortement sont encore mal décrits. Le signal induisant l'arrêt du processus reste notamment à déterminer même si de nombreuses études semblent impliquer des sucres (Boyle et al., 1991 ; Zinselmeier et al., 1995).

#### ***4.2. La sensibilité du maïs à la sécheresse lors du développement végétatif***

Une sécheresse au cours de la croissance végétative de la plante peut également avoir des conséquences sur le rendement. Comme nous l'avons déjà évoqué, les plantes, et notamment le maïs, mettent en place différents mécanismes en réponse à un déficit hydrique, tels que la diminution de la croissance foliaire pour réduire au maximum les surfaces d'échange avec l'atmosphère, et la fermeture partielle des stomates pour limiter les pertes d'eau. En revanche, la croissance racinaire est moins affectée car elle permet de maintenir l'accès aux ressources en eau. Cependant, si cette stratégie permet de protéger la plante et de réduire son niveau de stress, elle pénalise de façon importante la photosynthèse qui est couplée aux pertes d'eau par transpiration puisqu'elle dépend de la surface foliaire et de l'état d'ouverture des stomates. Du même coup, ces réponses ont des conséquences importantes sur la productivité puisqu'elles affectent de manière irréversible (i) les caractéristiques du système racinaire, (ii) la biomasse totale de la plante et la surface des feuilles, (iii) la mise en place et le développement des organes et tissus reproducteurs.

### **B. L'amélioration de la réponse à la sécheresse**

Au niveau cultural, une des voies possibles pour économiser l'eau d'irrigation consiste à utiliser des géotypes qui tolèrent mieux les périodes de manque d'eau et nécessitent ainsi moins d'irrigation, ou qui valorisent mieux l'eau en produisant plus de biomasse par unité d'eau apportée. Les sélectionneurs ont à l'heure actuelle recours à trois stratégies génétiques pour améliorer des variétés commerciales : (i) la transgénèse qui consiste à transférer vers un géotype cible un gène dont la fonction ou les données d'expression sont connues ; (ii) la sélection classique qui consiste à effectuer des

croisements puis à sélectionner des génotypes favorables parmi les descendants au cours des générations par une évaluation phénotypique; (iii) la sélection assistée par marqueurs (SAM) qui d'une part coordonne une évaluation phénotypique et moléculaire pour l'identification de régions chromosomiques où il existe un locus possédant une relation entre l'allèle parental et la valeur du caractère mesuré, locus appelé QTL (« Quantitative Trait Locus »), et d'autre part permet une introgression de ces régions chromosomiques favorables dans d'autres lignées.

## **1. La transgénèse**

Le travail récent sur la transgénèse s'est concentré sur l'utilisation des biotechnologies pour la production de nouvelles plantes tolérantes aux stress abiotiques et/ou possédant une valeur nutritionnelle améliorée. Cependant, la transgénèse reste à ce jour une voie expérimentale essentiellement destinée à analyser les fonctions des gènes.

### ***1.1. La transgénèse : définition et méthodologies***

La transgénèse correspond à l'obtention d'organismes génétiquement modifiés (OGM), c'est-à-dire qu'elle consiste à transférer vers une plante un gène dont la fonction ou les données d'expression font supposer qu'il est favorable pour le caractère étudié. L'origine biologique des gènes utilisés peut être diverse. Les avancées biotechnologiques réalisées ces dernières années permettent maintenant d'introduire plusieurs gènes à la fois. Ceci est important à noter dans le contexte de l'amélioration de la tolérance à la sécheresse puisque ce processus complexe repose sur des réponses impliquant de nombreux gènes.

Chez le maïs, différentes méthodes existent pour la production de plantes transgéniques, telles que l'électroporation de culture d'embryons immatures, la transformation de suspensions cellulaires ou de cals embryogéniques par biolistique (bombardement de microparticules) et le transfert de gène via *Agrobacterium tumefaciens*. La transformation via *A. tumefaciens*, une bactérie gram-négative correspondant à un parasite génétique capable d'insérer une portion d'ADN dans le génome, et la biolistique demeurent les méthodes les plus largement utilisées (Naqvi et al., 2010). Pour permettre la sélection des maïs contenant le ou les transgènes d'intérêt, différents gènes sont introduits en supplément dans les constructions, tels que les gènes GFP et *bar* qui codent respectivement une protéine fluorescente et une protéine impliquée dans la résistance à des herbicides. De plus, la transgénèse permet de contrôler le stade de développement, le tissu et le niveau d'expression des gènes introduits pour une fonction optimale grâce à la région

promotrice introduite en amont de la séquence codante. C'est une considération importante si on désire qu'un gène donné agit seulement à un stade spécifique, dans un organe spécifique, ou dans des conditions spécifiques de stress. La panoplie de promoteurs disponibles pour la transgénèse chez le maïs reste à ce jour encore relativement limitée.

A l'heure actuelle, les principales cultures transgéniques sont le soja, le maïs, le coton et le colza qui sont principalement modifiés pour des caractères agronomiques, tels que la tolérance à des herbicides (HT) et/ou la résistance à des insectes (*Bacillus thuringiensis-Bt*). Sur une base mondiale, les cultures transgéniques représentent 77 %, 26 % et 49 % des cultures totales de soja, de maïs et de coton, respectivement. Actuellement, 60 % de toute la récolte transgénique cultivée correspond à la tolérance à l'herbicide (HT). Entre 2007 et 2008, le secteur du maïs transgénique cultivé aux USA a augmenté de 28 % à 48 % et cette tendance est probablement toujours en augmentation (Raymond Park et al., 2010).

### ***1.2. La transgénèse comme outil de connaissance de la fonction des gènes***

Suite au séquençage et à l'identification des séquences correspondant aux gènes dans un génome, il faut attribuer à chacun d'entre eux une fonction biologique, c'est-à-dire de déterminer à quoi sert la protéine qu'il code dans le fonctionnement de l'organisme. Ce travail repose, d'une part, sur les connaissances déjà acquises sur d'autres organismes puisque, de manière générale, certaines parties des séquences des gènes sont très conservées au travers des règnes, et d'autre part, sur l'étude de l'impact de l'absence ou de la sur-expression de ces gènes sur le fonctionnement des plantes.

Grâce à la transgénèse, il est possible d'inactiver ou de faire exprimer en quantité plus importante un certain nombre de gènes du génome d'une plante au sein de ses cellules, puis d'évaluer l'impact de ces modifications sur son comportement dans une condition de culture donnée, sur son métabolisme ou encore sur l'expression d'autres gènes impliqués dans le même processus cellulaire. Cette approche, appelée génomique fonctionnelle, est aujourd'hui utilisée à une grande échelle pour *A. thaliana* et le riz. Elle a permis de déterminer la fonction de nombreux gènes parmi les 30 000 environ que comportent les génomes de ces deux plantes. Elle est bien évidemment appliquée à la compréhension des mécanismes de tolérance à la sécheresse. C'est de cette façon que les facteurs de transcription DREB présentés précédemment (voir § 1.3.3.2) ont été caractérisés, leur absence et leur sur-expression entraînant respectivement une moins bonne et une meilleure tolérance des plantes à la sécheresse. C'est aussi le cas des gènes codant les aquaporines ou encore des gènes codant des enzymes impliquées dans la

synthèse des osmoprotectants pour le maintien d'une pression cellulaire suffisante pour le bon fonctionnement des cellules.

L'intérêt de travailler sur des plantes modèles est d'avoir à disposition les outils génétiques et moléculaires les plus performants pour comprendre les mécanismes cellulaires et physiologiques à la base du fonctionnement des plantes. A plus long terme, les connaissances acquises peuvent être transférées à d'autres espèces végétales proches. *A. thaliana* est par exemple un excellent modèle pour le colza alors que le riz constitue un modèle pour la plupart des autres céréales.

### ***1.3. La transgénèse comme outil pour l'amélioration de la tolérance à la sécheresse***

Les premiers transgènes utilisés correspondaient à « des gènes d'action simple », c'est-à-dire des gènes responsables de la modification d'un seul métabolite connu pour conférer une tolérance accrue à la sécheresse. Les gènes utilisés étaient ainsi impliqués dans la synthèse d'osmoprotectants, tels que la glycine bêtaïne, la synthèse d'acides gras, les processus de détoxification, de transport de l'eau, la régulation de la transcription ou la transduction (pour revue voir Bhatnagar-Mathur et al., 2008). De nos jours, les transgènes utilisés codent le plus souvent des protéines régulatrices, telles que des facteurs de transcription.

De nombreux travaux sont actuellement en cours au sein des sociétés semencières pour l'amélioration de la tolérance à la sécheresse du maïs grâce à la transgénèse. La société Monsanto, en collaboration avec BASF, annonce ainsi depuis quelques années une mise sur le marché américain de la première variété de maïs transgénique présentant un meilleur comportement vis-à-vis du déficit hydrique. Cette commercialisation qui aura lieu très vraisemblablement en 2012 (Gaufichon et al., 2010), résulte de l'introduction de gènes issus des bactéries *Escherichia coli* ou *Bacillus subtilis* et codant une ARN chaperonne CSP (« cold shock protein ») facilitant l'assemblage des édifices protéiques complexes (Castiglioni et al., 2008). L'expression des gènes *CspA* (*E. coli*) ou *CspB* (*B. subtilis*) permet un maintien de la photosynthèse et donc de la croissance, au stade végétatif comme au stade reproducteur, lorsque les plantes sont soumises à un déficit hydrique. Les augmentations de rendements moyens sont comprises entre 4,6% et 7,5% par rapport aux plantes contrôles. D'autres sociétés semencières, telles que les sociétés Pioneer, Syngenta et Limagrain mènent le même type de programme et avancent des échéances de cinq à sept ans.

Le maïs transgénique qui va être mis sur le marché par Monsanto et BASF aux Etats Unis ne contient qu'un seul transgène. Toutefois, les deux compagnies continuent

activement l'identification et les tests d'autres gènes impliqués dans l'amélioration de la tolérance à la sécheresse et annoncent la publication prochaine d'un autre candidat moléculaire sérieux (Gaufichon et al., 2010) La prochaine génération de plantes transgéniques tolérantes au stress hydrique sera le résultat de programmes de recherche comme celui-ci visant à trouver la meilleure combinaison de gènes (de deux à cinq probablement) pour optimiser les rendements en conditions de déficit hydrique. On parle d'empilement de gènes (plusieurs transgènes pour introduire plusieurs caractères). Il a ainsi été récemment montré que des maïs transgéniques sur-exprimant les gènes *betA* (codant une choline deshydrogénase d'*E. coli* impliquée dans la synthèse de la glycine bêtaïne) et *TsVP* (codant une V-H<sup>+</sup>-PPase de *Thellungiella halophila*) présentaient une teneur en eau relative (« relative water content », RCW) plus élevée, une croissance plus vigoureuse, une protandrie plus réduite et des rendements plus importants en condition de déficit hydrique par comparaison aux lignées sauvages (Wei et al., 2010).

## **2. La sélection génétique « classique »**

La sélection « classique » est la stratégie la plus utilisée pour la plupart des espèces végétales cultivées. Elle consiste à effectuer des croisements puis à sélectionner des génotypes favorables parmi les milliers de descendants au cours des générations suivantes. Les descendants présentant tous les caractères recherchés sont sélectionnés grâce à l'évaluation de critères phénotypiques dans des conditions de culture favorisant les plantes tolérantes au stress considéré. Cette sélection repose donc sur l'exploitation de la variabilité naturelle existant au sein d'une espèce et requiert un accès à des ressources génétiques aussi vastes que possibles, c'est-à-dire à la biodiversité.

### **2.1. La production d'hybrides plus tolérants à la sécheresse**

Biologiquement, chez le maïs et comme chez la plupart des espèces à fécondation croisée (allogames), le croisement de deux lignées pures donne un hybride beaucoup plus grand et productif que ses deux parents (c'est le phénomène de "vigreur hybride"). Cette propriété utilisée depuis 1930 aux Etats-Unis a permis d'améliorer les rendements du maïs en condition d'irrigation normale, ainsi qu'en condition de déficit hydrique. Pour identifier les lignées les plus résistantes au déficit hydrique, les plantes sont cultivées en conditions de stress et des critères dits phénotypiques sont mesurés. Ils correspondent à la manifestation visible pour l'agronome des changements métaboliques et physiologiques. Il s'agit principalement du retard de floraison femelle (protandrie), de l'enroulement et de la

sénescence des feuilles, de la taille des feuilles et des composantes du rendement, telles que le nombre d'épis par plante et le nombre de grains par épi. Des essais multisites réalisés sur des hybrides développés par la compagnie semencière Pioneer entre 1953 et 2001 ont montré une augmentation constante des rendements de 189 kg/ha/an pour le maïs irrigué et de 146 kg/ha/an pour le maïs cultivé en condition de sécheresse modérée (Campos et al., 2004). D'une façon générale, la sensibilité au déficit hydrique au moment de la floraison des génotypes les plus récents apparaît moins importante que celle observée pour les génotypes les plus anciens. Ce caractère ne faisait pas forcément partie des objectifs de sélection et cette amélioration provient sans doute en partie d'un effet indirect résultant d'une meilleure vigueur des plantes due à l'effet de l'hybridation.

## ***2.2. Les ressources génétiques***

Les programmes de sélection classique mis en œuvre par de nombreuses compagnies semencières et instituts nationaux ou internationaux de recherche explorent la variabilité génétique naturelle du maïs pour la sélection des génotypes les plus favorables vis-à-vis de la tolérance à la sécheresse. Ils ont permis de recenser la variabilité génétique locale mais également de l'enrichir pour la mise en place de collections de lignées conservées et exploitées dans la plupart de ces programmes. La sélection dite « classique », étant basée uniquement sur des caractères phénotypiques, permet d'utiliser la variation naturelle existant au sein de l'espèce. Elle suppose donc l'accès à des banques de ressources génétiques aussi exhaustives que possible. Le CIMMYT a ainsi constitué une banque de semences à Mexico représentative de la diversité génétique mondiale du maïs. Il en est de même des sélectionneurs privés. Cependant, les ressources génétiques naturelles sont encore peu utilisées, seulement 5% de la ressource génétique disponible étant utilisée dans les hybrides commerciaux de maïs (Hoisington et al., 1999).

## **3. La sélection assistée par marqueurs**

### ***3.1. La SAM : définition et exemples d'application***

La SAM ajoute une évaluation génétique à l'évaluation phénotypique à la base du processus de sélection classique des plantes. Elle s'appuie sur la variabilité naturelle de l'espèce ciblée et les travaux de détection de QTL, pour accélérer le processus de sélection en orientant de façon raisonnée le choix des génotypes qui combinent le maximum de caractères favorables.

Il est possible « d'étiqueter » les régions du génome des plantes leur conférant les caractères agronomiques souhaités. Cette technique repose sur l'identification de séquences d'ADN, appelées marqueurs moléculaires, qui ont des positions connues et stable d'une génération à l'autre dans le génome grâce à l'établissement préalable de cartes génétiques dont l'unité est le centimorgan (cM ; 1 cM correspond à la distance sur laquelle 1% des chromosomes ont recombines). Les marqueurs moléculaires, tels que les microsatellites, les RFLP (« restriction fragment length polymorphism ») et les CAPS (« cleaved amplified polymorphic sequence »), permettent de déterminer l'allèle présent dans les individus étudiés. En couplant, chez un ensemble d'individus en ségrégation (lignées recombinantes, F2, haploïdes doublés), une analyse génétique des marqueurs moléculaires et une analyse de leur phénotype (caractères observables et/ou mesurables), on peut détecter les relations statistiquement fiables entre la présence d'un marqueur et la valeur du caractère mesuré (par exemple le nombre de grains). Il sera alors possible de conclure à la proximité de certains marqueurs moléculaires avec les petites régions du génome responsables des caractères étudiés et appelées QTL. Cette analyse reposant sur les différences entre individus pour les caractères étudiés (taille du grain par exemple), elle va également permettre de déterminer si ces individus portent une forme du QTL plus ou moins favorable au caractère étudié. Lorsqu'un QTL a été détecté, la région chromosomique porteuse de l'allèle favorable pour le caractère étudié, peut être introduit (introgressé) dans le génome d'une plante élite grâce à une succession de croisements. A chaque étape, les individus ayant hérité de l'allèle favorable sont identifiés et sélectionnés grâce aux marqueurs moléculaires qui lui sont associés. Cette approche permet de réduire le nombre de croisements à quatre, alors qu'il était de six à huit initialement en sélection classique.

Un exemple de cette stratégie est fourni par l'utilisation des QTL de retard de floraison femelle par le CIMMYT pour obtenir des variétés tropicales plus tolérantes à la sécheresse (Ribaut et al., 1996, 1997, 2002). L'introduction de ces régions chromosomiques, dans du matériel génétique est un des exemples de réussite pour l'obtention de génotypes plus tolérants à la sécheresse. La sélection assistée visant l'introgression d'autres caractères, tels que l'ouverture des stomates et leur sensibilité aux hormones, la modification de l'architecture racinaire ou encore le maintien de la croissance foliaire au cours d'un déficit hydrique ont été tentés, mais la complexité de ces mécanismes n'a pas permis de résultats directement exploitables en sélection (Collins et al., 2008).

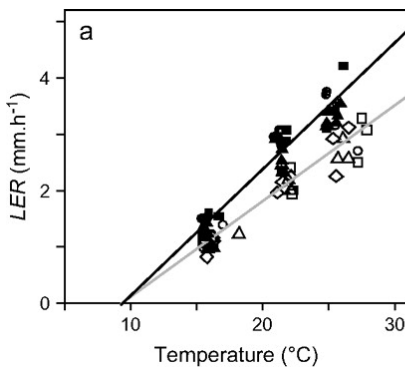
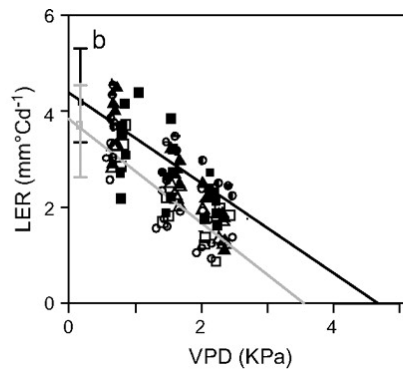
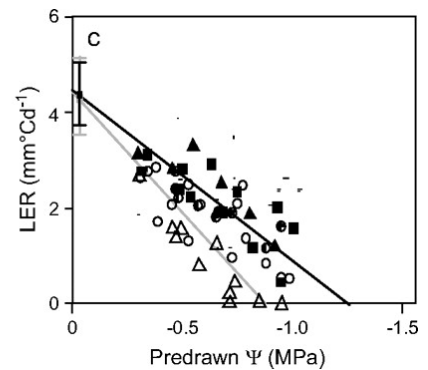
**A**

$$\text{LER} = dL / dt = (T - T_0) \times (a + b\text{VPD} + c\Psi_{\text{sol}})$$

Vitesse intrinsèque

Sensibilité à la demande évaporative

Sensibilité au déficit hydrique du sol

**B****C****D**

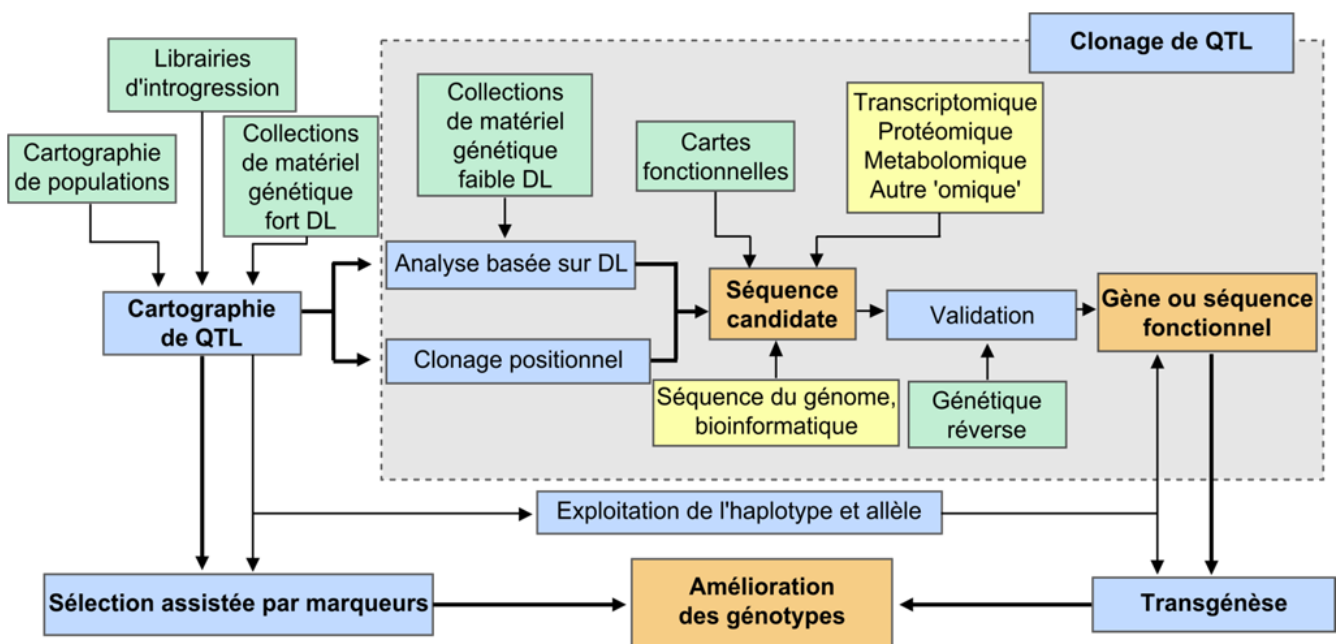
**Figure 14. Modèle écophysiological reliant la réponse de la plante aux variations environnementales (d'après Reymond et al., 2003, Welcker et al., 2007).** Le taux de croissance des feuilles (« leaf elongation rate », LER) est défini par la vitesse d'élongation des feuilles ( $dL$ ) et la durée d'élongation ( $dt$ ). La vitesse d'élongation a pu être modélisée par une équation (A) impliquant la réponse à la température (B), la sécheresse de l'air (C) et la sécheresse du sol (D). Les coefficients des paramètres sont estimés par la pente des courbes de réponse obtenues en faisant varier alternativement les différents paramètres environnementaux. Le paramètre  $a$  correspond à la pente de la réponse du LER à la température (B). Le paramètre  $b$  correspond à la pente de la réponse du LER à la demande évaporative (VPD; C). Le paramètre  $c$  correspond à la pente de la réponse du LER au potentiel hydrique du sol (D). Les symboles noirs et blancs indiquent les données expérimentales obtenues pour deux lignées recombinantes issues du croisement entre deux lignées tropicales contrastées pour la tolérance au déficit hydrique. Chaque symbole (carré, triangle, rond) correspond à une plante issue de trois expérimentations différentes.



### *3.2. Un modèle écophysologique stable pour identifier des QTL de réponse à la sécheresse*

De nombreux caractères peuvent être affectés par la sécheresse et ils diffèrent selon le stade de développement de la plante et le déficit hydrique considérés. Comme le déficit hydrique et les conditions climatiques naturelles fluctuent, il est quasiment impossible de reproduire des scénarios expérimentaux avec la même température, le même statut en eau du sol et la même demande évaporative (« vapor pressure deficit », VPD). Une alternative correspond à utiliser des modèles écophysologiques qui relient les caractères quantitatifs aux conditions environnementales.

Il a ainsi été proposé un modèle écophysologique basé sur l'étude de la longueur de la feuille, l'un des processus biologiques les plus sensibles au déficit hydrique, à travers deux caractères : la vitesse d'élongation et la durée d'élongation (Ben-Haj-Salah and Tardieu, 1997 ; Reymond et al., 2003). La vitesse d'élongation peut être modélisée par une équation impliquant trois paramètres environnementaux qui interviennent indépendamment et de façon linéaire : la température, la sécheresse de l'air et la sécheresse du sol (Fig. 14). L'estimation des coefficients de ces paramètres se fait en faisant varier alternativement les différents paramètres environnementaux, et en estimant la pente des courbes obtenues (a, b et c) représentant le paramètre. Par exemple, pour estimer le coefficient de réponse au déficit hydrique du sol (c), on fait varier le potentiel hydrique du sol en maintenant constantes la température et l'humidité relative de l'air. Les réponses obtenues sont linéaires et reproductibles pour toutes les répétitions d'un même génotype et pour des expérimentations différentes. Un génotype donné peut donc être caractérisé par un jeu de paramètres de courbes de réponses indépendamment des conditions expérimentales : le modèle est donc stable. L'ensemble des données obtenues sur des lignées recombinantes d'origine tempérées et tropicales a permis d'établir l'existence d'une variation génétique considérable pour les coefficients de réponse à la sécheresse de l'air et du sol (Reymond et al., 2003 ; Sadok et al., 2007 ; Welcker et al., 2007). Le potentiel hydrique qui arrête la croissance foliaire varie entre -0.6 et 1.6 MPa. Cela représente un écart important dans la mesure où -1.6 est généralement considéré comme étant le PWP (« permanent wilting point »), c'est-à-dire le point minimal d'humidité du sol requis par la plante pour ne pas se faner (en deçà de ce point, la plante ne peut plus retrouver sa turgescence une fois placée dans une atmosphère saturée pendant 12h), alors que -0.6 est un déficit hydrique relativement modéré. De plus, six zones représentant environ 10% du génome du maïs sont de manière consistante associées aux coefficients de réponse à la sécheresse de l'air et du sol (Tardieu et Welcker, sous presse). Enfin, il est intéressant de noter que des QTL de



**Figure 15. Caractérisation moléculaire des QTL par clonage positionnel, comparaison de cartographie et analyse ‘omique’ (adapté de Tuberosa et al., 2006).** Le texte et les flèches en gras indiquent respectivement le matériel initial et les étapes majeurs. Les rectangles verts correspondent aux ressources externes, les bleus aux analyses expérimentales, les jaunes aux principales étapes de génomique et les oranges aux résultats fondamentaux obtenus.

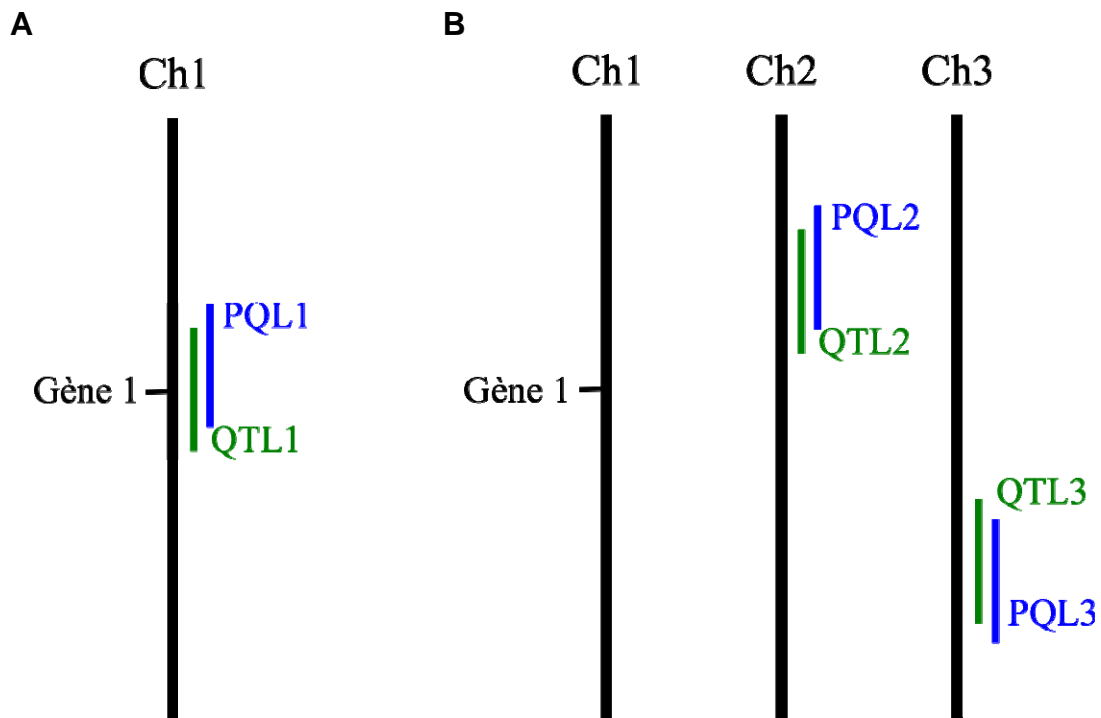
sensibilité à la sécheresse de l'air et du sol colocalisent avec des QTL de protandrie en condition de sécheresse, suggérant un déterminisme commun entre la croissance des tissus végétatifs et reproducteurs (Welcker et al., 2007).

### ***3.3. Identification des régions chromosomiques conférant le phénotype***

Dans la plupart des cas, la région physique co-ségrégeant avec le QTL est de grande taille (plusieurs dizaine de cM) et contient donc de nombreux gènes. Par exemple, Chez *A. thaliana*, la région chromosomique identifiée lors de la recherche de QTL impliqués dans le contrôle de la date de floraison contient jusqu'à 38 gènes (Werner et al., 2005). Des gènes co-localisant avec le QTL d'intérêt peuvent être sélectionnés sur la base de leur fonction prédite. Néanmoins, les progrès techniques les plus récents dans le secteur de la biologie moléculaire et de la génomique, ont désormais rendu possible le clonage positionnel (identification sur la base de sa position sur le chromosome) des QTL. Une alternative néanmoins moins longue et fastidieuse consiste à coupler chez un ensemble d'individus une analyse de leur transcriptome ou de leur protéome avec une analyse de leur phénotype. Elle permet alors de détecter des gènes ou des protéines candidats (Fig. 15 ; Tuberosa and Salvi, 2006).

#### ***3.3.1. Le clonage positionnel***

Quand la position approximative du locus est établie, le clonage positionnel permet d'assigner à un QTL un intervalle génétique le plus court possible, en obtenant grâce à la cartographie fine un marqueur moléculaire de chaque côté du locus et le plus proche possible de celui-ci (« QTL fine genetic mapping »). La population utilisée est issue du croisement de lignées quasi-isogéniques (« nearly isogenic lines », NILs) qui ne diffèrent que pour la région du QTL (habituellement entre 10 et 30 cM). Elle peut être produite selon différentes méthodes : (i) introgression à l'aide de croisements assistés par marqueurs d'un allèle du QTL dans un ou deux fonds génétiques parentaux, (ii) identification des individus hétérozygotes dans la région du QTL ; (iii) croisements avancés de l'analyse de QTL (« advanced backcross QTL analysis », ABQA) qui permet une combinaison de l'introgression de segments chromosomiques d'une accession sauvage dans une lignée élite et de la sélection par marquage moléculaire et phénotypage. Lorsque la résolution génétique s'approche du niveau du cM, les marqueurs les plus proches du QTL permettent un encrage de la carte génétique sur la carte physique, c'est-à-dire une séquence génomique ou un BAC couvrant la région du QTL. Ce transfert sur la carte physique



**Figure 16. La démarche gène et protéine candidats (d'après de Vienne *et al.*, 1999).** Deux cas de figure peuvent apparaître : (A) le QTL et le PQL co-localisent avec le gène codant la protéine candidate. Le gène est donc lui-même le candidat ; (B) le QTL et le PQL ne co-localisent pas avec le gène codant la protéine. Dans ce cas, le PQL n'est pas identifié. Il peut s'agir de tout gène dont le polymorphisme a une influence sur l'accumulation de la protéine, tel qu'un facteur de transcription ou un partenaire protéique. Ne pouvant pas exclure que la co-localisation soit due à l'effet du hasard, ne sont considérées comme candidates que les protéines pour lesquelles plusieurs co-localisations PQL/QTL sont observées.

permet l'identification de nouveaux marqueurs qui servent à affiner encore plus la cartographie génétique de la région du QTL et dans la recherche de gènes candidats. Dans cette phase, la bioinformatique fournit une contribution importante en termes de prédiction de gènes et d'annotation et d'exploitation des relations synténiques entre différents génomes. Après l'identification d'un ou plusieurs gènes ou séquences candidats, il reste à établir l'étape ultime qui est la démonstration que le gène identifié est bien le QTL recherché. Cette démonstration peut être réalisée par génétique d'association (recherche de corrélations entre des marqueurs moléculaires et le caractère d'intérêt dans une large collection de plantes représentant au mieux la diversité existant dans l'espèce), par complémentation fonctionnelle si l'on dispose d'un mutant ou par sur-expression ou sous-expression du gène identifié via la transgénése.

### 3.3.2. La stratégie gènes et protéines candidats

Le clonage positionnel est une méthode longue et fastidieuse. L'utilisation de la génomique fonctionnelle a donc permis des avancées nombreuses pour l'analyse et l'identification des QTL. En effet, l'analyse du transcriptome ou du protéome d'une population cartographiée peut permettre de considérer le niveau d'expression d'un seul gène comme un caractère quantitatif et de disséquer son contrôle génétique selon les méthodes classiques de la cartographie de QTL (Salvi and Tuberosa, 2005). Lorsque c'est la quantité de transcrit qui diffère on parle de eQTL pour « expression QTL » (Rockman and Kruglyak, 2006), alors que quand c'est la quantité de la protéine qui varie on parle de PQL pour « protein quantity locus » (Damerval et al., 1994).

Le laboratoire de Génétique Quantitative Moléculaire et Protéomique (GQMP), dans lequel j'ai effectué ma thèse, a mis en œuvre une stratégie « protéine candidate » combinant deux cribles : le premier, physiologique, consiste à retenir uniquement les protéines dont l'expression est modifiée en réponse au déficit hydrique, alors que le second, génétique, consiste à rechercher parmi ces dernières celles, dont les PQL sont co-localisés avec des QTL de réponse physiologique, morphologique ou agronomique de la plante au déficit hydrique. Deux cas de figures peuvent se présenter (Fig. 16) :

(1) Le PQL et le QTL sont co-localisés avec le gène codant la protéine en question. Le plus probable dans ce cas est qu'il existe un polymorphisme dans le gène (éventuellement dans le promoteur) qui influe sur le niveau d'expression de la protéine et en conséquence sur le caractère étudié. Le gène est donc lui-même le QTL candidat (Fig. 16A).

(2) Le QTL et le PQL ne sont pas co-localisés avec le gène codant la protéine (Fig. 16B). Dans ce cas, le PQL n'est pas identifié. Il peut s'agir d'un gène dont le polymorphisme a une influence sur l'accumulation de la protéine, tel qu'un facteur de transcription, mais aussi d'un gène impliqué dans le turnover ou les modifications post-traductionnelles de la protéine.

L'hypothèse du lien de cause à effet entre la variation d'expression de la protéine et celle du caractère étudié peut être faite, mais on ne peut pas exclure que la co-localisation soit l'effet du hasard. Les « protéines candidates » sont régulées en réponse au déficit, et leur variation d'expression pourrait être la cause de celle de caractères phénotypiques. La preuve finale de cette liaison de cause à effet doit être apportée par transgénèse ou par génétique d'association.

### **C. Présentation du travail de thèse**

L'équipe GQMP, dans laquelle j'ai effectué mon travail de thèse, cherche à approfondir les connaissances sur les réponses du maïs à la sécheresse et à identifier les gènes et les protéines responsables de la variabilité de caractères complexes affectés par cette contrainte via la stratégie « protéines candidates ». Dans ce contexte, mon travail de thèse a consisté à progresser dans les deux phases de cette stratégie. La première partie de mon travail a consisté à identifier et à caractériser les gènes et les protéines candidats associés à une région chromosomique contenant un QTL de sensibilité de la croissance foliaire au déficit hydrique du sol et un QTL de protandrie en condition de sécheresse. L'ensemble de ce travail est décrit dans le Chapitre 1 sous la forme d'un article en préparation, dont je suis le premier auteur, suivi d'un supplément expérimental, d'une discussion générale et de perspectives. Il a également conduit au dépôt de deux demandes de brevet présentées en annexe. La seconde partie de mon travail de thèse a consisté à étudier la fonction et les mécanismes de régulation d'une protéine candidate d'ores et déjà identifiée par l'équipe, la protéine ZmASR1. L'ensemble de ce travail est décrit dans le Chapitre 2 sous la forme d'un article en préparation, dont je suis le premier auteur, suivi de deux suppléments expérimentaux et méthodologiques, d'une discussion générale et de perspectives.

## **CHAPITRE 1**

**Identification de gènes et de protéines candidats associés à une  
région chromosomique contenant des QTL de réponses  
de la croissance foliaire et de la protandrie  
au déficit hydrique**

## **CHAPITRE 1. Identification de gènes et de protéines candidats associés à une région chromosomique contenant des QTLs de réponses de la croissance foliaire et de la protandrie au déficit hydrique**

### **1. Objectif**

Les recherches de protéines candidates effectuées jusqu'alors au laboratoire étaient basées sur la cartographie de PQL par analyse de populations de lignées recombinantes. Cette analyse est la plus complète car elle permet d'identifier plusieurs PQL pour une même protéine. Elle reste néanmoins extrêmement lourde en termes d'effectifs. Une nouvelle stratégie a donc été imaginée pour rechercher les gènes et les protéines candidates associées à un QTL déjà cartographié en l'absence du matériel génétique en principe approprié pour ce type d'analyse, c'est-à-dire des lignées quasi-isogéniques qui ne diffèreraient que dans la région contenant le QTL. La méthode a consisté à comparer parmi les lignées recombinantes qui ont originellement servi à sa détection, le mélange de celles qui avaient l'allèle favorable *F* (« favorable ») au QTL avec celles qui avaient l'allèle défavorable *U* (« unfavorable »). Les populations *F* et *U* étaient donc homogènes pour la région du QTL et hétérogènes dans le reste du génome. Par conséquent, si la variation génétique du reste du génome était bien échantillonnée dans les deux populations, seules les différences liées à la région chromosomique marquée seraient révélées, les autres variations entre les individus liées à d'autres loci étant noyées car aléatoirement réparties entre les deux populations *F* et *U* étudiées.

En concertation avec C. Welcker (UMR 0759 INRA, Montpellier), il a été décidé de focaliser l'étude sur une région chromosomique du maïs (bin 2.08) où co-localisaient un QTL de sensibilité de la croissance foliaire au déficit hydrique du sol et un QTL de protandrie en condition de sécheresse (Welcker *et al.* 2007). Deux sous-populations de lignées recombinantes ont été définies, l'une homozygote pour l'allèle favorable apporté par le parent P1 dans la région contenant les QTL (région de 47 cM définie par quatre marqueurs), et l'autre homozygote pour l'allèle du parent P2 dans cette même région. Des analyses protéomiques initiées par A. Puppo (M2R, équipe GQMP), couplées à des analyses transcriptomiques, ont été réalisées entre les mélanges de lignées recombinantes regroupées en fonction de leur génotype au QTL et du traitement subi par la plante (déficit hydrique/irrigation normale), ce qui a permis de tester un effet du génotype, du traitement et de l'interaction génotype x traitement (coll. avec l'équipe ACEP, PAPPSO et



Biogemma ; ANR Génoplande WaterLess). Des analyses par RT-PCR quantitative (qRT-PCR) ont été ensuite réalisées afin de confirmer que les gènes candidats identifiés étaient différemment exprimés en fonction de l'allèle au QTL. Des études complémentaires menées pour deux des gènes identifiés ont débouchés sur la production et la caractérisation de plantes transgéniques et le dépôt de deux demandes de brevet le 15 octobre 2010 (coll. Biogemma ; S. Mongrand, UMR 5200 CNRS Bordeaux ; V. Méchin, UMR 1318 Versailles ; Contrat de prévalorisation avec Génoplande-Valor).

1  
2  
3  
4 **An integrated transcriptomic, proteomic and biochemical analysis of bulked**  
5  
6 **recombinant maize inbred lines highlights the importance of the monolignol and**  
7  
8 **fatty acid biosynthetic pathways for growth responses to water deficit**  
9  
10

11  
12  
13  
14 Laëtitia Virlouvet<sup>1</sup>, Claude Welcker<sup>2</sup>, Valérie Méchin<sup>3</sup>, Sébastien Mongrand<sup>4</sup>, Hélène  
15  
16 Corti<sup>5</sup>, Adrien Puppo<sup>1</sup>, Chantal Arar<sup>6</sup>, Jean-Philippe Pichon<sup>6</sup>, Matthieu Falque<sup>5</sup>, Benoît  
17  
18 Valot<sup>5</sup>, François Tardieu<sup>2</sup>, Michel Zivy<sup>7</sup> and Sylvie Coursol<sup>5,\*</sup>  
19  
20

21  
22  
23 <sup>1</sup>Univ Paris-Sud, UMR 0320 /UMR 8120 Génétique Végétale, F-91190 Gif-sur-Yvette,  
24  
25 France  
26

27  
28 <sup>2</sup>INRA, UMR 0759 Laboratoire d'Ecophysiologie des Plantes sous Stress  
29  
30 Environnementaux, F-34060 Montpellier, France  
31

32  
33 <sup>3</sup>INRA, UMR 1318 Institut Jean-Pierre Bourgin, F-78026 Versailles, France  
34

35  
36 <sup>4</sup>CNRS, UMR 5200 Laboratoire de Biogenèse membranaire, F-33076 Bordeaux, France  
37

38  
39 <sup>5</sup>INRA, UMR 0320 /UMR 8120 Génétique Végétale, F-91190 Gif-sur-Yvette, France  
40

41  
42 <sup>6</sup>Biogemma Auvergne, F-63028 Clermont-Ferrand Cedex, France  
43

44  
45 <sup>7</sup>CNRS, UMR 0320/UMR 8120 Génétique Végétale, F-91190 Gif-sur-Yvette, France  
46

47  
48 **\*Corresponding author:** Sylvie Coursol; INRA, UMR 0320 /UMR 8120 Génétique  
49  
50 Végétale, F-91190 Gif-sur-Yvette, France; Tel: +33 1-69-33-23-68; Fax: +33 1 69 33  
51  
52 23 40; E-mail: [coursol@moulon.inra.fr](mailto:coursol@moulon.inra.fr)  
53

54  
55  
56 **E-mail addresses:**  
57

58  
59 Laetitia Virlouvet: [virlouvet@moulon.inra.fr](mailto:virlouvet@moulon.inra.fr)  
60

1  
2  
3  
4 Claude Welcker: welcker@supagro.inra.fr  
5

6 Valérie Méchin: valerie.mechin@versailles.inra.fr  
7

8 Sébastien Mongrand: sebastien.mongrand@biomemb.u-bordeaux2.fr  
9

10 Hélène Corti: corti@moulon.inra.fr  
11

12 Adrien Puppo: adrienpuppo@yahoo.fr  
13

14 Chantal Arar: chantal.arar@biogemma.com  
15

16 Jean-Philippe Pichon: jean-philippe.pichon@biogemma.com  
17

18 Matthieu Falque: falque@moulon.inra.fr  
19

20 Benoît Valot: valot@moulon.inra.fr  
21

22 François Tardieu: francois.tardieu@supagro.inra.fr  
23

24 Michel Zivy: zivy@moulon.inra.fr  
25

26 Sylvie Coursol: coursol@moulon.inra.fr  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34

35 **Running title:** Determinism of maize growth under water deficit  
36

37 **Key words:** maize, water deficit, growth responses, ZmMYB31, monolignols, fatty  
38 acids  
39  
40  
41  
42  
43  
44

45 Word count (excluding title page, references and supporting information) = 6939  
46

47 Word count breakdown into sections: Summary = 2460; Introduction = 790; Results =  
48

49 1776; Discussion (including Conclusion) = 2096; Experimental Procedures = 1201;  
50

51 Acknowledgements = 66; Figure Legends = 764  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## SUMMARY

Leaf growth and anthesis-silking interval (ASI) are important traits for maize tolerance to water deficit via their relation with light interception and grain setting, respectively. To gain further insight into the molecular-genetic mechanisms that underlie their sensibilities to water deficit, bulked segregant analysis was used to identify transcripts and proteins whose levels were controlled by a locus at bin 2.08 exhibiting quantitative trait loci for responses of leaf growth and ASI to water deficit. Recombinant maize inbred lines (RILs) were grouped according to the presence or the absence of the favourable allele conferring low reduction of leaf growth and short ASI under water deficit conditions. Each group was then evaluated by transcriptomic and proteomic profiling of the growing zone of the leaf from bulked RILs. Transcript and protein profiles combined with mapping analysis, resulted in the identification of 8 differentially expressed genes colocalizing with the targeted genomic region and involved in stress, transport, monolignol biosynthesis, cell wall modification and fatty acid biosynthesis. Among them, we identified the R2R3-MYB transcription factor *ZmMYB31* gene involved in the control of the monolignol pathway. We showed that *ZmMYB31* expression was correlated with that of its target genes *ZmCOMT* and *ZmCAD9*, as well as *ZmFatA* involved in fatty acid biosynthesis. In the same lines, the monolignol and fatty acid content was altered between bulked RILs. Based on these findings, we propose a model in which *ZmMYB31* modulates growth responses to water deficit via cell wall modification and fatty acid-derived metabolites.

## INTRODUCTION

Maize (*Zea mays* L.) is the second most important food grain crop and one of the major recipients of irrigation water (FAO, 2008; Amigues et al., 2006). This is in spite of the fact that, because of its C<sub>4</sub> metabolism, it has a low stomatal conductance, which limits transpiration (Tardieu and Simonneau, 1998), and an excellent water use efficiency, which provides more biomass per unit of transpired water than summer-grown C<sub>3</sub> species (Jones, 1992). The cause of its high sensitivity likely involves the development of the female inflorescence and its floral parts, which is vulnerable to delay or arrest by water deficit, leading to a substantial anthesis-silking interval (ASI) and in turn substantial losses in grain production (Boyer and Westgate, 2004). Because ASI coincides with a phase of silk development between the end of cell division and the arrest of cell growth, it is possible to infer that early ear development affects the ovule number and in turn grain number (Fuad Hassan et al., 2008). However, the mechanistic basis and genes involved in the ASI trait are not known. Sugars and ABA are thought to play a role in this water stress response (Setter et al., 2011). There is also evidence that maize silk and leaf growths under water deficit have common genetic determinisms (Welcker et al., 2007).

Leaf growth determines the ability of plants to intercept and convert light into biomass before and after flowering (Monteith, 1977). In maize and other grasses, it takes place in a growing zone (GZ; constant length of 7-8 cm in maize) at the base of the leaf (Tardieu et al., 2000; Granier and Tardieu, 2009). Because leaf growth is one of the first processes affected by water deficit (Boyer, 1970; Westgate and Boyer, 1986), many physiological studies concentrated in short-term responses and associated mechanisms. They demonstrated the roles of cellular and metabolic processes such as

1  
2  
3  
4 changes in cell turgor, hydraulic conductivity, cell wall plasticity and carbohydrate  
5 content (reviewed in Smeekens et al., 2010; Tardieu et al., 2011). However, the  
6  
7 integration of these processes at the whole-plant level is insufficiently understood. An  
8  
9 approach has therefore been developed to fill this gap for maize leaf growth challenged  
10  
11 by environmental conditions. Evaluation of leaf elongation rate (LER) sensitivities to  
12  
13 evaporative demand (slope of LER response to leaf-to-air vapour pressure difference  
14  
15 (VPD);  $LER_{VPD}$ ) and soil water deficit (slope of LER response to predawn leaf water  
16  
17 potential;  $LER_{deficit}$ ) in mapping populations of maize recombinant inbred lines (RILs)  
18  
19 showed that limited genomic zones are associated with  $LER_{VPD}$  or  $LER_{deficit}$  (Reymond  
20  
21 et al., 2003; Sadok et al., 2007; Welcker et al., 2007). Furthermore, both modelling and  
22  
23 experiments showed that quantitative trait loci (QTLs) influencing these traits translate  
24  
25 into differences in yield in multiple climatic scenarios and soil water status (Chenu et  
26  
27 al., 2009). Interestingly, four colocations were observed between ASI trait under water  
28  
29 deficit ( $ASI_{deficit}$ ) and  $LER_{deficit}$  (Welcker et al., 2007). These include a genomic region  
30  
31 at bin 2.08, which also harbours QTLs for leaf architecture and grain yield under water  
32  
33 deficit conditions (Ribaut et al., 2009; Capelle et al., 2010). It is noteworthy that the  
34  
35 alleles conferring higher LER conferred in all cases shorter ASI, i.e. maintained silk  
36  
37 elongation rate and subsequently ear growth (Sawkins et al., 2004). Therefore,  
38  
39 clarifying the genetic determinism of these traits will impact trait manipulation for  
40  
41 continued maize improvement in water-limited conditions.  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50

51 QTLs are positioned within chromosome intervals, which usually include  
52 several hundred genes, and delineating a QTL to a single gene using genetic approaches  
53 is time-consuming and technically demanding (Salvi and Tuberosa, 2005).  
54  
55  
56  
57

58 Alternatively, the expression profiling of a mapping population at the transcript or  
59  
60

1  
2  
3  
4 protein level enables to treat the expression level of a single gene as a quantitative trait  
5  
6 and to dissect its genetic control by QTL analysis. Candidate genes or proteins can then  
7  
8 be suggested by the colocation between their QTLs and those for the traits of interest  
9  
10 (Zivy and de Vienne, 2000; Salvi and Tuberosa, 2005). The aim of the present study  
11  
12 was to characterize the genomic region at bin 2.08, which led us to a modified strategy  
13  
14 based on bulked segregant analysis (Michelmore et al., 1991). RILs that were used for  
15  
16 QTL mapping were grouped according to the presence or the absence of the allele  
17  
18 conferring low  $LER_{\text{deficit}}$  and short  $ASI_{\text{deficit}}$ . Each group was then evaluated by  
19  
20 transcriptomic and proteomic profiling of the GZ from leaves of bulked RILs. We  
21  
22 identified 8 differentially expressed genes colocating with the QTL region and involved  
23  
24 in stress, peptide transport, cell wall and fatty acid (FA) biosynthesis. Based on lignin  
25  
26 composition and total fatty acid (FA) analyses, we propose a model in which the R2R3-  
27  
28 MYB transcription factor *ZmMYB31* modulates growth responses to water deficit via  
29  
30 cell wall modification and FA-derived metabolites.  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39

## 40 RESULTS

### 41 Strategy to identify candidate genes in the targeted QTL region by bulked 42 segregant-based analysis 43 44 45 46

47 To identify the genes underlying the QTLs for  $LER_{\text{deficit}}$  and  $ASI_{\text{deficit}}$ , selected  
48  
49 RILs that were used for QTL mapping (Figure S1; Welcker et al., 2007), were grouped  
50  
51 according to the alleles in the QTL region delimited by 4 markers covering 47 cM. Bulk  
52  
53 F (“favourable” allele) and bulk U (“unfavourable” allele) contained 18 RILs having the  
54  
55 allele brought by the drought-tolerant maize inbred line P1 and the drought-susceptible  
56  
57 maize inbred line P2, respectively, for both  $LER_{\text{deficit}}$  and  $ASI_{\text{deficit}}$  (Figure 1a). Thus, all  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4 RILs from the same bulk were genetically similar in the targeted region (allelic  
5 frequency of the favourable allele: 1 in one bulk and 0 in the other), while they were  
6  
7 dissimilar in the rest of the genome (expected allelic frequency: 0.5 in both bulks). It  
8  
9 was therefore expected that only markers linked to the region of interest would show  
10  
11 differences between bulked samples. Importantly, values of  $LER_{\text{deficit}}$  and  $ASI_{\text{deficit}}$   
12  
13 determined in phenotyping platform and in field mild drought conditions, respectively,  
14  
15 were previously found to be significantly different between the two bulks of RILs  
16  
17  
18  
19  
20  
21 (Figures 1b and 1c; Welcker et al., 2007).  
22

23  
24 To perform transcriptomic and proteomic analyses, the two bulks of RILs were  
25  
26 grown at vegetative stage in a growth chamber under well-watered and water deficit  
27  
28 conditions. We showed that the growth of the 5th and 6th leaves from both bulks was  
29  
30 decreased by around 36% and 40% in response to water deficit, respectively (Figure S2a  
31  
32 and S2b). Nevertheless, no significant difference was observed between bulks F and U.  
33  
34 Because ABA plays an important role in the stress response and tolerance of plant to  
35  
36 water deficit (Zhang and Davies, 1990), we also measured ABA content in the 5th leaf  
37  
38 from bulks F and U. We showed that ABA concentration significantly increased in  
39  
40 response to water deficit in a similar way in bulks F and U (Figure S2c).  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47

### 48 **The transcriptomic analysis reveals seven candidate genes**

49  
50 The 46K array constructed by the Maize Oligonucleotide Array Project  
51  
52 (<http://www.maizearray.org>) was used to compare the GZ transcriptomes of the 6th leaf  
53  
54 from bulks F and U under well-watered and water deficit conditions. The microarray  
55  
56 comparison revealed 70 transcripts that were differentially expressed between the bulk  
57  
58 F and the bulk U ( $P < 0.01$ ; 2-fold change in one or both treatment conditions; Table  
59  
60



1  
2  
3  
4 S1). Using mapping analysis as an additional criterion, the list was shortened to 7  
5  
6 differentially expressed genes colocalizing with the QTL region (Table S2). The  
7  
8 differential expression between the two bulks of RILs was confirmed for all candidate  
9  
10 genes by quantitative reverse transcription (qRT)-PCR on 4 individual RILs that had  
11  
12 been used for the initial microarray analysis (Figure 2 and Table S3). Among the 7  
13  
14 identified candidate genes, 6 showed strongest expressions in the bulk F, while one  
15  
16 (MZ00039906/MZ00013399) showed strongest expression in the bulk U (Figure 2).  
17  
18 Three candidate genes (MZ00019118, MZ00022414 and MZ00022562) showed  
19  
20 strongest expression in water deficit condition, while one candidate gene  
21  
22 (MZ00039906/MZ00013399) showed lowest expression in water deficit condition  
23  
24 (Figure 2).  
25  
26  
27  
28  
29

30  
31 Among the 6 candidate genes with higher expression in the bulk F, two shared  
32  
33 annotation related to transcriptional repressor, as they were annotated as MYB-related  
34  
35 Hv1 protein (MZ00022562; hereafter named *ZmMYB31* according to Fornale et al.  
36  
37 (2006)) and PnFL-2 protein (MZ00023501), which will be called *ZmJAZ2* protein  
38  
39 hereafter because of its highest identity with *Arabidopsis thaliana* jasmonate-ZIM  
40  
41 domain (JAZ) protein 2, a member of the JAZ repressor family involved in the  
42  
43 regulation of jasmonate-related oxylipin responses (Staswick, 2008; Table S1). Three  
44  
45 other candidate genes preferentially expressed in the bulk F likely encoded a vegetative  
46  
47 cell wall glycoprotein 1 (MZ00022414; hereafter named *ZmGPI* according to Voigt et  
48  
49 al., 2009), a plasma membrane group 4 remorin (MZ00019118, *ZmREM4.1*), whose  
50  
51 expression is strongly stress responsive (Raffaele et al., 2007), and a peptide transporter  
52  
53 (MZ00029327), which will be called *ZmPTR2* protein hereafter because of its highest  
54  
55 identity with *AtPTR2* encoding an *A. thaliana* tonoplasmic peptide transporter  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4 (Komarova et al., 2008). Finally, the last candidate gene preferentially expressed in the  
5 bulk F (MZ00013399/MZ00039906) encoded a 60S ribosomal protein L44  
6  
7  
8  
9 (ZmRPL44). The candidate gene preferentially expressed in the bulk U (MZ00016022)  
10  
11  
12 encoded a protein whose function is unknown.  
13

### 14 15 16 **ZmMYB31 expression is correlated with that of monolignol-related target genes** 17 18 **and with lignin monomeric composition and structure** 19

20  
21 The candidate gene *ZmMYB31* belongs to the subgroup 4 of the R2R3-MYB  
22 transcription factor family (Fornale et al., 2006). When expressed in *A. thaliana*, it  
23 functions as a repressor of both the maize and the *A. thaliana caffeic acid O-*  
24 *methyltransferase (COMT)* gene (Fornale et al., 2006, 2010) and as an enhancer of the  
25 *A. thaliana cinnamyl alcohol dehydrogenase 6 (AtCAD6)* (Fornale et al., 2006). These  
26 two latter genes are involved in the biosynthesis of lignin monomers (Figure 3a).  
27  
28 Interestingly, among the 70 genes with expression changes in the bulk F compared with  
29 the bulk U, one (MZ00004221;  $P < 0.001$ ) showed highest similarity with *AtCAD9* and  
30 will therefore be called *ZmCAD9* hereafter (Table S1). Microarray analysis showed that  
31 *ZmCAD9* gene expression was stronger in the bulk F than in the bulk U (Figure 3b),  
32 similarly to that was observed for the candidate gene *ZmMYB31* (Figure 2). While  
33 expression of the *ZmCAD9* gene could not be confirmed by qRT-PCR because of its  
34 low abundance in the GZ, we showed that the *ZmCOMT* gene was more expressed in  
35 the bulk F than in the bulk U (Figure 3c), as observed for *ZmMYB31* (Figure 2).  
36  
37 Expression of the *ZmCOMT* gene was also higher in water deficit condition than in  
38 well-watered condition (Figure 3c).  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5 To obtain additional clues with regard to *ZmMYB31* gene function, we analyzed  
6 fragments of the GZ and the differentiation zone (DZ) from the 6th leaf for lignin  
7 composition. Grass lignins consist of *p*-hydroxyphenyl units (H) derived from *p*-  
8 coumaryl alcohol, guaiacyl units (G) derived from coniferyl alcohol, and syringyl units  
9 (S) derived from sinapyl alcohol (Figure 3a). The H, G and S units of grass lignins are  
10 interconnected through labile  $\beta$ -O-4 ether bonds and a series of resistant carbon-carbon  
11 and biphenyl ether linkages. We therefore used thioacidolysis for the determination of  
12 H, G and S lignin units involved in  $\beta$ -O-4 ether bonds in both the GZ and the DZ. The  
13 levels of H lignin unit did not differ between both bulked RILs (Figures 3d and 3e). In  
14 contrast, the levels of G and S lignin units were higher in the bulk F than in the bulk U  
15 irrespective of the treatment condition and the leaf fragment (Figures 3d and 3e). Levels  
16 of both G and S lignin units were also higher in water deficit condition than in well-  
17 water condition in the GZ (Figure 3d). In contrast, only the level of G lignin unit was  
18 higher in water deficit condition than in well-watered conditions in the DZ (Figure 3e).  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39

#### 40 **The proteomic analysis reveals three candidate proteins**

41  
42 To complement the microarray study, a comparative proteomic survey was  
43 performed using two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) on a fragment of the GZ  
44 of the 6th leaf from bulks F and U under well-watered and water deficit conditions. The  
45 gel comparisons revealed 3 protein spots that were significantly ( $P < 0.01$ ) more  
46 abundant (s2602 and s2730) or less abundant (s3076) in the bulk F than in the bulk U  
47 under both well-watered and water deficit conditions (Figure 4 and Table S4).  
48  
49

50  
51 Subsequent analyses by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-  
52 MS/MS), followed by an interrogation of the Maize Genome Sequences and BLAST  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4 analysis against the *A. thaliana* genome, led to the identification of the 3 candidate  
5  
6 proteins (Table S4). The two proteins more abundant in the bulk F were annotated as  
7  
8  $\alpha/\beta$  fold hydrolase (s2602) and enoyl-acyl carrier protein (ACP) reductase (s2730;  
9  
10 ZmENR1), which catalyzes the final reduction step of the FA synthesis cycle (Chan and  
11  
12 Vogel, 2010). The s3076 protein more abundant in the bulk U showed highest similarity  
13  
14 to the nucleocytoplasmic pyrabactin resistance (PYR)/PYR-like (PYL)/regulatory  
15  
16 components of ABA receptor (RACR) protein 12 (AtPYR/PYL/RACR12), a member of  
17  
18 the recently discovered PYR/PYL/RACR protein family that functions as direct ABA  
19  
20 receptors (Cutler et al., 2010), and will therefore be called ZmPYR/PYL/RACR12  
21  
22 hereafter. Mapping of the genes encoding the 3 candidate proteins showed that none of  
23  
24 them were collocated with the chromosomal segment harbouring the targeted QTLs  
25  
26 (Table S2). Nevertheless, the *ZmFatA* gene encoding a protein partner of the candidate  
27  
28 protein ZmENR1, mapped on the chromosomal segment harbouring the targeted QTLs  
29  
30 (Table S2).  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39

#### 40 **Identification of an additional candidate gene, *ZmFatA*, encoding a protein partner** 41 42 **of the candidate protein ZmENR1**

43  
44 The *ZmFatA* gene encodes an acyl-ACP thioesterase (TE) that terminates the  
45  
46 plastidial FA biosynthesis cycle (Figure 5a). The resulting free FAs enter the cytosol  
47  
48 where they are esterified to coenzyme A and further metabolized into membrane lipids  
49  
50 and/or storage triacylglycerols (Figure 5a). Plant TEs have been shown to cluster into  
51  
52 two classes, FatAs, which show marked preference for 18:1-ACP with minor activity  
53  
54 towards 18:0- and 16:0-ACPs, and FatBs, which hydrolyze primarily shorter-chain,  
55  
56 saturated acyl-ACPs (Salas and Ohlrogge, 2002; Mayers and Shanklin, 2007).  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5 Interestingly, the ENR and the TE proteins may form a metabolon, which is thought to  
6 greatly increase reaction rates and provide possibilities for greater regulation of  
7 biochemical activity (Brown et al., 2006). Consequently, we hypothesized that  
8 regulation of *ZmFatA* gene might impact on the levels of the candidate protein  
9 *ZmENR1* to maintain the metabolic channelling occurring during this metabolic  
10 pathway. Therefore, we quantified the transcript levels of these genes by qRT-PCR in  
11 the GZ of bulks F and U under well-watered and water deficit conditions. The *ZmENR1*  
12 gene showed no significant difference between the two bulks (Figure 5b). In contrast,  
13 the *ZmFatA* gene was preferentially expressed in the bulk F compared to the bulk U  
14 (Figure 5b), like the *ZmENR1* protein. Additionally, the *ZmFatA* gene showed strongest  
15 expression in water deficit condition in both bulks (Figure 5b).  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29

30 To go further, we analyzed by gas chromatography (GC) analysis the total FA  
31 composition of fragments of the GZ and the DZ from the 6th leaf. In the GZ, the total  
32 FA content showed (1) no significant difference between the two bulks in well-watered  
33 condition, (2) a decrease in the bulk U targeting specifically palmitate (16:0) and oleate  
34 (18:1) in water deficit condition, (3) a general decrease in the bulk F, which is strongest  
35 compared with the bulk U, in water deficit condition (Figure 5c). In the DZ, the total FA  
36 content showed (1) an increase in 18:1 and linolenate (18:3) in the bulk F compared  
37 with the bulk U in well-watered condition, (2) a decrease in 18:1 in the two bulks,  
38 which is lower in the bulk F than in the bulk U in water deficit condition (Figure 5d).  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53

## 54 DISCUSSION

### 55 Transcriptomic and proteomic analyses identified distinct candidate genes

56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4 The bulked segregant analysis is often used to identify molecular markers  
5 associated with quantitative traits (Michelmore et al., 1991; Altinkut and Gozukirmizi,  
6 2003; Lin et al., 2006). Here, we used this method to identify transcripts and proteins  
7 whose amounts were regulated by a locus at bin 2.08 harbouring QTLs for LER<sub>deficit</sub> and  
8 ASI<sub>deficit</sub> (Sawkins et al., 2004; Welcker et al., 2007), as well as QTLs for leaf  
9 architecture and grain yield under water deficit conditions (Ribaut et al., 2009; Cappelle  
10 et al., 2010). The underlying hypothesis was that genes that were differentially  
11 expressed as a function of the allele in the QTL region might be involved in the  
12 variation of the trait of interest.  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24

25  
26 No detectable differences could be observed between the two bulks for LER  
27 reduction of the 5th and 6th leaves upon water deficit. This was probably related to a  
28 lower precision of the measure compared with that was performed previously (daily  
29 manual measurements versus continuous automatic measurements; Sadok et al., 2007;  
30 Welcker et al., 2007). On the other hand, this absence secured that the variations  
31 observed between the two bulks were not related to different physiological and cellular  
32 states, but rather to a genetic polymorphism. Furthermore, the absence of difference in  
33 ABA content between the two bulks suggests a genetic mechanism of tolerance to water  
34 deficit downstream ABA or ABA-independent.  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46

47 Seventy transcripts and 3 proteins were differentially expressed between the two  
48 bulks of RILs. Interestingly, the comparative proteomic analysis revealed different  
49 target genes from the microarray analyses. Therefore, the two approaches were  
50 complementary. Among the identified differentially expressed genes, 8 mapped with the  
51 chromosomal segment harbouring the QTLs for LER<sub>deficit</sub> and ASI<sub>deficit</sub> previously  
52 identified (Sawkins et al., 2004; Welcker et al., 2007). According to our starting  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4 hypothesis, the differential expression of a single gene could explain the targeted QTLs.  
5  
6 Consequently, the other differentially expressed genes could be either not related to the  
7  
8 traits of interest or regulated by the actually positive candidate gene. In the latter case,  
9  
10 their differential expression could impact the traits of interest.  
11  
12  
13  
14  
15

### 16 **Changes in expression and metabolite composition in relation to the maize leaf** 17 18 **developmental gradient**

19  
20 Among the 8 identified candidate genes, 4 (*ZmREM4.1*, *ZmGPI*, *ZmMYB31* and  
21  
22 *ZmFatA*) showed strongest expression in water deficit condition, whereas one  
23  
24 (*ZmRPL44*) showed lowest expression in water deficit condition. It is worth noting that  
25  
26 there is a gradient of tissue age along the maize leaf. Because leaf growth is reduced  
27  
28 under water deficit condition, tissues of the same age are closer to the leaf point of  
29  
30 insertion in water-stressed leaves than in well-watered leaves (Ben-Haj-Salah and  
31  
32 Tardieu, 1995; Ben-Haj-Salah and Tardieu, 1997; Vincent et al., 2005). Consequently,  
33  
34 transcript, protein and metabolite profiles may appear more abundant under water  
35  
36 deficit condition when their levels increased from leaf base to top (Vincent et al., 2005).  
37  
38 In this context, to ensure that the variations observed were not influenced by the side  
39  
40 effect of growth reduction, we investigated the expression profiles of the 8 identified  
41  
42 candidate genes using the transcriptomic dataset recently generated along the maize leaf  
43  
44 (Li et al., 2010). *ZmREM4.1*, *ZmGPI*, and *ZmFatA* showed an increase in transcript  
45  
46 levels in the leaf segment undergoing the sink-source transition located above the GZ  
47  
48 (Figure S3). In contrast, *ZmRPL44* and *ZmMYB31* showed preferential expression at the  
49  
50 base of the leaf and no clear difference in the transition zone compared with the GZ,  
51  
52 respectively (Figure S3). Thus, only *ZmRPL44* and *ZmMYB31* genes can be described  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4 without any ambiguity as responsive to water deficit in the GZ of the maize leaf, while  
5  
6 changes in transcript levels of the other candidate genes may be related to the side effect  
7  
8 of growth reduction. It is worth noting that *ZmREM4.1* orthologs in *A. thaliana* and rice  
9  
10 show a marked increase after drought stress and treatment of plants with  
11  
12 phytohormones such as ABA (Raffaele et al., 2007; Ray et al. 2010).  
13  
14  
15  
16  
17

### 18 19 **The two candidate genes undergoing regulation by water deficit are involved in** 20 21 **protein and lignin biosynthetic pathways** 22

23  
24 The candidate gene *ZmRPL44* encodes a 60S ribosomal protein L44 involved in  
25  
26 protein synthesis. In the GZ, tissue expansion is due to cytoplasmic growth and cell  
27  
28 proliferation that may require significant ribosome biosynthesis and translational  
29  
30 capacity (Sugimoto-Shirasu and Roberts, 2003). In the present study, *ZmRPL44*  
31  
32 expression was higher in the drought-tolerant bulk F than in the drought-sensitive bulk  
33  
34 U, and down-regulated in response to water deficit. It is noteworthy that 5 other 60S  
35  
36 ribosomal proteins were differentially expressed between the two bulks of RILs.  
37  
38 Therefore, it may be speculated that *ZmRPL44* contributes to the growth maintenance  
39  
40 of leaves and silks under water deficit through targeted protein synthesis.  
41  
42  
43

44  
45 The second candidate gene up-regulated in response to water deficit is the  
46  
47 R2R3-MYB transcription factor *ZmMYB31* involved in lignin biosynthesis, a complex  
48  
49 and heterogeneous phenylpropanoid polymer that constitutes one of the major  
50  
51 components of the secondary walls of xylem cells and fibres (Fornale et al., 2006, 2010;  
52  
53 Zhao and Dixon, 2011). In the present study, we established a direct link between  
54  
55 growth responses to water deficit and *ZmMYB31*-dependent regulation of monolignol  
56  
57 biosynthesis by the observation that *ZmMYB31* expression was strongest in the bulk F,  
58  
59  
60



1  
2  
3  
4 just like the expression of two monolignol-related genes *ZmCAD9* and *ZmCOMT*. The  
5  
6 expression pattern of the *ZmCOMT* gene was unexpected based on the heterologous  
7  
8 expression reports of Fornalé et al. (2006, 2010) in *A. thaliana*. Nevertheless,  
9  
10 differences between the two bulks of RILs in the GZ were consistently detected in the  
11  
12 levels of the  $\beta$ -O-4 linked G and S monolignols in both well-watered and water deficit  
13  
14 conditions. There were also marked, but smaller differences, in the levels of the  $\beta$ -O-4  
15  
16 linked G and S monolignols between the two bulks of RILs in the DZ. Consequently,  
17  
18 the *ZmMYB31* protein might act as both a transcriptional activator and a repressor,  
19  
20 depending on the context of the target sequence, which might influence its interaction  
21  
22 with other regulatory proteins, as previously suggested for *AtMYB15* (Agarwal et al.,  
23  
24 2006).  
25  
26  
27  
28  
29

30 We previously showed that water deficit induced a reduction of  $\beta$ -O-4 linked  
31  
32 monolignols in the DZ of the maize leaf (Vincent et al., 2005). This is not inconsistent  
33  
34 with our present finding of higher levels of  $\beta$ -O-4 linked G and S monolignols in the  
35  
36 bulk F than in the bulk U. First, it can be conceived that higher levels of  $\beta$ -O-4 linked G  
37  
38 and S monolignols reflect a higher level of lignin in the cell wall, independently of  
39  
40 environmental conditions. It has been reported that lignin not only provides terrestrial  
41  
42 plants with rigidity against compressive forces but also forms a mechanical barrier  
43  
44 against abiotic stresses such as water deficit (Moura et al., 2010). In particular, the  
45  
46 aromatic properties of lignin make the cell wall impermeable to water, which reduces  
47  
48 transpiration and assists with maintaining normal turgor pressures under water deficit  
49  
50 (Monties and Fukushima, 2001). Consistently, recent studies have shown that the  
51  
52 process of lignification and strongest expression levels of lignin biosynthesis-related  
53  
54 genes, such as *CAD* and *COMT*, are important for tolerance to water deficit (Hu et al.,  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5 2009). It is also worth noting that close correlations were observed between the drought  
6 tolerant coefficients for leaf lignin content and ASI (Hu et al., 2009). Additionally, rice  
7 plants treated with drought stress for 72 h showed increased expression of several genes  
8 involved in lignin biosynthesis, including *CAD* (Yang et al., 2006), and similar results  
9 have been obtained with *Citrullus lanatus* sp., which displays extraordinary tolerance to  
10 drought stress conditions (Yoshimura et al., 2008). Second, it can be speculated that the  
11 altered levels of  $\beta$ -O-4 linked G and S monolignols reflect an altered lignin structure  
12 with a constant lignin level. Lignin molecules with increased  $\beta$ -O-4 ether bonds adopt a  
13 preferential parallel orientation relative to the cellulose surface (Besombes and Mazeau,  
14 2005). Thus, it can be hypothesized that increases in  $\beta$ -O-4 ether bonds in the bulk F  
15 could enhance lignin interaction with the cellulose, leading to reduction of water losses.  
16 Collectively, the results presented here suggest that *ZmMYB31*-dependent regulation of  
17 genes involved in cell wall biosynthesis may provide an advantage for growth responses  
18 under water deficit. This hypothesis is strengthening by the presence of two further cell  
19 wall-related genes in the list of genes differentially expressed between the two bulks of  
20 RILs, namely *ZmPPE8B* (MZ00035817) of the pectin methylesterase family (Pelloux et  
21 al., 2007) and *ZmGPI* of the hydroxyproline-rich glycoprotein (HRGP) superfamily  
22 (Showalter et al., 2010).  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45

46  
47 Transcriptome data comparing *A. thaliana* plants misexpressing *AtMYB30* and  
48 *AtMYB41* with those of the wild-type (Cominelli et al., 2008; Raffaele et al., 2008) also  
49 argue in favour of *ZmMYB31* as the actually positive candidate gene explaining the  
50 targeted QTLs and regulating other differentially expressed genes. First, among the  
51 genes showing changes in expression in *A. thaliana* plants misexpressing *AtMYB30*,  
52 there are in particular the lignin-related *cinnamoyl-CoA reductase (CCR)* gene and the  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4 FA-related *FatB* gene (Raffaele et al., 2008). Second, among the up-regulated genes in  
5  
6  
7 *AtMYB41* overexpressing *A. thaliana* plants, there are 10 genes that share similar  
8  
9  
10 annotation with those identified in the present study as differentially expressed between  
11  
12 the two bulks of RILs, including two genes coding for ZmMYB31 orthologs (*AtMYB4*  
13  
14 and *AtMYB7*), two for pectinesterases close to *ZmPPE8B*, one for COMT and one for  
15  
16 *FatA* (Cominelli et al., 2008). In this context, these results suggest that ZmMYB31  
17  
18 might be involved in cell wall modification, as well as FA biosynthesis.  
19  
20

### 21 22 23 **Changes in the FA biosynthetic pathway between the two bulks of RILs**

24  
25  
26 De novo FA synthesis in plants occurs in plastids and is catalyzed by a type II  
27  
28 FA synthase (FAS) complex in which separate enzyme catalyze sequential reactions  
29  
30 (Beisson et al., 2003). At the final, FAs are exported to the cytoplasm as CoA esters that  
31  
32 are incorporated into lipids. Here, we showed that the preferential expression of the  
33  
34 candidate gene *ZmFatA* in the bulk F correlated with the expression levels of the  
35  
36 *ZmENR1* protein, reinforcing the hypothesis that the two subunits ENR and TE of the  
37  
38 FAS complex form a metabolon (Hellyer et al., 1992; Honeyman and Fawcett, 2000).  
39  
40 While limited functional information is available on *FatA*, a mutation in the *AtFatB*  
41  
42 gene results in severe growth retardation and alteration in the supply of saturated FAs  
43  
44 for very-long-chain FA (VLCFA) biosynthesis (Bonaventure et al., 2003). Similarly, the  
45  
46 *mod1* mutant that is affected in the *A. thaliana ENR* gene, displays multiple  
47  
48 morphological phenotypes, including chlorotic and curly leaves, premature senescence  
49  
50 and reduced fertility (Mou et al., 2000). Thus, there is converging evidence that the *ENR*  
51  
52 and *TE* genes play important role in plant growth.  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4 Surprisingly, in the GZ, we found that the C16 to C18 FA contents varied  
5  
6 inversely with changes in expression of the two FA biosynthesis-related *ZmENR1* and  
7  
8 *ZmFata* genes. An explanation may be that the balance of total FAs is altered in favour  
9  
10 of FA derivatives contributing to inducible water stress resistance. According to our  
11  
12 microarray data, expression of the wax synthesis marker *CER1* (Aarts et al., 1995) is  
13  
14 down-regulated in the bulk F compared with the bulk U, suggesting that VLCFAs are  
15  
16 redirected to the synthesis of other derivatives involved in water deficit responses.  
17  
18 Interestingly, cutin is comprised of C16 and C18 FAs and their oxygenated derivatives  
19  
20 (Lequeu et al., 2003; Pollard et al., 2008). Besides waxes, Kosma et al. (2009) recently  
21  
22 reported that water deficit increased the amount of nearly all leaf cutin monomers on *A.*  
23  
24 *thaliana* by 65%, producing plants with less permeable cuticles. NaCl and ABA induce  
25  
26 leaf waxes, but in contrast to water deficit, have little or no effects on cutin monomers  
27  
28 (Kosma et al., 2009). Thus, it can be hypothesized that alteration of FA synthesis would  
29  
30 impact on components of the cutin. Though it is yet unclear what role cutin plays in  
31  
32 cuticle permeability, it is noteworthy that *AtMYB41*, similarly to *ZmMYB31*, is more  
33  
34 abundant in plants experiencing water deficit (Kosma et al., 2009). Collectively, these  
35  
36 data suggest that *ZmMYB31* might modulate growth responses to water deficit by  
37  
38 promoting the generation of FA-derived molecules. Future work will be conducted to  
39  
40 identify these FA derivatives.  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50

## 51 CONCLUSION

52  
53 In conclusion, we showed here that the two bulks of RILs that differed for their  
54  
55 genotype in a chromosomal region harbouring QTLs for  $LER_{\text{deficit}}$  and  $ASI_{\text{deficit}}$ ,  
56  
57 exhibited differential and coordinated expression of genes involved in monolignol  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4 biosynthesis, cell wall modification and de novo FA biosynthesis, as well as differential  
5  
6 lignin monomer and FA compositions in the GZ of the leaf. Consequently, a working  
7  
8 model representing ZmMYB31-dependent regulation of these different pathways in leaf  
9  
10 and ASI responses to water deficit may be proposed. Additionally, these findings set the  
11  
12 stage for further functional studies through transgenesis or association genetics.  
13  
14  
15  
16  
17

## 18 **EXPERIMENTAL PROCEDURES**

### 19 **Plant material and growth condition**

20  
21 The study was carried out on RILs developed by CIMMYT at the 6th inbreeding  
22  
23 level from the cross between the two tropical maize inbred lines Ac7643 and  
24  
25 Ac7729/TZSR W referred as P1 and P2, respectively (Ribaut et al., 1996). Bulks F and  
26  
27 U included 18 RILs with P1 and P2 alleles, respectively, at the 4 markers umc92a,  
28  
29 bnl8.29c, umc137a and umc150b on bin 2.08, and dissimilar in the rest of the genome,  
30  
31 similarly to that was observed within the reference mapping population (Welcker et al.,  
32  
33 2007). To carry out the water deficit experiment, plants were grown in a controlled  
34  
35 growth cabinet (period of 16 h at  $450 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  light intensity, 25/18°C (day/night) and  
36  
37 50% relative humidity) with appropriate daily watering (50% soil water content) until  
38  
39 the 5th leaf reached a 30-cm length (about 21 days in average). At this stage (day 0),  
40  
41 each bulk was either submitted to water limitation (35% soil water content; water deficit  
42  
43 condition) or daily irrigated (50% soil water content; well-watered condition). Each  
44  
45 bulk was represented by 18 RILs in each condition. The 5th and 6th leaves were  
46  
47 harvested 7 days after day 0 (water deficit condition) or after 3 days of constant LER  
48  
49 (well-watered condition), 5 to 7 h after the onset of the light period. Two-cm-long  
50  
51 fragments of the 6th leaves and a 10-cm-long fragment in the middle of the 5th leaf  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4 blades were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until analysis. All  
5  
6 samples were ground in a 2-mL microcentrifuge tube containing both 5 and 7 mm iron  
7  
8 beads for 2 to 3 series of 20 s using a TissueLyser II at 20 Hz (Qiagen). ABA content  
9  
10 was determined for each individual plant. Microarray, 2-DE, lignin and FA analyses  
11  
12 were performed on 2 or 3 independent biological replicates, which were a pool of 5 to 6  
13  
14 RILs from the same bulk. For qRT-PCR assays, 4 RILs that were involved in the  
15  
16 replicate used for the initial microarray experiment, were independently analyzed for  
17  
18 each bulk.  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25

### 26 **ABA content measurement**

27  
28 ABA content of dry leaf segment was determined as described (Quarie et al.,  
29  
30 1988) using samples dissolved in distilled water at 20  $\mu\text{L mg}^{-1}$  dry weight and shaken  
31  
32 during 24 h at 4°C.  
33  
34  
35  
36  
37

### 38 **Microarray analysis**

39  
40 Total RNA was extracted using the Nucleospin 8 RNA extraction Kit  
41  
42 (Macherey-Nagel) and *in vitro*-amplified based on suggestions from the Maize  
43  
44 Oligonucleotide Array Project  
45  
46 ([http://www.maizearray.org/files/cRNA\\_Target\\_Production\\_Using\\_RNA\\_Amplification.pdf](http://www.maizearray.org/files/cRNA_Target_Production_Using_RNA_Amplification.pdf)). Hybridization was carried out as described  
47  
48 ([http://www.maizearray.org/files/Hybridization\\_Protocol\\_For\\_cRNA\\_Targets.pdf](http://www.maizearray.org/files/Hybridization_Protocol_For_cRNA_Targets.pdf))  
49  
50 using the 46K array constructed by the Maize Oligonucleotide Array Project  
51  
52 (<http://www.maizearray.org>). Quantile normalization of the raw data was carried out  
53  
54 using the R version 2.4.1 software with a  $\log_{10}$  transformation of the data initially  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4 performed. The criteria for the inclusion of a gene in the list of differentially expressed  
5  
6 genes were a 2-fold increase or decrease and  $P < 0.01$  by two-way ANOVA analysis.

7  
8  
9 The cDNA and genomic sequences corresponding to the 70mers present on the  
10  
11 microarray were established by BLAST of the 70mers against the HTGS database and  
12  
13 the recently release of the maize genome sequence, and regularly updated. Deduced  
14  
15 amino acid sequences were annotated by BLAST against the *A. thaliana* genome at  
16  
17 NCBI and screened for known conserved domains using the CBS database.  
18  
19

### 20 21 22 23 **qRT-PCR analysis**

24  
25  
26 Total RNA (4  $\mu\text{g}$ ) was reverse transcribed using random hexamers (In vitrogen),  
27  
28 100 units of SuperScript II (In vitrogen) and 40 units of recombinant Rnasin  
29  
30 ribonuclease inhibitor (Promega) in a final volume of 20  $\mu\text{l}$ . Primer sequences were  
31  
32 designed using Primer Express 2.0 (Applied Biosystem). Subsequent qRT-PCR analysis  
33  
34 was carried out as described (Capelle et al., 2010). The calibration step of the  
35  
36 experiment checked for equivalent PCR efficiency of the different genes (to allow  
37  
38 comparison and normalization). Standard curves (log of cDNA dilution vs.  $C_t$ ) using  
39  
40 serial 10-fold dilution of cDNA were built for each pair of selected primers, a 100%  
41  
42 efficiency corresponding to a slope of -3.3 (Marino et al., 2003). Practically, only pairs  
43  
44 of primers yielding a slope of  $-3.3 \pm 0.1$  were selected. The specificity of the  
45  
46 amplification (checked by dissociation curve analysis, gel electrophoresis and  
47  
48 sequencing of the PCR product) and the use of appropriate control genes were also  
49  
50 assessed. Normalization of the results was achieved using the *glycine-rich RNA-binding*  
51  
52 *protein 2 (ZmGRP2)* gene, the expression of which was shown to be stable in the  
53  
54 different investigated maize tissues and treatments.  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## 2-DE and LC-MS/MS analyses

Protein extraction with TCA/acetone precipitation was carried out as described (Mechin et al., 2007a). Proteins were solubilized in UKS buffer (Mechin et al., 2007a) and quantified using the 2-D Quant Kit (GE Healthcare Life Sciences). Isoelectrofocusing (IEF) was carried out using 24-cm long, pH 4-7 Immobiline Dry Strips (GE Healthcare) to which 50  $\mu$ g (for protein quantification) or 250  $\mu$ g (for protein identification) of dissolved protein was added. Active rehydration and focusing were achieved as described (Mechin et al., 2007b). Strips were equilibrated as described (Görg et al., 1987) and sealed at the top of a 1-mm-thick 2-D gel (24 x 22 cm) with 1% (w/v) low-melting agarose in SDS electrophoresis buffer (25 mM Trizma base, 0.2 M glycine, and 0.1% (v/v) SDS). Separation of continuous gels (11% (p/v) acrylamide, 2.9% (w/v) piperazine diacrylamide) was performed as described (Mechin et al., 2007b). For protein quantification, a silver-staining procedure was performed as described (Mechin et al., 2003). Scanning was carried out at 300 dpi with a 16-bit greyscale pixel depth using an image scanner (Amersham Biosciences) and analyzed with Progenesis software (Nonlinear Dynamics) according to Zivy (2007). For protein identification, gels were stained with SYPRO ruby protein gel stain (Bio-Rad) and visualized using a dark reader transilluminator DR190M (blue light source 400-500 nm; Clare Chemical Research). Spots were excised for MS and collected in 96-well microplates. Excised gels were re-stained with silver nitrate as described (Mechin et al., 2003) and compared with the non-excised silver stained gels. 2-D gel spot digestion, LC-MS/MS analysis and protein identification were performed as described (Page et al., 2010; Supplemental Method).



### Lignin monomeric composition analysis

Thioacidolysis was performed according to Lapierre et al. (1986). Dried samples were placed in a screw-cap glass tube together with 10 mL of a dioxane/ethanethiol mixture (9:1, v/v) containing 0.2 M boron trifluoride etherate for 4 h at 100°C (oil bath). After extraction of the lignin-derived monomers, the analysis of their trimethylsilyl derivatives (TMS) was run on a polydimethylsiloxane capillary column (SPB1, Supelco, 30 x 0.25 m, 0.25 µm) GC/MS with an ion trap spectrometer detector (IE 70 eV, positive mode).

### FA analysis

Fatty acid methyl esters were obtained by transesterification and analyzed essentially as described (Domergue et al., 2010).

### Two-way ANOVA analysis

A  $\log_{10}$  transformation of the data was initially performed when the standard error values showed that the standard error increased in proportion to the treatment. Either non-transformed or  $\log_{10}$ -transformed values were then used for two-way ANOVA analyses using R software version 2.8.1 (<http://cran.at.r-project.org>). The two possible means models for two-way ANOVA are the additive model and the interaction model (Scheffé, 1999; Seltman, 2010). A F-test for interactions was performed to determine whether the additive model could be retained. When the interaction model was needed, the Bonferroni method was applied for pairwise comparisons. The significance was placed at a 0.05 level.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Jean-Marcel Ribaut for providing genetic material and sharing unpublished data, Brigitte Pollet for her help in lignin analysis, Françoise Sargueil for her help in FA analysis, and Jean Coursol for guiding us through the statistical analyses. This work was supported in part by the Génoplante projects “B06” and “WaterLess” (ANR-05-GPLA-034-05). L.V. was supported by a PhD Research fellowship of the Université Paris-Sud 11.

## REFERENCES

- Aarts, M.G., Keijzer, C.J., Stiekema, W.J. and Pereira, A.** (1995) Molecular characterization of the *CERI* gene of Arabidopsis involved in epicuticular wax biosynthesis and pollen fertility. *Plant Cell*, **7**, 2115-2127.
- Agarwal, M., Hao, Y., Kapoor, A., Dong, C.H., Fujii, H., Zheng, X. and Zhu, J.K.** (2006) A R2R3 type MYB transcription factor is involved in the cold regulation of *CBF* genes and in acquired freezing tolerance. *J. Biol. Chem.* **281**, 37636-37645.
- Altinkut, A. and Gozukirmizi, N.** (2003) Search for microsatellite markers associated with water-stress tolerance in wheat through bulked segregant analysis. *Mol. Biotechnol.* **23**, 97-106.
- Amigues, E., Hardacre, C., Keane, G., Migaud, M., and O'Neill, M.** (2006) Ionic liquids-media for unique phosphorus chemistry. *Chem. Commun. (Camb.)*, **1**, 72-74.

- 1  
2  
3  
4  
5 **Beisson, F., Koo, A.J., Ruuska, S., Schwender, J., Pollard, M., Thelen, J.J.,**  
6  
7 **Paddock, T., Salas, J.J., Savage, L., Milcamps, A., Mhaske, V.B., Cho, Y.**  
8  
9 **and Ohlrogge, J.B.** (2003) Arabidopsis genes involved in acyl lipid  
10  
11 metabolism. A 2003 census of the candidates, a study of the distribution of  
12  
13 expressed sequence tags in organs, and a web-based database. *Plant. Physiol.*  
14  
15 **132**, 681-697.  
16  
17  
18  
19 **Ben-Haj-Salah, H. and Tardieu, F.** (1995) Temperature affects expansion rate of  
20  
21 maize leaves without change in spatial distribution of cell length (analysis of the  
22  
23 coordination between cell division and cell expansion). *Plant. Physiol.* **109**, 861-  
24  
25 870.  
26  
27  
28 **Ben-Haj-Salah, H. and Tardieu, F.** (1997) Control of leaf expansion rate of droughted  
29  
30 maize plants under fluctuating evaporative demand. *Plant. Physiol.* **114**, 893-  
31  
32 900.  
33  
34  
35 **Besombes, S. and Mazeau, K.** (2005) The cellulose/lignin assembly assessed by  
36  
37 molecular modeling. Part 2: Seeking for evidence of organization of lignin  
38  
39 molecules at the interface with cellulose *Plant. Physiol. Biochem.* **43**, 277-286.  
40  
41  
42 **Bonaventure, G., Salas, J.J., Pollard, M.R. and Ohlrogge, J.B.** (2003) Disruption of  
43  
44 the *FATB* gene in Arabidopsis demonstrates an essential role of saturated fatty  
45  
46 acids in plant growth. *Plant Cell*, **15**, 1020-1033.  
47  
48  
49 **Boyer, J.S.** (1970) Leaf enlargement and metabolic rates in corn, soybean, and  
50  
51 sunflower at various leaf water potentials. *Plant. Physiol.* **46**, 233-235.  
52  
53  
54 **Boyer, J.S. and Westgate, M.E.** (2004) Grain yields with limited water. *J. Exp. Bot.*  
55  
56 **55**, 2385-2394.  
57  
58  
59  
60

- 1  
2  
3  
4 **Brown, A.P., Affleck, V., Fawcett, T. and Slabas, A.R.** (2006) Tandem affinity  
5 purification tagging of fatty acid biosynthetic enzymes in *Synechocystis* sp.  
6 PCC6803 and *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* **57**, 1563-1571.  
7  
8  
9  
10  
11 **Capelle, V., Remoue, C., Moreau, L., Reyss, A., Mahe, A., Massonneau, A., Falque,**  
12 **M., Charcosset, A., Thevenot, C., Rogowsky, P., Coursol, S. and Prioul, J.L.**  
13 (2010) QTLs and candidate genes for desiccation and abscisic acid content in  
14 maize kernels. *BMC Plant Biol.* **10**, 2.  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21 **Chan, D.I. and Vogel, H.J.** (2010) Current understanding of fatty acid biosynthesis and  
22 the acyl carrier protein. *Biochem. J.* **430**, 1-19.  
23  
24  
25  
26 **Chenu, K., Chapman, S.C., Tardieu, F., McLean, G., Welcker, C. and Hammer,**  
27 **G.L.** (2009) Simulating the yield impacts of organ-level quantitative trait loci  
28 associated with drought response in maize: a "gene-to-phenotype" modeling  
29 approach. *Genetics*, 183, 1507-1523.  
30  
31  
32  
33  
34  
35 **Cominelli, E., Sala, T., Calvi, D., Gusmaroli, G. and Tonelli, C.** (2008) Over-  
36 expression of the Arabidopsis *AtMYB41* gene alters cell expansion and leaf  
37 surface permeability. *Plant J.* **53**, 53-64.  
38  
39  
40  
41  
42 **Cutler, S.R., Rodriguez, P.L., Finkelstein, R.R. and Abrams, S.R.** (2010) Abscisic  
43 acid: emergence of a core signaling network. *Annu. Rev. Plant Biol.* **61**, 651-  
44 679.  
45  
46  
47  
48  
49  
50 **Domergue, F., Vishwanath, S.J., Joubes, J., Ono, J., Lee, J.A., Bourdon, M.,**  
51 **Alhattab, R., Lowe, C., Pascal, S., Lessire, R. and Rowland, O.** (2010) Three  
52 Arabidopsis fatty acyl-coenzyme A reductases, FAR1, FAR4, and FAR5,  
53 generate primary fatty alcohols associated with suberin deposition. *Plant*  
54 *Physiol.* **153**, 1539-1554.  
55  
56  
57  
58  
59  
60

- 1  
2  
3  
4  
5 **Fornale, S., Sonbol, F.M., Maes, T., Capellades, M., Puigdomenech, P., Rigau, J.**  
6  
7 **and Caparros-Ruiz, D.** (2006) Down-regulation of the maize and *Arabidopsis*  
8  
9 *thaliana* caffeic acid *O*-methyl-transferase genes by two new maize R2R3-MYB  
10  
11 transcription factors. *Plant Mol. Biol.* **62**, 809-823.  
12  
13  
14 **Fornale, S., Shi, X., Chai, C., Encina, A., Irar, S., Capellades, M., Fuguet, E.,**  
15  
16 **Torres, J.L., Rovira, P., Puigdomenech, P., Rigau, J., Grotewold, E., Gray,**  
17  
18 **J. and Caparros-Ruiz, D.** (2010) ZmMYB31 directly represses maize lignin  
19  
20 genes and redirects the phenylpropanoid metabolic flux. *Plant J.* **64**, 633-644.  
21  
22  
23 **Fuad-Hassan, A., Tardieu, F. and Turc, O.** (2008) Drought-induced changes in  
24  
25 anthesis-silking interval are related to silk expansion: a spatio-temporal growth  
26  
27 analysis in maize plants subjected to soil water deficit. *Plant Cell. Environ.* **31**,  
28  
29 1349-1360.  
30  
31  
32  
33 **Görg, A., Postel, W., Weser, J., Günther, S., Strahler, J.R., Hanash, S.M. and**  
34  
35 **Somerlot, L.** (1987) Elimination of point streaking on silver stained two-  
36  
37 dimensional gels by addition of iodoacetamide to the equilibration buffer.  
38  
39 *Electrophoresis*, **8**, 122-124.  
40  
41  
42 **Granier, C. and Tardieu, F.** (2009) Multi-scale phenotyping of leaf expansion in  
43  
44 response to environmental changes: the whole is more than the sum of parts.  
45  
46 *Plant Cell. Environ.* **32**, 1175-1184.  
47  
48  
49 **Hellyer, A., Leadlay, P.F. and Slabas, A.R.** (1992) Induction, purification and  
50  
51 characterisation of acyl-ACP thioesterase from developing seeds of oil seed rape  
52  
53 (*Brassica napus*). *Plant Mol. Bio.* **20**, 763-780.  
54  
55  
56 **Honeyman, G. and Fawcett, T.** (2000) Protein interactions of fatty acid synthase II.  
57  
58 *Biochem. Soc. Trans.* **28**, 615-616.  
59  
60

- 1  
2  
3  
4  
5 **Hu, Y., Li, W.C., Xu, Y.Q., Li, G.J., Liao, Y. and Fu, F.L.** (2009) Differential  
6  
7 expression of candidate genes for lignin biosynthesis under drought stress in  
8  
9 maize leaves. *J. Appl. Genet.* **50**, 213-223.  
10  
11 **Jones, H.G.** (1992) Drought and drought tolerance. *Cambridge University Press*, UK.  
12  
13 **Komarova, N.Y., Thor, K., Gubler, A., Meier, S., Dietrich, D., Weichert, A., Suter**  
14  
15 **Grotemeyer, M., Tegeder, M. and Rentsch, D.** (2008) AtPTR1 and AtPTR5  
16  
17 transport dipeptides in planta. *Plant Physiol.* **148**, 856-869.  
18  
19  
20  
21 **Kosma, D.K., Bourdenx, B., Bernard, A., Parsons, E.P., Lu, S., Joubes, J. and**  
22  
23 **Jenks, M.A.** (2009) The impact of water deficiency on leaf cuticle lipids of  
24  
25 *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **151**, 1918-1929.  
26  
27  
28 **Lapierre, C., Monties, B. and Rolando, C.** (1986) Preparative thioacidolysis of spruce  
29  
30 lignin: isolation and identification of main monomeric products. *Holzforschung*,  
31  
32 **40**, 47-50.  
33  
34  
35 **Lequeu, J., Fauconnier, M.L., Chammai, A., Bronner, R. and Blee, E.** (2003)  
36  
37 Formation of plant cuticle: evidence for the occurrence of the peroxygenase  
38  
39 pathway. *Plant J.* **36**, 155-164.  
40  
41  
42 **Li, P., Ponnala, L., Gandotra, N., Wang, L., Si, Y., Tausta, S.L., Kebrom, T.H.,**  
43  
44 **Provard, N., Patel, R., Myers, C.R., Reidel, E.J., Turgeon, R., Liu, P., Sun,**  
45  
46 **Q., Nelson, T. and Brutnell, T.P.** (2010) The developmental dynamics of the  
47  
48 maize leaf transcriptome. *Nat. Genet.* **42**, 1060-1067.  
49  
50  
51  
52 **Lin, K.H., Lo, H.F., Lee, S.P., George Kuo, C., Chen, J.T. and Yeh, W.L.** (2006)  
53  
54 RAPD markers for the identification of yield traits in tomatoes under heat stress  
55  
56 via bulked segregant analysis. *Hereditas*, **143**, 142-154.  
57  
58  
59  
60

- 1  
2  
3  
4 **Marino, J.H., Cook, P. and Miller, K.S.** (2003) Accurate and statistically verified  
5  
6 quantification of relative mRNA abundances using SYBR Green I and real-time  
7  
8 RT-PCR. *J. Immunol. Methods*, **283**, 291-306.
- 9  
10  
11 **Mayer, K.M. and Shanklin, J.** (2007) Identification of amino acid residues involved in  
12  
13 substrate specificity of plant acyl-ACP thioesterases using a bioinformatics-  
14  
15 guided approach. *BMC Plant Biol.* **7**, 1.
- 16  
17  
18 **Mechin, V., Consoli, L., Le Guilloux, M. and Damerval, C.** (2003) An efficient  
19  
20 solubilization buffer for plant proteins focused in immobilized pH gradients.  
21  
22 *Proteomics*, **3**, 1299-1302.
- 23  
24  
25 **Mechin, V., Damerval, C. and Zivy, M.** (2007a) Total protein extraction with TCA-  
26  
27 acetone. *Methods Mol. Biol.* **355**, 1-8.
- 28  
29  
30 **Mechin, V., Thevenot, C., Le Guilloux, M., Prioul, J.L. and Damerval, C.** (2007b)  
31  
32 Developmental analysis of maize endosperm proteome suggests a pivotal role  
33  
34 for pyruvate orthophosphate dikinase. *Plant Physiol.* **143**, 1203-1219.
- 35  
36  
37 **Michelmore, R.W., Paran, I. and Kesseli, R.V.** (1991) Identification of markers  
38  
39 linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method  
40  
41 to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations.  
42  
43 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 9828-9832.
- 44  
45  
46  
47 **Monteith, J.L.** (1977) Climate and the efficiency of crop production in Britain. *Philos.*  
48  
49 *Trans. R. Soc. London*, **281**, 277-294.
- 50  
51  
52 **Monties, B. and Fukushima, K.** (2001) Occurrence, function and biosynthesis of lignin.  
53  
54 In *Biopolymers. Lignin, humic substances and coal*, Vol 1 (Hofrichter, M.,  
55  
56 Steinbuechel, A. eds). Wiley, Weinheim, pp. 1-64.  
57  
58  
59  
60

- 1  
2  
3  
4 **Mou, Z., He, Y., Dai, Y., Liu, X. and Li, J.** (2000) Deficiency in fatty acid synthase  
5  
6 leads to premature cell death and dramatic alterations in plant morphology. *Plant*  
7  
8 *Cell*, **12**, 405-418.  
9  
10  
11 **Moura, J.C., Bonine, C.A., de Oliveira Fernandes Viana, J., Dornelas, M.C. and**  
12  
13 **Mazzafera, P.** (2010) Abiotic and biotic stresses and changes in the lignin  
14  
15 content and composition in plants. *J. Integr. Plant Biol.* **52**, 360-376.  
16  
17  
18 **Page, D., Gouble, B., Valot, B., Bouchet, J.P., Callot, C., Kretschmar, A., Causse,**  
19  
20 **M., Renard, C.M. and Faurobert, M.** (2010) Protective proteins are  
21  
22 differentially expressed in tomato genotypes differing for their tolerance to low-  
23  
24 temperature storage. *Planta*, **232**, 483-500.  
25  
26  
27  
28 **Pelloux, J., Rusterucci, C. and Mellerowicz, E.J.** (2007) New insights into pectin  
29  
30 methylesterase structure and function. *Trends Plant Sci.* **12**, 267-277.  
31  
32  
33 **Quarie, S.A., Whitford, P.N., Appleford, N.E.J., Wang, T.L., Cook, S.K. and**  
34  
35 **Henson, I.E.** (1988) A monoclonal antibody to (S)-abscissic acid: its  
36  
37 characterisation and use in a radioimmunoassay for measuring abscissic acid in  
38  
39 crude extracts of cereal and *Lupin* leaves. *Planta*, **173**: 330-339  
40  
41  
42 **Pollard, M., Beisson, F., Li, Y. and Ohlrogge, J.B.** (2008) Building lipid barriers:  
43  
44 biosynthesis of cutin and suberin. *Trends Plant Sci.* **13**, 236-246.  
45  
46  
47 **Raffaele, S., Mongrand, S., Gamas, P., Niebel, A. and Ott, T.** (2007) Genome-wide  
48  
49 annotation of remorins, a plant-specific protein family: evolutionary and  
50  
51 functional perspectives. *Plant Physiol.* **145**, 593-600.  
52  
53  
54 **Raffaele, S., Vaillau, F., Leger, A., Joubes, J., Miersch, O., Huard, C., Blee, E.,**  
55  
56 **Mongrand, S., Domergue, F. and Roby, D.** (2008) A MYB transcription factor  
57  
58  
59  
60



1  
2  
3  
4 regulates very-long-chain fatty acid biosynthesis for activation of the  
5  
6 hypersensitive cell death response in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **20**, 752-767.  
7  
8

9 **Ray, S., Dansana, P.K., Giri, J., Deveshwar, P., Arora, R., Agarwal, P., Khurana,**  
10 **J.P., Kapoor, S. and Tyagi, A.K.** (2010) Modulation of transcription factor and  
11 metabolic pathway genes in response to water-deficit stress in rice. *Funct.*  
12 *Integr. Genomics*, **11**, 157-178.  
13  
14  
15  
16  
17

18 **Reymond, M., Muller, B., Leonardi, A., Charcosset, A. and Tardieu, F.** (2003)  
19 Combining quantitative trait loci analysis and an ecophysiological model to  
20 analyze the genetic variability of the responses of maize leaf growth to  
21 temperature and water deficit. *Plant Physiol.* **131**, 664-675.  
22  
23  
24  
25  
26  
27

28 **Ribaut, J.M., Hoisington, D., Deutsch, J., Jiang, C. and Gaonzalez-de-Leon, D.**  
29 (1996) Identification of quantitative trait loci under drought conditions in  
30 tropical maize. 1. Flowering parameters and the anthesis silking interval. *Theor.*  
31 *Appl. Genet.* **92**, 905-914.  
32  
33  
34  
35  
36

37 **Ribaut, J.M., Betran, J., Monneveux, P. and Setter, T.** (2009) Drought tolerance in  
38 maize. In *Handbook of maize: its biology* (Bennetzen, J.L. and Hake, S.C., eds).  
39 New York: Springer, pp. 311–344.  
40  
41  
42  
43  
44

45 **Sadok, W., Naudin, P., Boussuge, B., Muller, B., Welcker, C. and Tardieu, F.**  
46 (2007) Leaf growth rate per unit thermal time follows QTL-dependent daily  
47 patterns in hundreds of maize lines under naturally fluctuating conditions. *Plant*  
48 *Cell Environ.* **30**, 135-146.  
49  
50  
51  
52  
53

54 **Salas, J.J. and Ohlrogge, J.B.** (2002) Characterization of substrate specificity of plant  
55 FatA and FatB acyl-ACP thioesterases. *Arch. Biochem. Biophys.* **403**, 25-34.  
56  
57  
58  
59  
60

- 1  
2  
3  
4 **Salvi, S. and Tuberosa, R.** (2005) To clone or not to clone plant QTLs: present and  
5  
6 future challenges. *Trends Plant Sci.* **10**, 297-304.  
7  
8
- 9 **Sawkins, M.C., Farmer, A.D., Hoisington, D., Sullivan, J., Tolopko, A., Jiang, Z.**  
10  
11 **and Ribaut, J.M.** (2004) Comparative map and trait viewer (CMTV): an  
12  
13 integrated bioinformatic tool to construct consensus maps and compare QTL and  
14  
15 functional genomics data across genomes and experiments. *Plant Mol. Biol.* **56**,  
16  
17 465-480.  
18  
19
- 20  
21 **Scheffé, H.** (1999) The analysis of variance. *Wiley, John & Sons* (New-York).  
22  
23
- 24 **Seltman, H.J.** (2010) Experimental design and analysis.  
25  
26 <http://www.stat.cmu.edu/~hseltman/309/Book/Book.pdf>  
27
- 28 **Setter, T.L., Yan, J., Warburton, M., Ribaut, J.M., Xu, Y., Sawkins, M., Buckler,**  
29  
30 **E.S., Zhang, Z. and Gore, M.A.** (2011) Genetic association mapping identifies  
31  
32 single nucleotide polymorphisms in genes that affect abscisic acid levels in  
33  
34 maize floral tissues during drought. *J. Exp. Bot.* **62**, 701-716.  
35  
36
- 37 **Showalter, A.M., Keppler, B., Lichtenberg, J., Gu, D. and Welch, L.R.** (2010) A  
38  
39 bioinformatics approach to the identification, classification, and analysis of  
40  
41 hydroxyproline-rich glycoproteins. *Plant Physiol.* **153**, 485-513.  
42  
43
- 44 **Smeekens, S., Ma, J., Hanson, J. and Rolland, F.** (2010) Sugar signals and molecular  
45  
46 networks controlling plant growth. *Curr. Opin. Plant Biol.* **13**, 274-279.  
47  
48
- 49 **Staswick, P.E.** (2008) JAZing up jasmonate signaling. *Trends Plant Sci.* **13**, 66-71.  
50  
51
- 52 **Sugimoto-Shirasu, K. and Roberts, K.** (2003) "Big it up": endoreduplication and cell-  
53  
54 size control in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**, 544-553.  
55  
56  
57  
58  
59  
60

- 1  
2  
3  
4 **Tardieu, F. and Simonneau, T.** (1998) Variability among species of stomatal control  
5  
6 under fluctuating soil water status and evaporative demand modelling isohydric  
7  
8 and anisohydric behaviours. *J. Exp. Bot.* **49**, 149-432.
- 9  
10  
11 **Tardieu, F., Granier, C. and Muller, B.** (2011) Water deficit and growth. Co-  
12  
13 ordinating processes without an orchestrator? *Curr. Opin. Plant Biol.*  
14  
15 doi:10.1016/j.pbi.2011.02.002.
- 16  
17  
18 **Tardieu, F., Reymond, M., Hamard, P., Granier, C. and Muller, B.** (2000) Spatial  
19  
20 distributions of expansion rate, cell division rate and cell size in maize leaves: a  
21  
22 synthesis of the effects of soil water status, evaporative demand and temperature.  
23  
24 *J. Exp. Bot.* **51**, 1505-1514.
- 25  
26  
27  
28 **Vincent, D., Lapierre, C., Pollet, B., Cornic, G., Negroni, L. and Zivy, M.** (2005)  
29  
30 Water deficits affect caffeate *O*-methyltransferase, lignification, and related  
31  
32 enzymes in maize leaves. A proteomic investigation. *Plant Physiol.* **137**, 949-  
33  
34 960.
- 35  
36  
37 **Voigt, J., Frank, R. and Wostemeyer, J.** (2009) The chaotrope-soluble glycoprotein  
38  
39 GP1 is a constituent of the insoluble glycoprotein framework of the  
40  
41 *Chlamydomonas* cell wall. *FEMS Microbiol. Lett.* **291**, 209-215.
- 42  
43  
44 **Welcker, C., Boussuge, B., Bencivenni, C., Ribaut, J.M. and Tardieu, F.** (2007) Are  
45  
46 source and sink strengths genetically linked in maize plants subjected to water  
47  
48 deficit? A QTL study of the responses of leaf growth and of Anthesis-Silking  
49  
50 Interval to water deficit. *J. Exp. Bot.* **58**, 339-349.
- 51  
52  
53  
54 **Westgate, M.E. and Boyer, J.S.** (1986) Reproduction at low silk and pollen water  
55  
56 potential in maize. *Crop. Science*, **26**, 951-956.
- 57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4 **Yang, L., Wang, C., Guo, W., Li, X., Lu, M. and Yu, C.** (2006) Differential  
5  
6 expression of cell wall related genes in the elongation zone of rice roots under  
7  
8 water deficit. *Russ. J. Plant Physiol.* **53**, 390-395.

9  
10  
11 **Yoshimura, K., Masuda, A., Kuwano, M., Yokota, A. and Akashi, K.** (2008)  
12  
13 Programmed proteome response for drought avoidance/tolerance in the root of a  
14  
15 C(3) xerophyte (wild watermelon) under water deficits. *Plant Cell Physiol.* **49**,  
16  
17 226-241.

18  
19  
20 **Zhang, J. and Davies, W.J.** (1990) Changes in the concentration of ABA in xylem sap  
21  
22 as a function of changing soil water status can account for changes in leaf  
23  
24 conductance and growth. *Plant Cell Environ.* **13**, 277-285.

25  
26  
27 **Zhao, Q. and Dixon, R.A.** (2011) Transcriptional networks for lignin biosynthesis:  
28  
29 more complex than we thought? *Trends Plant Sci.*  
30  
31 doi:10.1016/j.tplants.2010.12.005.

32  
33  
34 **Zivy, M.** (2007) Quantitative analysis of 2D gels. *Methods Mol. Biol.* **355**, 175-194.

35  
36  
37 **Zivy, M. and de Vienne, D.** (2000) Proteomics: a link between genomics, genetics and  
38  
39 physiology. *Plant Mol. Biol.* **44**, 575-580.

#### 40 41 42 43 44 **SUPPORTING INFORMATION**

45  
46 **Figure S1.** Response curves of LER to soil water deficit in two contrasted RILs.

47  
48 **Figure S3.** Phenotypic characterization of the two bulks of RILs.

49  
50  
51 **Figure S2.** Expression profile of the 8 candidate genes along the maize developmental  
52  
53 leaf gradient.

54  
55  
56 **Table S1.** Transcripts that showed significant changes in the bulk F compared with the  
57  
58 bulk U.

1  
2  
3  
4 **Table S2.** Mapping of candidate genes and genes encoding candidate proteins.

5  
6  
7 **Table S3.** Primers used for mapping and qRT-PCR experiment.

8  
9 **Table S4.** Proteins that showed significant changes in the bulk F compared with the  
10  
11 bulk U.

12  
13 **Supplementary Method and Supplementary Legends.**

## 14 15 16 17 18 **FIGURE LEGENDS**

19  
20 **Figure 1.** Allelic frequency and phenotypic distribution for  $LER_{\text{deficit}}$  and  $ASI_{\text{deficit}}$   
21  
22 between the two bulks of RILs. (a) Allelic frequency along chromosome 2 for the two  
23  
24 bulks of RILs and QTL location at bin 2.08 for traits related to  $LER_{\text{deficit}}$  and  $ASI_{\text{deficit}}$ .  
25  
26 Bulk F: bulk of 18 RILs having the favourable allele brought by P1 for both  $LER_{\text{deficit}}$   
27  
28 and  $ASI_{\text{deficit}}$ ; bulk U: bulk of 18 RILs having the unfavourable allele brought by P2 for  
29  
30 both  $LER_{\text{deficit}}$  and  $ASI_{\text{deficit}}$ ; black filled circles: alleles brought by P1; white filled  
31  
32 circles: alleles brought by P2. (b-c) Phenotypic distribution for  $LER_{\text{deficit}}$  (b) and  
33  
34  $ASI_{\text{deficit}}$  (c) carried out in a phenotyping platform and in moderated water-stressed  
35  
36 field, respectively, within the two bulks of RILs (Welcker et al., 2007). Difference for  
37  
38  $LER_{\text{deficit}}$  and  $ASI_{\text{deficit}}$  were significant ( $P < 0.05$ ).  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46

47  
48 **Figure 2.** Expression profile of the seven candidate genes identified by transcriptomic  
49  
50 and mapping analyses. Quantitative RT-PCR was performed on the RNA samples  
51  
52 (segment 4-6 cm of the 6th leaves) from 4 different RILs that had been used for the  
53  
54 initial microarray analysis. Transcript levels of individual genes in each condition were  
55  
56 normalized against the housekeeping *ZmGPR2* gene, whose expression is not  
57  
58 responsive to water deficit (Table S3), and shown relative to the lowest value, that of  
59  
60

1  
2  
3  
4 the *ZmJAZ2* gene in the 6th leaf of bulk U in well-watered condition, which was set at  
5  
6  
7 1. Values represent means of biological quadruplicates  $\pm$  SE. When both genotype and  
8  
9 treatment effects were significant ( $P < 0.05$ ), a, b, a+ $\alpha$ , b+ $\alpha$  are indicated. Exp. protein:  
10  
11 expressed protein.  
12  
13

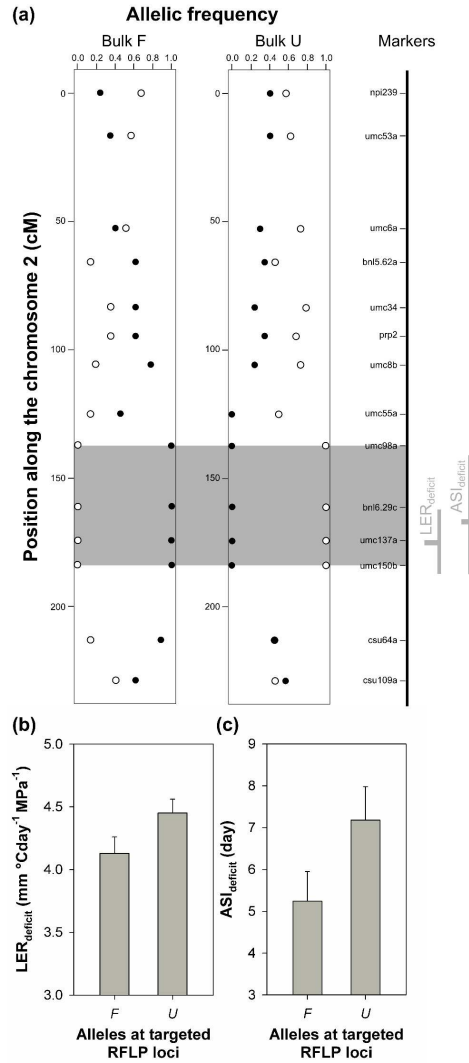
14  
15  
16 **Figure 3.** Transcript levels of *ZmMYB31* target genes and monolignol content in the  
17  
18 two bulks of RILs. (a) The monolignol biosynthetic pathway is based on that published  
19  
20 previously (Zhao and Dixon, 2011). Genes encoding the enzymes in bold exhibited  
21  
22 differential expression between the two bulks of RILs. (b) The transcript profile of  
23  
24 *ZmCAD9* was obtained by microarray analysis of the GZ (segment 4-6 cm) from the 6th  
25  
26 leaves of bulks F and U under well-watered and water deficit conditions. Values  
27  
28 represent means of biological duplicates  $\pm$  SE. (c) Expression profile of *ZmCOMT* was  
29  
30 determined by qRT-PCR on the RNA samples from 4 different RILs that had been used  
31  
32 for the initial microarray analysis. Transcript levels were normalized against the  
33  
34 housekeeping *ZmGPR2* gene, and shown relative to the lowest value, that of the  
35  
36 *ZmJAZ2* gene in the 6th leaf of bulk U in well-watered condition (Figure 2). Values  
37  
38 represent means of biological quadruplicates  $\pm$  SE. (d-e) Lignin unit abundance by  
39  
40 thioacidolysis in the GZ (segment 6-8 cm; D) and the DZ (segment 18-20 cm; E) of the  
41  
42 6th leaves from plants of bulks F and U under well-watered and water deficit  
43  
44 conditions. Values represent means of biological triplicates  $\pm$  SE. When both genotype  
45  
46 and treatment effects were significant ( $P < 0.05$ ), a, b, a+ $\alpha$ , b+ $\alpha$  are indicated.  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56

57 **Figure 4.** Quantitative protein expression of the three candidate proteins in the two  
58  
59 bulks of RILs. (a-b) 2-DE of total proteins extracted from the GZ (segment 2-4 cm) of  
60

1  
2  
3  
4 the 6th leaves from RILs grown under well-watered and water deficit conditions and  
5  
6 grouped according to the two bulks F and U. The proteins showing significant changes  
7  
8 between bulks F and U ( $P < 0.01$ ) are indicated with arrows in panels a and b, with  
9  
10 panel b being an enlarge section of the images of bulks F and U in water deficit  
11  
12 condition. (c) Protein quantification of candidate proteins shown in panels a and b.  
13  
14  
15  
16 Values represent means of biological triplicates  $\pm$  SE. When two samples show different  
17  
18 letters above the bars, the difference between them is significant ( $P < 0.05$ ).  
19  
20  
21  
22

23 **Figure 5.** Transcript levels of *ZmFatA* and *ZmENR1* genes and FA composition in the  
24  
25 two bulks of RILs. (a) A schematic overview of the FA metabolism. FabG, 3-ketoacyl-  
26  
27 ACP reductase; FabZ, 3-hydroxyacyl-ACP dehydratase; KAS, 3-ketolacyl-ACP  
28  
29 synthase; MGDG, monogalactosyldiacylglycerol; PC, phosphatidylcholine. (b)  
30  
31 Quantitative RT-PCR was performed on total mRNA from the GZ (segment 4-6 cm) of  
32  
33 the 6th leaves from plants of bulks F and U under well-watered and water deficit  
34  
35 conditions. Transcript levels were normalized against the housekeeping *ZmGPR2* gene,  
36  
37 and shown relative to *ZmFatA* transcript levels for bulk U in well-watered condition.  
38  
39 Values represent means of biological quadruplicates  $\pm$  SE. (c-d) FA composition in the  
40  
41 GZ (segment 6-8 cm; c) and the DZ (segment 18-20 cm; d) of the 6th leaves from plants  
42  
43 of bulks F and U under well-watered and water deficit conditions. Values represent  
44  
45 means of biological triplicates  $\pm$  SE. When both genotype and treatment effects were  
46  
47 significant, a, b, a+ $\alpha$ , b+ $\alpha$  are indicated ( $P < 0.05$ ).  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

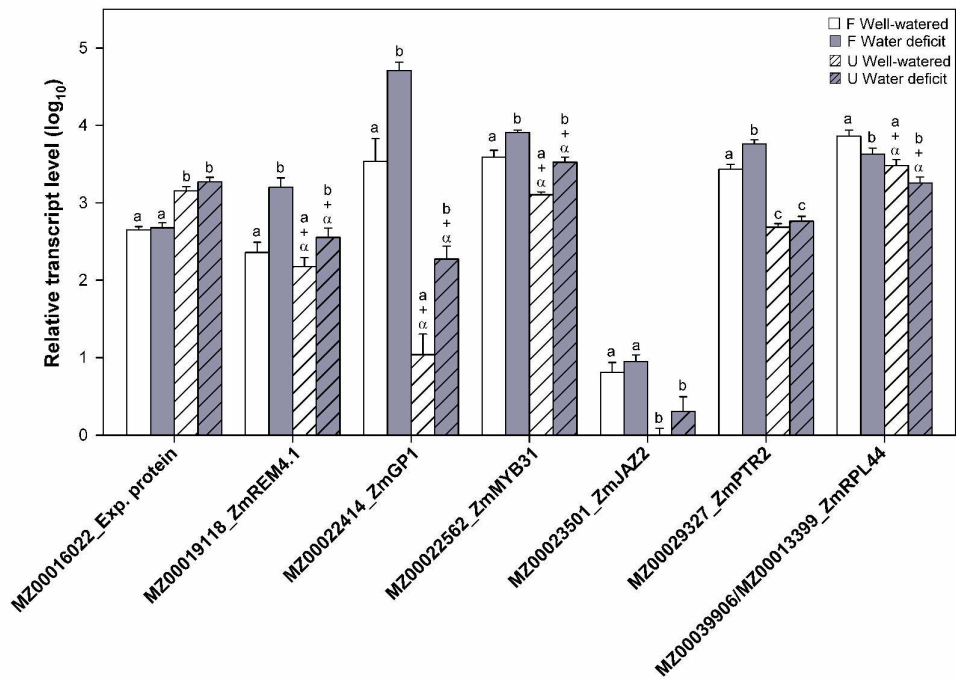
Figure 1





1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Figure 2



846x607mm (150 x 150 DPI)

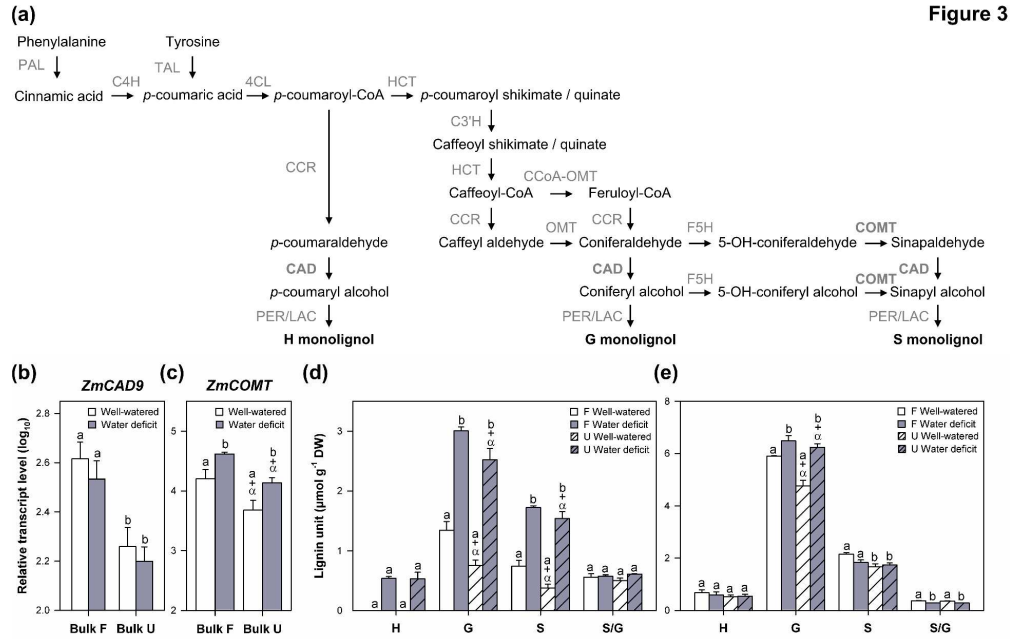


Figure 3

Figure 4

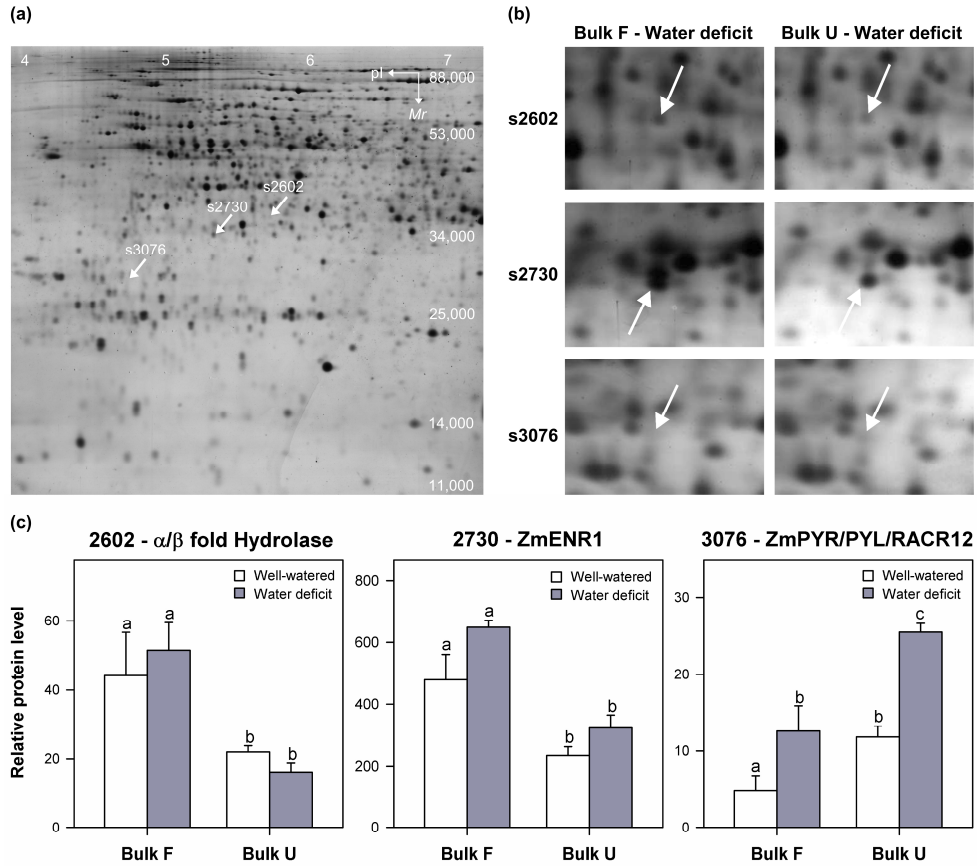
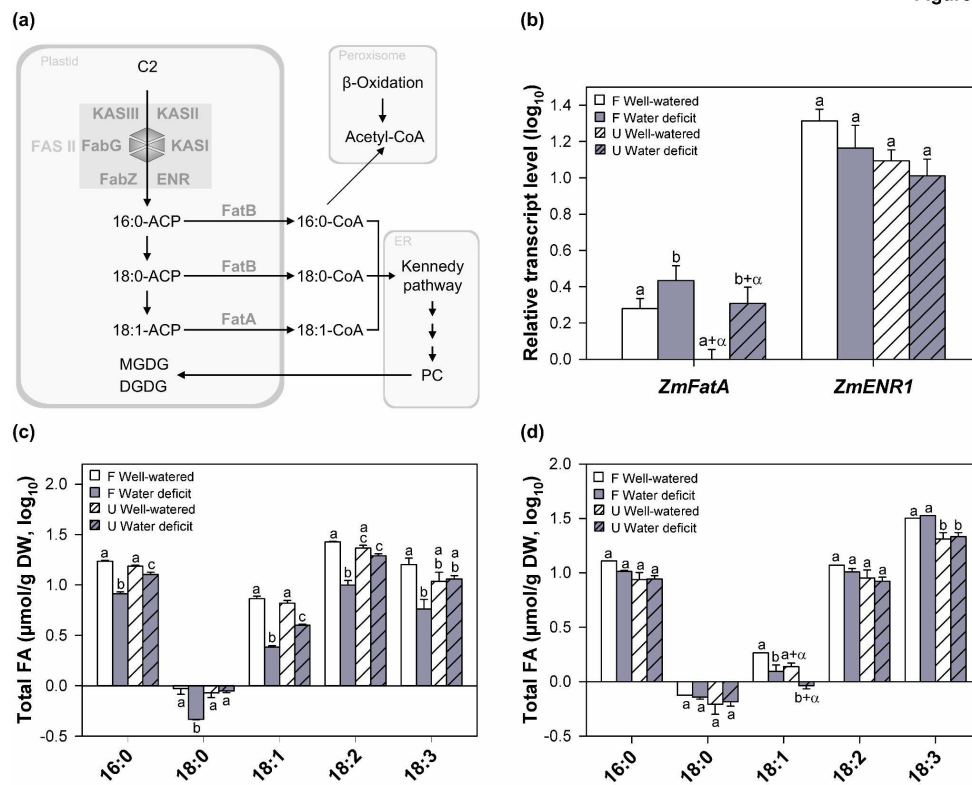


Figure 5



**Table S1.** Transcripts that showed significant changes in the bulk F compared with the bulk U.

Oligo ID <sup>a</sup>	P value <sup>b</sup>			Ratio bulk F / bulk U <sup>c</sup>		Maize gene model <sup>d</sup>	Annotation <sup>e</sup>	Class <sup>e</sup>
	Genotype	Treatment	Genotype x Treatment	Control	Deficit			
MZ00000779	0.0089	0.7331	0.7714	0.2968	0.2714	GRMZM2G510387	Expressed protein	Unknown
MZ00001209	0.0036	0.2715	0.1739	-0.4444	-0.2556	GRMZM2G089688	Expressed protein	Unknown
MZ00003845	0.0031	0.0030	0.4279	0.4495	0.3404	GRMZM2G067421	Heavy metal-associated domain containing protein	Transport
MZ00003939	0.0053	0.0158	0.1482	-0.4562	-0.2323	GRMZM2G377539	ABC1 kinase 5 (ABC1K5)	Transport
MZ00004221	0.0011	0.1574	0.8019	0.3562	0.3343	AC234163.1_FGT002	Cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD9)	Cell wall
MZ00005519	0.0100	0.0052	0.4574	-0.3860	-0.2691	GRMZM2G066578	Fatty acid hydrolase/decarbonylase (CER1)	Wax
MZ00005638	0.0048	0.7080	0.5272	-0.5693	-0.7276	GRMZM2G409722	Expressed protein	Unknown
MZ00012856	0.0058	0.1640	0.2657	0.3438	0.5619	GRMZM2G406155	Expressed protein	Unknown
MZ00013399	0.0079	0.5266	0.2065	-0.6567	-0.3488	GRMZM2G125527	60S ribosomal protein L44 (RPL44)	Protein synthesis
MZ00013697	0.0039	0.1740	0.7044	0.4165	0.3634	GRMZM2G083841	Phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC)	Photosynthesis
MZ00014222	0.0062	0.0189	0.9519	0.4098	0.4199	GRMZM5G851698/GRMZM2G054136	40S ribosomal protein S6 (RPS6)	Protein synthesis
MZ00014255	0.0067	0.3808	0.3043	0.3785	0.2612	GRMZM2G019200	Calmodulin binding/purine nucleotide binding (DRL1)	Transcriptional regulation
MZ00014810	0.0028	0.0026	0.0023	0.0840	-1.8162	GRMZM2G165917	Eukaryotic translation initiation factor 5 (eIF5)	Protein synthesis
MZ00015446	0.0074	0.2196	0.8289	-0.2936	-0.3219	GRMZM2G079257	Signal recognition particle 54 kDa subunit	Transport
MZ00016022	0.0012	0.7342	0.7688	-0.3679	-0.3406	GRMZM2G056632	Expressed protein	Unknown
MZ00016676	0.0046	0.2662	0.0092	-0.5969	-0.1029	GRMZM5G831993	CCCH-type zinc fingerfamily protein with RNA-binding domain	RNA binding
MZ00017371	0.0096	0.8512	0.5790	-0.3885	-0.2994	GRMZM2G073401	CPN10 chaperonin	Protein folding
MZ00018619	0.0080	0.3961	0.2635	-0.4609	-0.2677	GRMZM2G145895	Thiol-disulfide isomerase and thioredoxins	Stress
MZ00019118	0.0050	0.0049	0.9352	0.5252	0.5417	GRMZM2G099239	Group 4 remorin (REM4.1)	Stress
MZ00020025	0.0016	0.0535	0.0572	-0.6830	-0.3304	GRMZM2G043484	Enhancer of zeste-like protein 3 (Mez3)	Transcriptional repressor
MZ00020407	0.0006	0.0806	0.0117	0.7136	0.3417	GRMZM2G125768	Plasma-membrane choline transporter family protein	Lipid
MZ00020514	0.0010	0.2024	0.5690	0.2926	0.3384	GRMZM2G007683	Sulfiredoxin-1	Stress
MZ00022057	0.0044	0.5404	0.8158	0.4097	0.3837	GRMZM2G307088	Signal sequence processing protein (SEC11)	Transport
MZ00022414	0.0015	0.0090	0.4094	0.5679	0.4467	GRMZM2G152189	Vegetative cell wall glycoprotein 1 (GP1)	Cell wall
MZ00022562	0.0055	0.0968	0.9573	0.3254	0.3186	GRMZM2G050305	MYB-related protein Hv1 (MYB31)	Cell wall, transcriptional repressor
MZ00023501	0.0087	0.5488	0.4252	0.4551	0.3128	GRMZM2G101769	PnFL-2 protein (JAZ2)	Stress, transcriptional repressor
MZ00024066	0.0053	0.4832	0.7309	0.9237	1.0560	GRMZM2G058070/GRMZM2G021617	PsbQ OEC16-like Tat ITP	Photosynthesis
MZ00025074	0.0086	0.0977	0.1503	0.4820	0.2526	GRMZM2G160324	T-snares/myosin heavy-chain-related protein	Cell organization
MZ00025682	0.0045	0.4690	0.0147	-0.5608	-0.1149	GRMZM2G150496	Inositol pentakisphosphate 2-kinase (ATIPK)	Stress
MZ00026099	0.0074	0.3341	0.3863	-0.3990	-0.2697	GRMZM2G153274	Glycerophosphoryl diester phosphodiesterase precursor	Lipid
MZ00028383	0.0079	0.9597	0.6802	-0.4004	-0.4622	GRMZM2G167174	Expressed protein	Unknown
MZ00028663	0.0028	0.1183	0.4375	-0.5570	-0.7257	GRMZM2G445057	Ribonuclease III family protein	RNA processing
MZ00028770	0.0003	0.0522	0.8861	-0.3008	-0.3087	GRMZM2G011491	Expressed protein	Unknown
MZ00029327	0.0004	0.0410	0.4628	0.3325	0.3855	AC205608_FGT004	Peptide transporter (PTR2)	Transport
MZ00029637	0.0079	0.1472	0.5199	0.6680	0.8410	GRMZM2G001973	Group 5 Remorin (REM5.1)	Unknown
MZ00029969	0.0016	0.7337	0.1890	-0.9438	-0.6929	GRMZM2G020255	Expressed protein	Unknown
MZ00031292	0.0049	0.0251	0.8573	0.5987	0.5593	GRMZM2G083759	Signal transducer (ENP)	Light
MZ00032379	0.0046	0.8818	0.7089	-0.4484	-0.3897	GRMZM2G150806	Protein kinase APK1A	Protein post-translational modification
MZ00034851	0.0087	0.0569	0.7450	-0.4930	-0.4261	GRMZM5G834496	Photosystem II reaction center protein J (PSII-J)	Photosynthesis
MZ00034874	0.0083	0.2027	0.9856	0.4030	0.4062	GRMZM5G844074	30S ribosomal protein S15 (RPS15)	Protein synthesis
MZ00035042	0.0072	0.1872	0.1527	0.7658	0.4208	GRMZM2G437100	Heat shock protein 17 (HSP17)	Stress
MZ00035134	0.0068	0.6819	0.9812	-0.5140	-0.5090	GRMZM2G110574	Heat shock protein 90 (HSP90)	Stress
MZ00035514	0.0010	0.0862	0.3718	0.3397	0.2689	GRMZM2G108228	Tubby-like protein 1 (TLP1)	Stress, transcriptional activity
MZ00035535	0.0012	0.0782	0.7624	0.3135	0.3390	GRMZM2G417715	Ubiquinol(cytochrome C chaperone family protein	Stress
MZ00035817	0.0025	0.0072	0.0935	0.5637	0.2886	GRMZM2G175499	Pectinesterase PPE8B	Cell wall
MZ00036220	0.0016	0.0007	0.4147	-0.3751	-0.2954	GRMZM2G126594	60S ribosomal protein L17 (RPL17)	Protein synthesis
MZ00036871	0.0017	0.0019	0.0437	0.4644	0.2046	GRMZM2G121573	Leucine-rich repeat (LRR) transmembrane protein kinase 1-like protein	Signalling
MZ00038210	0.0010	0.0191	0.2683	0.3708	0.2753	AF546188.1_FGT005	Zein-alpha A20 protein	Storage protein
MZ00038567	0.0054	0.0013	0.4355	-0.2565	-0.3527	GRMZM2G082087	12-oxophytodienoate reductase 3	Stress
MZ00038605	0.0003	0.0363	0.5554	0.3163	0.3526	GRMZM2G112165	Heat shock protein 90 (HSP90)	Stress
MZ00039167	0.0048	0.0001	0.0055	0.6031	0.0124	GRMZM2G062531	C-4 methylsterol oxidase (SMO1-1)	Lipid
MZ00039906	0.0006	0.0095	0.1334	-0.5873	-0.3963	GRMZM2G125527	60S ribosomal protein L44 (RPL44)	Protein synthesis
MZ00040590	0.0051	0.2319	0.8311	0.3694	0.4010	GRMZM2G058070/GRMZM2G021617	PsbQ OEC16-like Tat ITP	Photosynthesis
MZ00040858	0.0054	0.0056	0.0770	0.5515	0.2182	GRMZM2G100212/GRMZM2G335593	Verprolin	Stress
MZ00040978	0.0037	0.0593	0.5351	0.5616	0.7029	GRMZM5G890561	60S ribosomal protein L33 (RPL33)	Protein synthesis
MZ00041064	0.0005	0.0129	0.2944	-0.7383	-0.5830	GRMZM2G047971	60S ribosomal protein L32 (RPL32)	Protein synthesis
MZ00041322	0.0071	0.7242	0.7041	0.3035	0.3566	GRMZM2G001084	ClpC1/C2	Protein degradation
MZ00041873	0.0026	0.4165	0.7225	-0.2936	-0.3289	GRMZM2G112366	Signal peptidase complex subunit 1	Transport
MZ00041903	0.0020	0.9654	0.8710	-0.3884	-0.3701	GRMZM2G142013	Expressed protein	Unknown
MZ00042111	0.0075	0.1576	0.1768	-0.5338	-1.0543	GRMZM2G125345	Expressed protein	Unknown
MZ00043049	0.0083	0.9277	0.6177	-0.4302	-0.3440	GRMZM2G354604	GTP-binding nuclear protein Ran-A1	Signalling
MZ00043150	0.0028	0.7907	0.2983	-0.2911	-0.4209	GRMZM2G435338	60S ribosomal protein L11 (RPL11D)	Protein synthesis
MZ00043169	0.0002	0.0018	0.2858	-0.2728	-0.3334	GRMZM2G130987	Sec61 alpha subunit isoform 2 protein	Lipid
MZ00043996	0.0073	0.0008	0.8283	0.2902	0.3182	GRMZM2G029087	Bax inhibitor 1	Stress, lipid
MZ00044157	0.0072	0.2769	0.7378	0.7126	0.6372	GRMZM2G162284	HMG1/2-like protein	Transcription regulation
MZ00044578	0.0098	0.9902	0.0774	-0.2747	-0.7232	GRMZM2G067919	Globulin-1 S allele Precursor (GLB1-S)	Storage protein
MZ00046598	0.0017	0.0892	0.0160	-0.1685	-0.4502	GRMZM2G358537	Expressed protein	Unknown
MZ00047591	0.0016	0.2305	0.4295	-0.3689	-0.2924	GRMZM2G067915	Carboxylesterase (CXE18)	Lipid, stress
MZ00052218	0.0017	0.0130	0.0021	-0.0318	-0.6276	GRMZM2G019806	basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein	Transcription regulation
MZ00055418	0.0004	0.7273	0.9847	0.3450	0.3463	GRMZM2G008095	Protein SFT2	Transport
MZ00056493	0.0013	0.0093	0.1816	-0.4196	-0.2788	GRMZM5G890561	60S ribosomal protein L35a (RPL35aC)	Protein synthesis

<sup>a</sup>Identification number of the corresponding oligonucleotide deposited on the microarray.

<sup>b</sup>Transcripts that showed significant ( $P < 0.01$ ) changes in the bulk F compared with the bulk U.

<sup>c</sup>Expression values reported relative to samples from the bulk F in the same treatment condition ( $\log_{10}$ ).

<sup>d</sup>Maize genome release 5a.59 of November 2010 (<http://www.maizesequence.org>).

<sup>e</sup>Manually improved annotations from Swissprot, Genebank, trembl and InterPro databases.

**Table S2.** Mapping of candidate genes and genes encoding candidate proteins.

Analyses	Spot no. / Oligo ID.	Annotation	Map <sup>a</sup>	Bin	MM coord. <sup>b</sup>	Proj coord. <sup>c</sup>	Flanking Markers <sup>d</sup>	Maize gene model <sup>e</sup>	QTL <sup>f</sup>
Proteomics	s2602	<i>α/β fold Hydrolase</i>	Physical	2.06	383.4	383.4	umc1749	GRMZM2G001750	No
	s3076	<i>ZmPYR/PYL/RAC12</i>	Physical	1.05	431.2-432.4	431.2-432.4	myc7-umc2230	GRMZM2G134731	No
	s2730	<i>ZmENRI</i>	REFMAP050110	4.08	138.7	277.4	phi026-umc1511	GRMZM2G070422	No
	None	<i>ZmFatA</i>	LHRF_Gnp2004	2.07	286.0	430.9	umc5a-bnlg1633	GRMZM2G102878	Yes
Transcriptomics	MZ00016022	<i>Expressed protein</i>	Physical	2.07	453.8	453.8	phi251315	GRMZM2G056632	Yes
	MZ00019118	<i>ZmREM4.1</i>	Physical	2.08	505.1	505.1	bnlg1767	GRMZM2G099239	Yes
	MZ00022414	<i>ZmGP1</i>	Physical	2.08	509.2-515.8	509.2-515.8	bnlg1233-AI668346	GRMZM2G152189	Yes
	MZ00022562	<i>ZmMYB31</i>	Physical	2.07	435.8	435.8	umc2205	GRMZM2G050305	Yes
	MZ00023501	<i>ZmJAZ2</i>	Physical	2.08	522.4-523.5	522.4-523.5	umc1947-umc1604	GRMZM2G101769	Yes
	MZ00029327	<i>ZmPTR2</i>	Physical	2.08	520.5-522.4	520.5-522.4	phi435417-umc1947	AC205608_FGT004	Yes
	MZ00039906	<i>ZmRPL44</i>	Physical	2.07	476.7	476.7	umc1536	GRMZM2G125527	Yes

<sup>a</sup>The genes differentially expressed between bulk F and bulk U were mapped by BLAST analysis on MaizeSequence.org, except the *ZmENRI* gene, which was mapped on the IBM population (REFMAP050110 map) derived from B73xMo17 crossing, and the *ZmFatA* gene which was mapped on the LHRF\_Gnp2004 population derived from F2xF252 crossing because of no polymorphism between B73 and Mo17.

<sup>b</sup>Map coordinate computed with MapMaker using 'RI self Haldane' options or found on the HTGS database.

<sup>c</sup>Map coordinate on IBM2 2008 Neighbors obtained by homothetic projection with BioMercator (Arcade et al., 2004).

<sup>d</sup>Proximal and distal markers.

<sup>e</sup>Maize genome release 5.a.59 of November 2010 (<http://www.maizesequence.org>).

<sup>f</sup>The QTL region delimited by the 4 markers umc92a, bnl8.29c, umr137a and umc150b covering 47 cM.

**Table S3.** Primers used for mapping and qRT-PCR experiment.

Spot no. / Oligo ID.	Maize gene model	Gene name	Used for	Primer name	Amplicon size (pb)	Sequence (5' to 3')
None	GRMZM2G080603	<i>ZmGRP2</i>	qRT-PCR	Zea-F Zea-R	94	CACAACGCCTTCAGCACCTA AAGGTGACGAAGCCGAAGC
None	GRMZM2G102878	<i>ZmFatA</i>	mapping	ZmFatA-F-m ZmFatA-R-m	807	CCATTACAAATCAATGTTGTTG AGTTGCAAATTATCATTGTCC
			qRT-PCR	ZmFatA-F-q ZmFatA-R-q	74	GGTTCATGTCCAGATCAGCTC CGAATCTTTTCAGATCCTGCAC
s2730	GRMZM2G070422	<i>ZmENRI</i>	mapping	ENR-F-m ENR-R-m	247	ATCTTCCCTTCCCTCTCTGC TCGCCCTCATCACTATCACTCA
			qRT-PCR	ENR-F-q ENR-R-q	133	TTGATGAATCACGGAAGCTG ATGCCCTGCATATCTTTTG
MZ00016022	GRMZM2G056632	<i>Expressed protein</i>	qRT-PCR	Expprot-F Expprot-R	82	CCCATGTCCCCCATACTAGA CGGAAACGGCGTACAAATCT
MZ00019118	GRMZM2G099239	<i>ZmREM4.1</i>	qRT-PCR	ZmREM-F ZmREM-R	81	GCGTTCCACACAGCTAAGCA GCAGTTCAGTTGCATCGTTCAC
MZ00022414	GRMZM2G152189	<i>ZmGP1</i>	qRT-PCR	ENOD-F ENOD-R	73	TCTCAAGCCCATAGGTGTTGTAGA GGACAAGGGAACGCATTGTAC
MZ00022562	GRMZM2G050305	<i>ZmMYB31</i>	qRT-PCR	ZmMYB-F ZmMYB-R	65	CGCGCTTCTACCCTCTCTGT AGGTGTGGCAAAACAAAACG
MZ00023501	GRMZM2G101769	<i>ZmJAZ2</i>	qRT-PCR	Smarcc-F Smarcc-R	91	ACACCCCGACCATTAAATTA TCGCTCGAAATGTTTTATTTATCCT
MZ00029327	AC205608_FGT004	<i>ZmPTR2</i>	qRT-PCR	PT-F PT-R	78	CACCAGCATCCTTATACTCATTGA CCGGCACAAGCACTTTGTT
MZ00039906	GRMZM2G125527	<i>ZmRPL44</i>	qRT-PCR	RPL144-F RPL144-R	72	CCTCCAAGAACAAGAGTGCAA GGCTATCCTTTCCCTTCTTAACTG
None	AC196475_FGT004	<i>ZmCOMT</i>	qRT-PCR	COMT-F COMT-R	76	AGACTGCCCCGATCCAT GAATTTAGAATCCACGACATGCAA

**Table S4.** Proteins that showed significant changes in the bulk F compared with the bulk U.

Spot no.	Trend in bulk F <sup>a</sup>	<i>P</i> value			Maize gene model <sup>b</sup>	Annotation <sup>c</sup>	Class	<i>Mr</i> <sup>d</sup>	pI <sup>d</sup>	<i>Mr</i> <sup>e</sup>	pI <sup>e</sup>	Peptide match no.
		Genotype	Treatment	Genotype x Treatment								
s2602	Up	0.001	0.259	0.476	GRMZM2G001750	Hydrolase, $\alpha/\beta$ fold family protein	Unknown	37.6	5.5	41.0	8.5	6
s2730	Up	0.002	0.344	0.268	GRMZM2G001750	Enoyl-acyl carrier protein (ACP) reductase 1 (ENR1)	Lipid	34.4	5.1	32.3	5.2	8
s3076	Down	0.007	0.155	0.001	GRMZM2G001750	pyrabactin resistance/PYR1-like/regulatory components of ABA receptor protein 12 (PYR/PYL/RACR12)	Stress	28.9	4.6	25.36	5.2	5

<sup>a</sup>Trend in the bulk F compared to the bulk U in both treatment conditions.

<sup>b</sup>Maize genome release 5a.59 of November 2010 (<http://www.maizesequence.org>).

<sup>c</sup>Manually improved annotations from Swissprot, Genebank, trembl and InterPro databases.

<sup>d</sup>Observed *Mr* (10<sup>3</sup>) and pI calculated from the 2-D gel.

<sup>e</sup>Theoretical *Mr* (10<sup>3</sup>) and pI computed by the EXPASY website.



## **SUPPLEMENTARY METHOD**

### **Protein identification by LC-MS/MS**

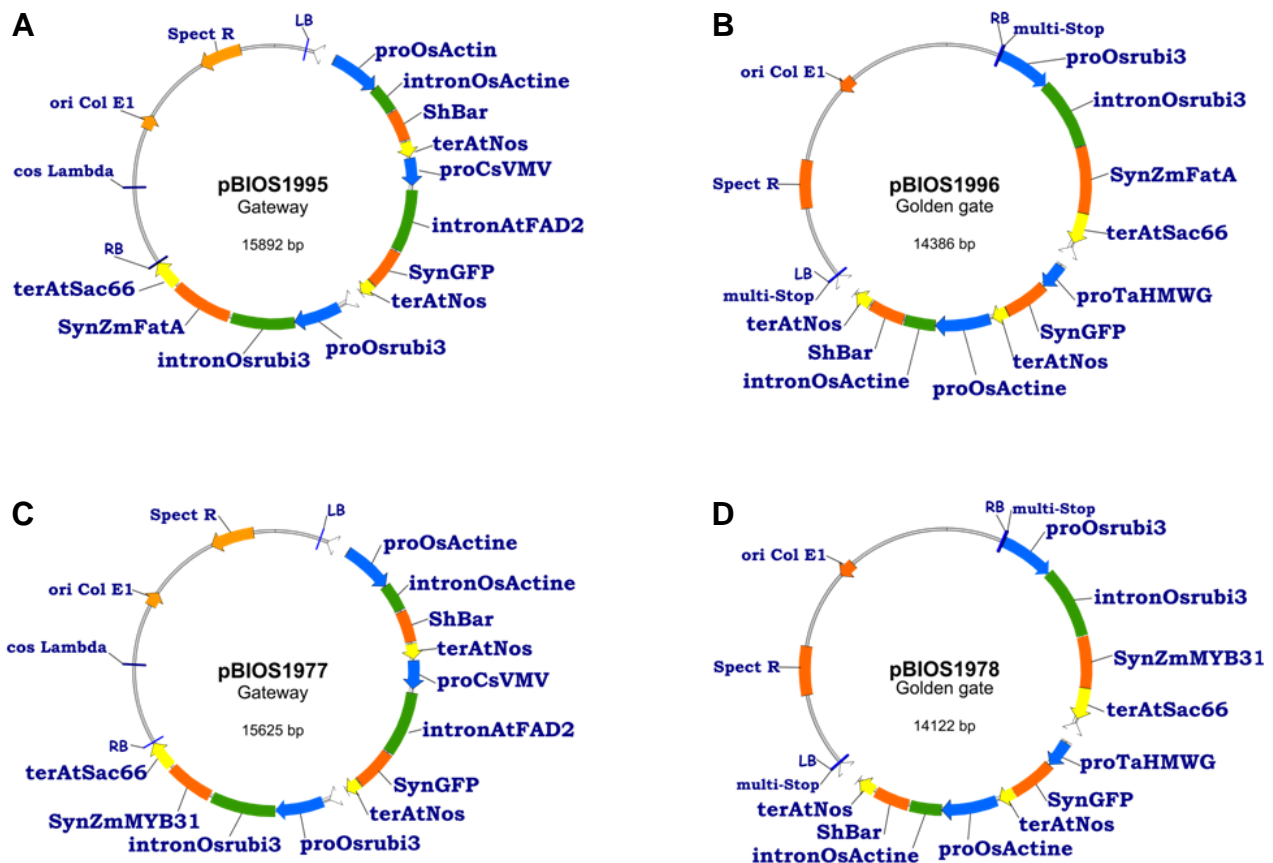
A database search was performed with X!Tandem (version 2010.01.01.4) (<http://www.thegpm.org/TANDEM/>). Enzymatic cleavage was declared as a trypsin digestion with one possible misscleavage. Cys carboxyamidomethylation and Met oxidation were set to static and possible modifications, respectively. Precursor mass and fragment mass tolerance were 2.0 and 0.8, respectively. A refinement search was added with similar parameters, except that semi-trypsinic peptide and possible N-terminal protein acetylation were searched. The maize genome sequence (release 4a.53, 53764 entries), UniProt database restricted to maize (<http://www.uniprot.org>, release 15.11, 43694 entries) and a contaminant database including in particular trypsin and keratins, were used. Only peptides with a E value smaller than 0.1 were reported. Identified proteins were filtered and grouped using X!Tandem pipeline (<http://pappso.inra.fr/bioinfo/xtandempipeline/>) with the following criteria: (1) a minimum of two different peptides was required with a E value smaller than 0.05; (2) a protein E value (calculated as the product of unique peptide E values) smaller than  $10^{-4}$  was required. In case of identification with only 2 or 3 MS/MS spectra, similarity between the experimental and the theoretical MS/MS spectra was visually checked. To take redundancy into account, proteins with at least one peptide in common were grouped. This allowed grouping of proteins of similar function. Within each group, proteins with at least one specific peptide relative to other members of the group were reported as sub-groups.

## SUPPLEMENTARY LEGENDS

**Figure S1.** Response curves of LER to soil water deficit in two contrasted RILs. The RIL104 (a) and the RIL245 (b) carrying out different alleles in the chromosomal region harbouring the QTLs for  $LER_{\text{deficit}}$  and  $LER_{\text{deficit-intercept}}$  (intercept of  $LER_{\text{deficit}}$ ) showed low and strong sensitivity to soil water deficit, respectively. Each symbol (filled circles, empty circles, stars) represents one plant from three different experiments. The straight line is a linear regression used to estimate  $LER_{\text{deficit}}$  and  $LER_{\text{deficit-intercept}}$ .

**Figure S2.** Phenotypic characterization of the two bulks of RILs. (a-b) LER expressed per unit day time for the 5th (a) and 6th (b) leaves from plants of bulks F and U under well-watered and water deficit conditions. (c) ABA concentration in the 5th leaf from plants of bulks F and U under well-watered and water deficit conditions. The mean of 17 biological replicates  $\pm$  SE is shown. When two samples show different letters above the bars, the difference between them is significant ( $P < 0.05$ ).

**Figure S3.** Expression profile of the 8 candidate genes along the maize developmental leaf gradient. Results of sequence analyses on the Illumina 2G platform from cDNA libraries on 4 representative zone (base, -1 cm, +4 cm and tip) of the 3rd leaf blade of a 9-day-old maize seedling (Li et al., 2010). Base: 1 cm above the leaf 3 ligule, which corresponds in our study to the growing zone (GZ); -1cm: 1 cm below the leaf 2 ligule, which corresponds to leaf tissue undergoing the sink-source transition; +4 cm: 4 cm above the leaf 2 ligule, which corresponds to a maturing zone called DZ in our study; tip: + 1 cm below the leaf 3 tip, which corresponds to the mature zone.



**Figure 1. Constructions utilisées pour la transformation du maïs avec les gènes candidats *ZmFata* et *ZmMYB31* synthétiques.** Constructions utilisées pour les transgène synthétiques *ZmFataA* (A-B) et *ZmMYB31* (C-D). Cassette du transgène synthétique *ZmFataA* : [proOsrubi3-intronOsrubi3-SynZmMYB31-terAtSac66] ; cassette du transgène synthétique *ZmMYB31* : [proOsrubi3-intronOsrubi3-SynZmMYB31-terAtSac66] ; cassette du gène de sélection des transformants à l'aide de l'herbicide bialaphos : [proOsActine-intronOsActine-ShBar-terAtNos] ; cassette du gène GFP permettant le suivi visuel des transformants : [proCsVMV-intronAtFAD2-SynGFP-terAtNos] ou [proTaHMWG-SynGFP-terAtNos]. At , *A. thaliana* ; Os , *Oriza sativa* ; Sh , *Streptomyces hygroscopicus* ; Ta , *Triticum aestivum*.

Gène	Technologie	Vecteur	Souche	Nombre d'évènements à 1 ou 2 copies	Nombre d'évènements monocopie	Nombre d'évènements ayant un transcrit intègre unique (nombre d'évènements testés)
ZmMYB31	Gateway	pBIOS1977	T01892	22	13	6 (9)
	Golden gate	pBIOS1978	T01893	40	26	13 (20)
ZmFataA	Gateway	pBIOS1995	T01907	26	18	11 (17)
	Golden gate	pBIOS1996	T01908	29	14	5 (14)

**Tableau 1. Bilan sur le nombre d'évènements transgéniques simples obtenus avec les quatre constructions produites.**

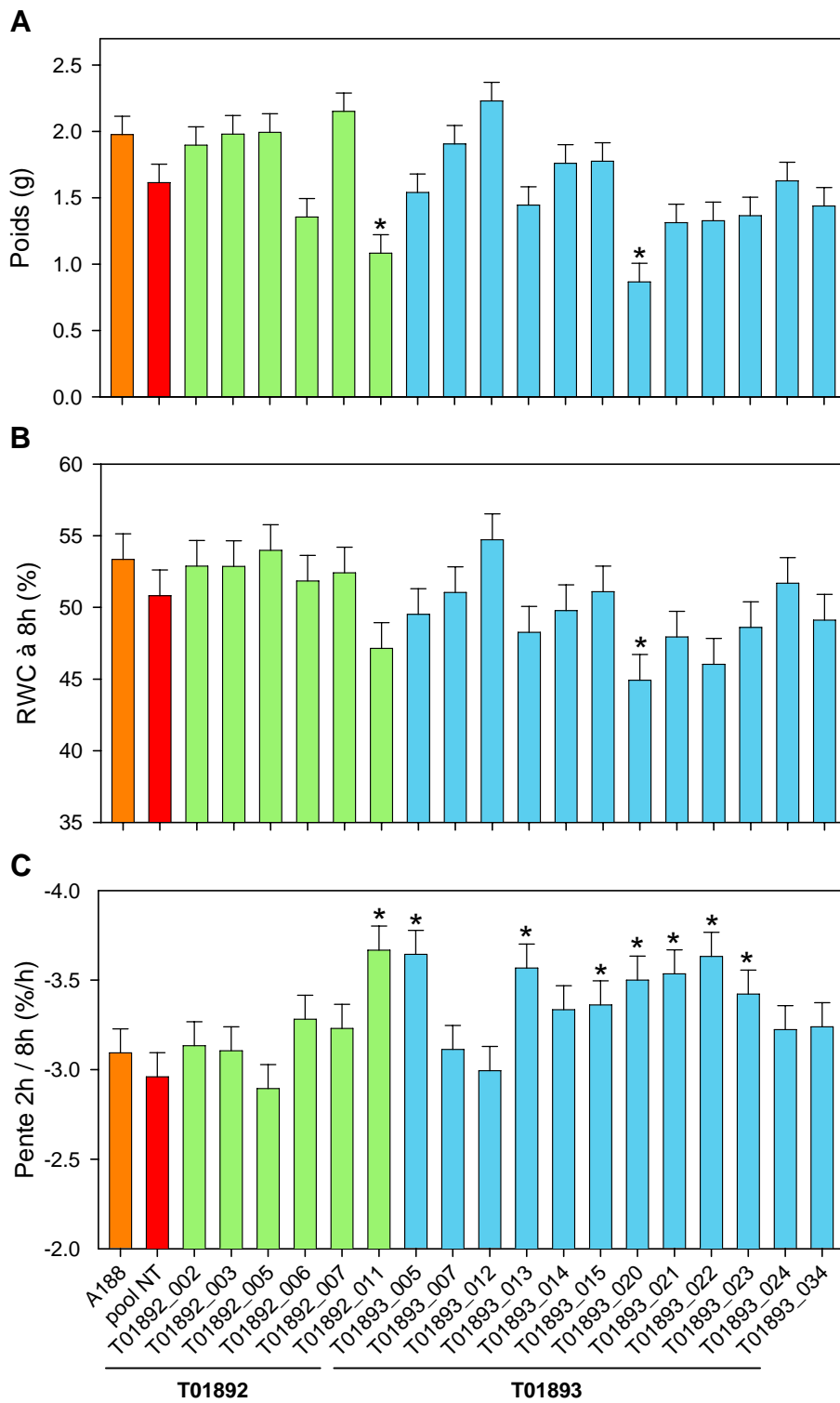
### **3. Supplément expérimental : production et caractérisation de plantes de maïs transgéniques sur-exprimant les gènes candidats *ZmMYB31* et *ZmFatA***

L'analyse du transcriptome et du protéome a permis d'identifier huit gènes candidats présentant une variation génétique d'expression liée à la région chromosomique marquée et co-localisant avec cette même région. Les analyses biochimiques réalisées ultérieurement ont permis de soutenir le rôle potentiel de deux d'entre eux : (1) le gène *ZmMYB31* codant un facteur de transcription R2R3-MYB de type 4 dont l'une des cibles est le gène *ZmCOMT* impliqué dans la biosynthèse des monomères de lignine (Fornalé et al., 2010) ; (2) le gène *ZmFatA* codant pour une acyl-ACP thioesterase (TE) de type FatA qui termine la réaction de biosynthèse des acides gras dans les plastes par hydrolyse de la liaison entre la chaîne acyl et l'ACP (préférentiellement le 18:1-ACP), libérant ainsi un acide gras (préférentiellement l'acide oléique, 18:1) (Beisson et al., 2003). Afin d'évaluer leur rôle vis-à-vis de la tolérance à la sécheresse, nous avons entrepris de produire et de caractériser des lignées de maïs transgéniques sur-exprimant l'un ou l'autre de ces deux gènes sous contrôle d'un promoteur constitutif (contrat Genoplante-Valor). La société Biogemma a pris en charge, pour chaque gène d'intérêt, la transformation, la détermination du nombre de copies insérées intègres chez les transformants primaires (T0), la production des grains T1 et l'évaluation de la cinétique de dessèchement des plantes transgénique T1. Pour ma part, j'ai évalué l'absence de terminaison prématurée de la transcription du transgène chez les plantes T0, participé aux prélèvements foliaires nécessaires pour évaluer l'expression du transgène chez les plantes T1, puis analysé l'abondance relative du transgène dans les feuilles des plantes T1.

#### ***3.1. Production des souches d'agrobactérie utilisées pour la transformation du maïs et contenant les gènes candidats *ZmMYB31* et *ZmFatA****

Pour favoriser leur expression, les séquences des gènes candidats *ZmMYB31* et *ZmFatA* de maïs ont été optimisées pour une utilisation optimum des codons chez le maïs. Ces séquences, à l'origine de la même séquence protéique que celle trouvée naturellement chez le maïs, présentaient une homologie au niveau nucléique de 79% pour *ZmMYB31* (GRMZM2G050305) et 77% pour *ZmFatA* (GRMZM2G102878).

Deux stratégie de clonage ont été utilisées pour introduire le gène synthétique d'intérêt dans le vecteur destiné à la transformation : (1) clonage à l'aide du vecteur Gateway qui fait appel à la recombinaison, ce qui nécessite l'ajout de séquences nucléotidiques supplémentaires au produit d'intérêt ; (2) clonage à l'aide du vecteur



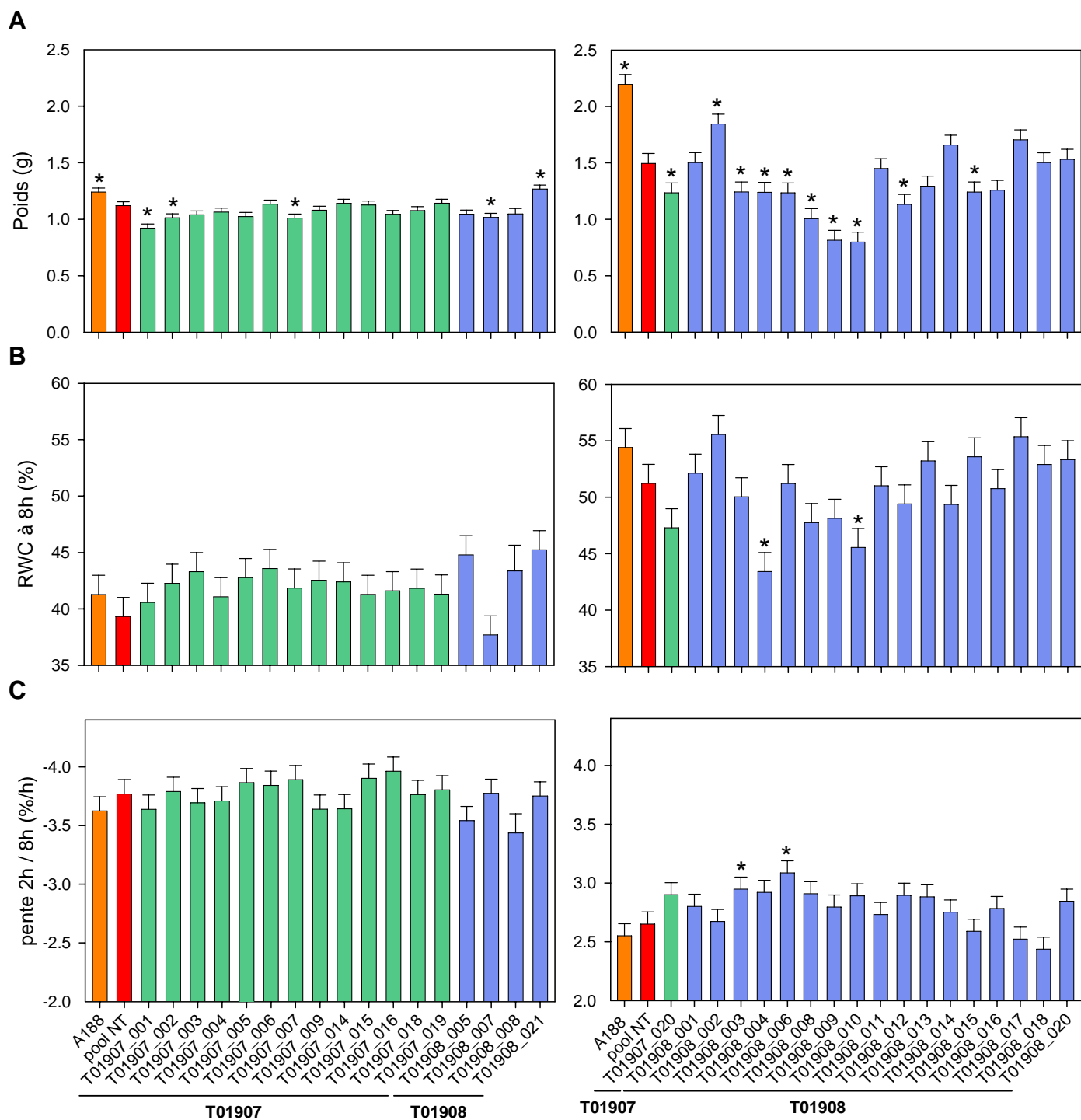
**Figure 2. Evaluation de la cinétique de dessèchement des transformants *ZmMYB31* de première génération.** L'analyse a été effectuée sur différents évènements T1 hémizygotes issus des souches T01892 (vert clair) et T01893 (bleu clair), ainsi que sur des plantes de la lignée de maïs A188 (orange) et d'un mélange des ségréants négatifs (pool NT ; rouge). Les plantes entières ont été coupées au collet puis plongées pendant 24h à 4°C et à l'obscurité dans de l'eau afin de déterminer leur poids à pleine turgescence (A). La quantité relative en eau (RWC) après 8 h (B) et la vitesse de dessèchement entre 2 et 8h (C) ont ensuite été mesurées sur des plantes asséchées à 30°C en présence de lumière. Les valeurs représentent les moyennes  $\pm$  écart-types (n = 5). Les étoiles indiquent une différence significative (test LSD de Fisher,  $P < 0.05$ ) par rapport au pool NT.

Golden gate qui utilise les propriétés diverses des enzymes de restriction de type II, ce qui permet le clonage sans ajout de séquences nucléotidiques supplémentaires (Engler et al. 2008). La transformation à l'aide du vecteur Golden Gate n'ayant pas encore été entièrement validée, la transformation par Gateway a également été réalisée afin d'assurer des résultats. Les vecteurs Gateway et Golden gate contenaient tous les deux : (1) le promoteur constitutif et l'intron du gène *Actine* de riz suivi du gène *Bar* de *Streptomyces hygroscopicus* conférant la résistance à l'herbicide bialaphos et permettant la sélection des transformants au stade plante ; (2) le promoteur du virus de la mosaïque des nervures du manioc (*CsVMV*) suivi de l'intron du gène *FAD2* d'*A. thaliana* (vecteur Gateway) spécifique de l'endosperme (vecteur Golden Gate) ou le promoteur de la gluténine de haut poids moléculaire (*HMWG*) suivi d'un gène codant une protéine fluorescente GFP (« green fluorescent protein ») permettant le suivi visuel des graines transformées ; (3) le promoteur constitutif du gène *ubiquitine 3* de riz, suivi de son premier intron pour contrôler l'expression du gène synthétique (Fig. 1; annexe 1).

Au total, quatre souches d'*A. tumefaciens* ont donc été produites (Tableau 1 ; annexe 1) : deux avec le gène *ZmMYB31*, nommées T01892 (Gateway) et T01893 (Golden gate), et deux avec le gène *ZmFata*, désignées T01907 (Gateway) et T01908 (Golden gate). Chacune de ces souches a été utilisée indépendamment pour transformer la lignée de maïs A188 qui est la seule à l'heure actuelle à donner de bons résultats de transformation avec *A. tumefaciens*.

### **3.2. Sélection des lignées transgéniques primaires**

Les transformants primaires (T0) ont été sélectionnés selon quatre critères : (1) nombre de copies insérées (PCR quantitative sur ADN génomique) ; (2) intégrité de l'ADN-T inséré (PCR sur ADN génomique) ; (3) absence de terminaison prématurée de la transcription du transgène dans les feuilles (RT-PCR à l'aide d'une amorce sens située sur l'intron *ubiquitine 3* de riz et d'une amorce antisens située sur le terminateur *AtSac66*) ; (4) nombre de grains T1 récoltés. Après sélection des transformants *ZmMYB31*, il a été obtenu 39 événements monocopie dont 19, sur les 28 analysés, possédaient un transcrit unique et intègre (Tableau 1). Après sélection des transformants *ZmFata*, il a été obtenu 32 événements monocopie, dont 16, sur les 22 analysés, avaient un transcrit unique et intègre (Tableau 1).



**Figure 3. Evaluation de la cinétique de dessèchement des transformants *ZmFatA* de première génération.** L'analyse a été effectuée sur différents évènements T1 hémizygotés issus des souches T01907 (vert) et T01908 (bleu), ainsi que sur des plantes de la lignée de maïs A188 (orange) et d'un mélange des ségréants négatifs (pool NT ; rouge). Les plantes entières ont été coupées au collet puis plongées pendant 24h à 4°C et à l'obscurité dans de l'eau afin de déterminer leur poids à pleine turgescence (A). La quantité relative en eau (RWC) après 8 h (B) et la vitesse de dessèchement entre 2 et 8h (C) ont ensuite été mesurées sur des plantes asséchées à 30°C en présence de lumière. Deux analyses différentes ont été réalisées (panels à gauche et à droite). Les valeurs représentent les moyennes  $\pm$  écart-types ( $n = 5$ ). Les étoiles indiquent une différence significative (test LSD de Fisher,  $P < 0.05$ ) par rapport au pool NT.

### 3.3. Caractérisation des lignées transgéniques T1

Les plantes transgéniques de première génération (T1 ; croisement du transformant primaire avec la lignée parentale A188), hémizygotés pour le transgène, ont ensuite été caractérisées à deux niveaux : (1) évaluation de la tolérance au déficit hydrique à l'aide de cinétiques de dessèchement ; (2) détermination de l'abondance relative de chaque transcrite d'intérêt dans la feuille par qRT-PCR.

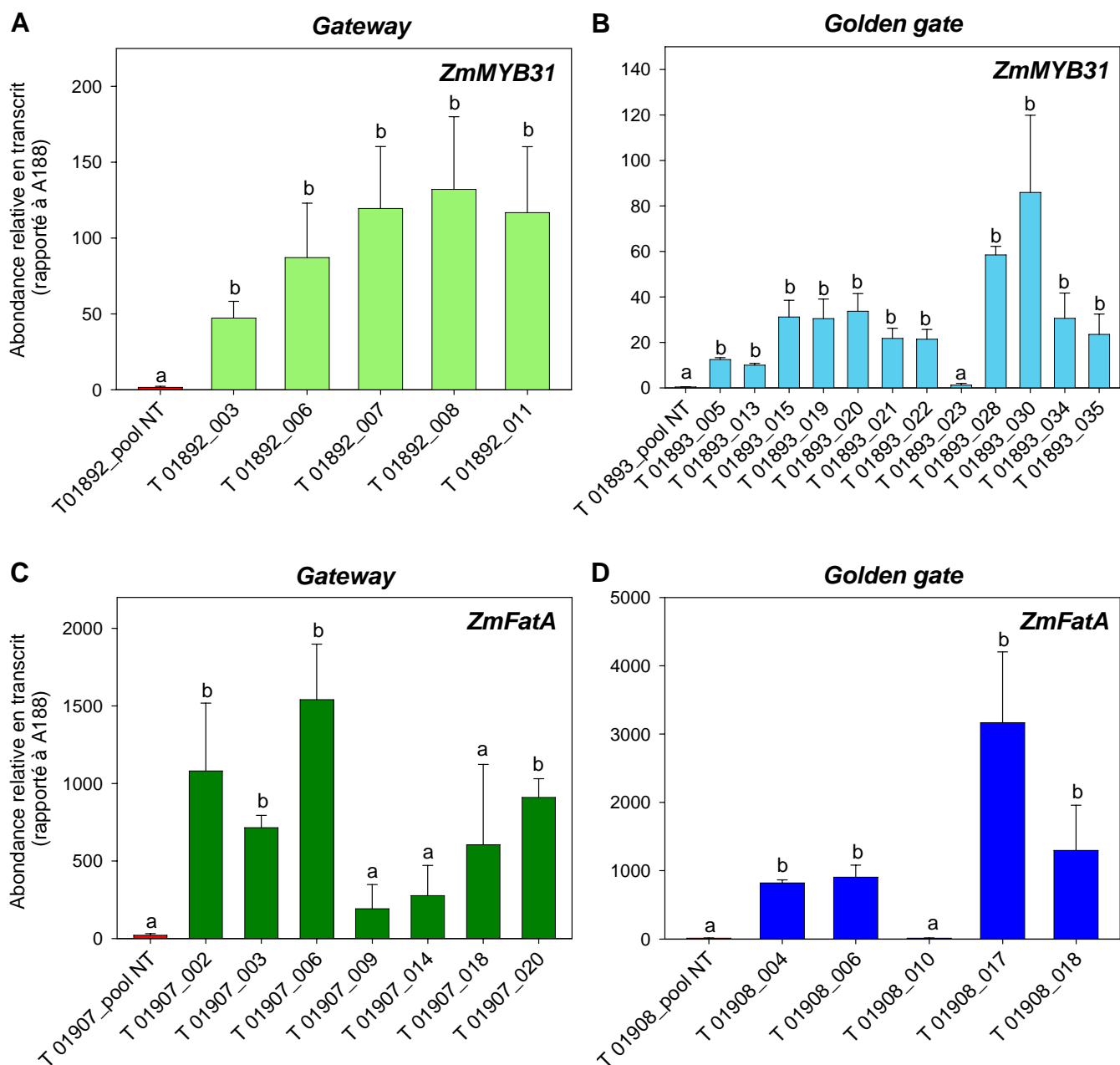
#### 3.3.1. Analyse de cinétiques de dessèchement sur les plantes T1

Des cinétiques de dessèchement ont été réalisées à partir de plantules T1 au stade 3-4 feuilles sur la plate-forme de cinétique de dessèchement de Biogemma. Trois paramètres ont été mesurés : (i) le poids à pleine turgescence après 24 h d'imbibition dans de l'eau à 4°C et à l'obscurité; (ii) la teneur relative en eau (RWC, « relative water content ») des plantes après 2 et 8 h d'exposition à 30°C à la lumière ; (iii) la vitesse de dessèchement entre 2 et 8 h. Le poids à pleine turgescence permet, en plus du calcul du RWC, de déterminer si les plantes analysées sont au même stade de développement. Il a été montré lors de précédentes expérimentations que ce poids correspondait au poids frais plus 3% d'eau absorbée et ceci quel que soit le génotype considéré (données de Biogemma).

Sur la base du nombre de grains disponibles et du nombre de copies du transgène (seuil fixé à 2 copies au plus), 18 évènements de transformation *ZmMYB31* et 34 évènements *ZmFatA* ont été analysés (cinq plantes par évènement pour chaque mesure). Un mélange de ségrégants négatifs (pool de graines GFP- issus de différents évènements T1 ; noté NT) ne possédant pas le transgène a été constitué et utilisé comme témoin. Dans le cas des transformants *ZmFatA* qui ont fait l'objet de deux séries d'analyse, le poids à pleine turgescence des plantes NT se différenciait de celui de la lignée parentale A188, suggérant un effet de la transformation et de la culture *in vitro*. Ceci n'était pas inattendu dans la mesure où les plantes étaient issus des transformants primaires (Fig. 3A). L'analyse des évènements indépendants a montré que :

- deux évènements *ZmMYB31* (T01892\_011 et T01893\_020) sur les 18 testés (11%) présentaient une croissance différente de celle des plantes NT (Fig. 2A), alors que 15 évènements *ZmFatA* sur les 34 testés (44%) présentaient une croissance différente de celle des plantes NT (Fig. 3A) ;
- un évènement *ZmMYB31* (T01893\_020 ; Fig. 2B) et deux évènements *ZmFatA* (T01908\_004 et T01908\_010 ; Fig. 3B), avaient un RCW après 8h de dessèchement significativement inférieur à celui des plantes NT ;





**Figure 4. Analyse par qRT-PCR de l'expression du transgène dans la feuille mature des transformants de première génération.** Les plantes T1 issues des souches T01892 (*ZmMYB31*, Gateway; panel A), T01893 (*ZmMYB31*, Golden gate; panel B), T01907 (*ZmFatA*, Gateway; panel C) et T01908 (*ZmFatA*, Golden gate; panel D), ont été cultivées en serre en condition irriguée. Après 23-24 jours, les feuilles en croissance (ligule inférieure ou égale à 1 cm) et la feuille mature inférieure ont été prélevées. L'ARN total des feuilles matures a été extrait et des qRT-PCR ont été réalisées à l'aide d'un couple de primers spécifiques de chaque transgène. Les valeurs obtenues ont été normalisées à l'aide de celle obtenue pour le gène *Zeastar* puis rapporté à celles obtenues pour la lignée parentale A188, prélevée le même jour que les transformants. Les valeurs obtenues correspondent à la moyenne  $\pm$  SE (n = 3 pour les évènements; n = 7 pour les pool NT). La présence de lettres différentes indique une différence significative ( $P < 0.05$ ) entre l'évènement transgénique et le pool NT (ANOVA à deux facteurs). Pool NT : mélange des 7 premiers évènements produits.

- huit évènements *ZmMYB31* (Fig. 2C) et deux évènements *ZmFatA* (Fig. 3B) avaient une vitesse de dessèchement significativement supérieure à celle des plantes NT.

Sur la base de la vitesse de dessèchement et le RCW à 8 h, 12 évènements sont apparus intéressants pour des analyses ultérieures : huit évènement *ZmMYB31* (un issu de la souche T01892 et sept issus de la souche T01893) et quatre évènements *ZmFatA* issus de la souche T01908.

### 3.3.2. Abondance relative du transgène dans les plantes T1

Sur la base des données d'expression obtenue par RT-PCR sur les plantes T0 (résultats non montrés) et des données de la cinétique de dessèchement obtenues sur les plantes T1, 29 évènements ont fait l'objet d'une nouvelle culture en condition irriguée pour déterminer quelle était l'abondance relative du transgène dans leurs feuilles au stade végétatif. Parmi les 29 évènements sélectionnés, 22 présentaient une différence significative pour au moins l'un des paramètres mesurés sur la plateforme de cinétique de dessèchement de Biogemma. L'abondance relative de chaque transcrite d'intérêt a été mesuré par qRT-PCR à partir d'ARN total de feuilles matures de plantes T1 :

- (3) le transcrite *ZmMYB31* s'est avéré plus abondant chez 16 des 17 évènements *ZmMYB31* testés par comparaison aux pools de plantes NT (Fig. 4A-B) ;
- (4) le transcrite *ZmFatA* s'est avéré plus abondant chez huit des 12 évènements *ZmFatA* testés par comparaison aux pools de plantes NT (Fig. 4C-D).

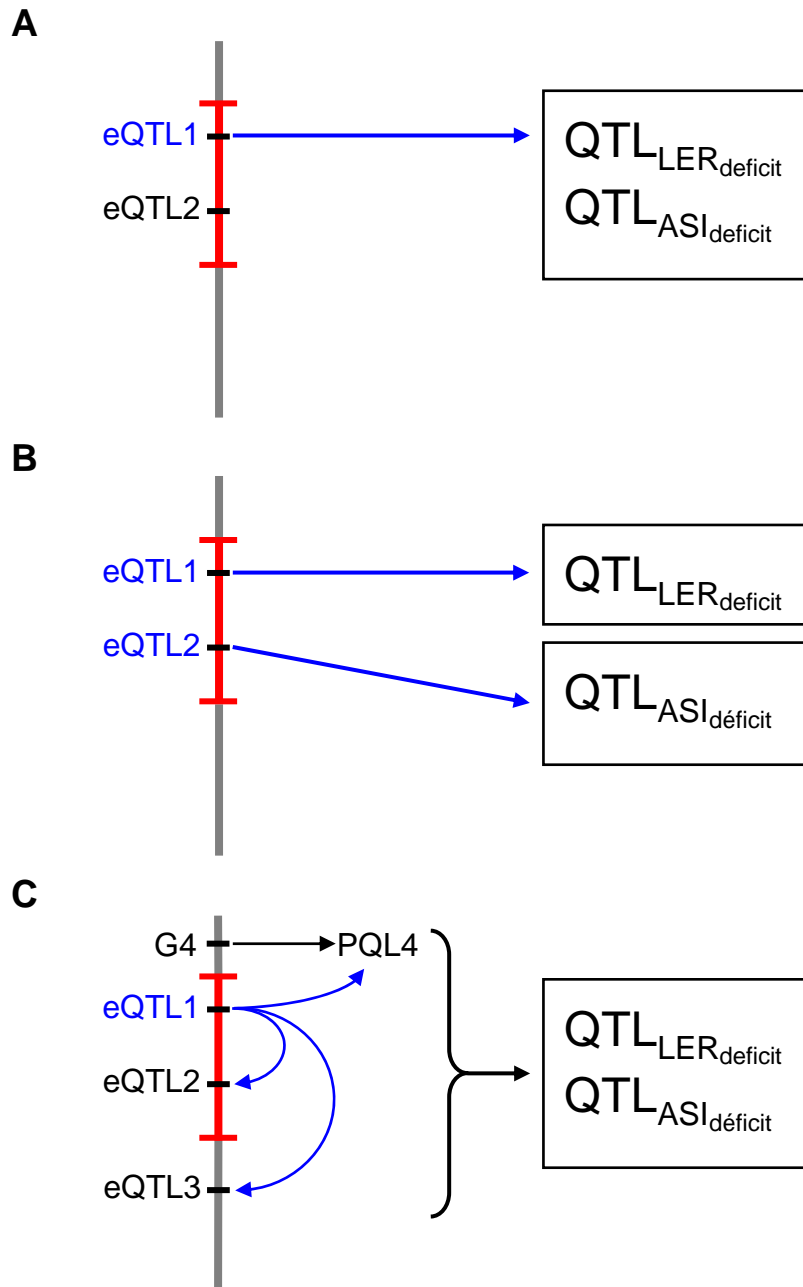
Au total, l'expression du transgène était plus abondante chez 24 des 29 évènements testés par comparaison aux pools NT. Une seconde extraction d'ARN a permis de confirmer les résultats obtenus et d'établir que la faible expression détectée chez les pools NT était due à une contamination. Par ailleurs, les annotations effectuées au cours de la culture ont montré que seuls les évènements sur-exprimant le gène *ZmFatA* et issus de la souche T01908 se différenciaient du pool NT avec ayant une feuille en croissance plus longue et plus large (Tableau 2).

### 3.4. Conclusion

Des plantes transgéniques dérégulées pour les gènes candidats *ZmMYB31* et *ZmFatA* ont été obtenues par transformation de la lignée de maïs A188 avec une cassette d'expression contenant chaque gène d'intérêt sous contrôle du promoteur constitutif *ubiquitine 3* de riz. Les profils moléculaires des plantes T0 et le nombre de grains T1

---

obtenus ont tout d'abord permis de sélectionner 17 évènements *ZmMYB31* et 12 évènements *ZmFatA* indépendants. A l'exception des évènements T 01893\_023 et T 01908\_010, tous les évènements T1 sélectionnés qui différaient du pool NT pour au moins l'un des paramètres mesurés sur la plateforme de cinétique de dessèchement, sur-exprimaient bien le transgène dans la feuille mature par comparaison au pool de plantes NT. Sur la base de ces données, pour chaque souche produite, trois évènements ont été sélectionnés pour des analyses ultérieures permettant de valider les lignées transgéniques produites pour les gènes *ZmMYB31* et *ZmFatA*.

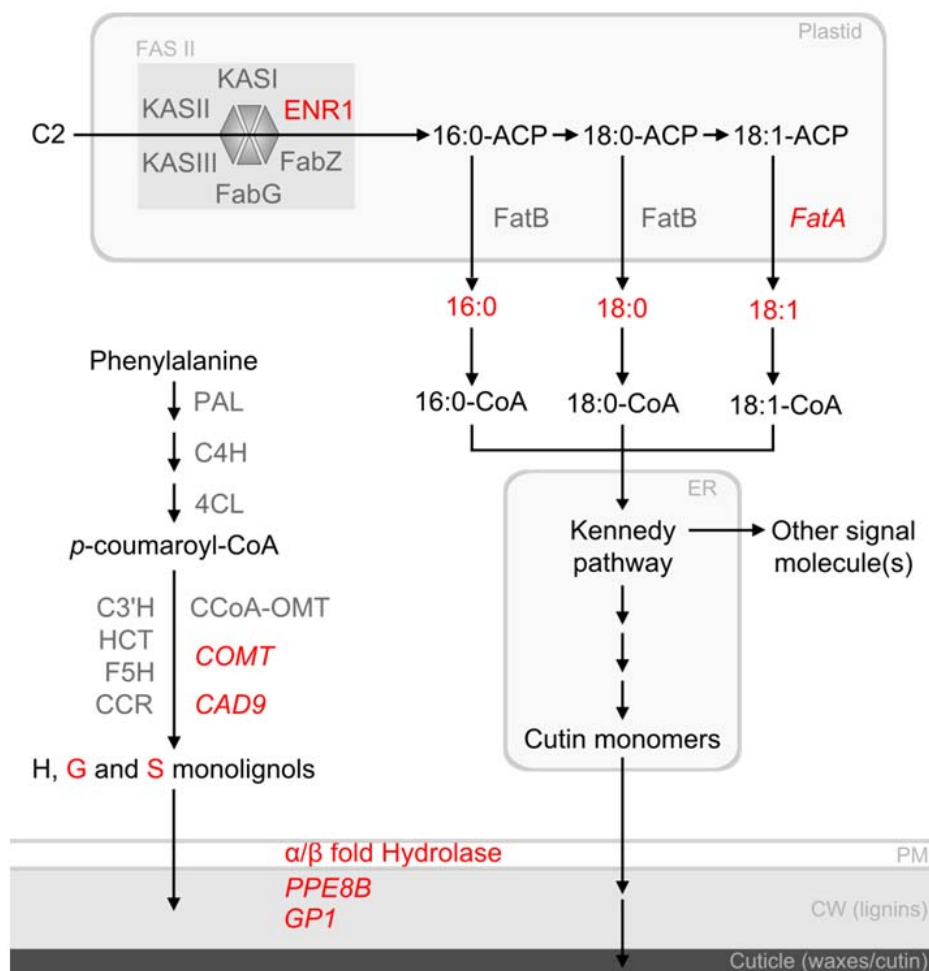


**Figure 5. Modèles susceptibles d'expliquer l'identification de plusieurs gènes différemment exprimés entre les deux mélanges de lignées recombinantes et co-localisant avec la région chromosomique contenant les QTL de réponses au déficit hydrique.** Le trait rouge vertical indique la région chromosomique ciblée (47 cM ; quatre marqueurs, dont les deux situés aux extrémités sont indiqués par des traits rouges horizontaux) sur le chromosome 2 du maïs (bin 2.08) et contenant les QTL de sensibilité de la croissance foliaire au déficit hydrique du sol ( $QTL_{LER_{déficit}}$ ) et de protandrie en condition de sécheresse ( $QTL_{ASl_{déficit}}$ ). Les traits noirs indiquent la position des gènes différemment exprimés (au niveau transcriptionnel ou protéique) entre les deux mélanges de lignées recombinantes et co-localisant ou non avec la région ciblée. Lorsque les gènes ne co-localisent pas avec la région ciblée, ils peuvent être situés de manière fortuite sur le chromosome 2 ou sur d'autres chromosomes du maïs (trait gris). Les traits bleus indiquent les différents scénarios possibles : (A) un seul des huit gènes candidats identifiés contrôle les deux caractères ciblés ; (B) deux des huit gènes candidats identifiés contrôlent les deux caractères ciblés ; (C) un des huit gènes candidats identifiés contrôle l'abondance (au niveau transcriptionnel ou protéique) de gènes qui co-localisent ou non avec la région ciblée, et affectent à leur tour les deux caractères ciblés. eQTL: QTL de la quantité de transcrit ; PQL: QTL de la quantité de protéine ; G4 : gène codant la protéine 4.

#### 4. Discussion générale

La première partie de mon travail de thèse a consisté à identifier des transcrits et des protéines dont l'abondance relative était régulée par un locus situé dans une région chromosomique (bin 2.08, 47 cM) contenant un QTL de sensibilité de la croissance foliaire au déficit hydrique du sol et un QTL de protandrie en condition de sécheresse chez le maïs. Dans ce but, nous avons comparé le transcriptome et le protéome de la zone d'élongation de feuilles en croissance de deux sous-populations de lignées recombinantes différant génétiquement pour la région ciblée et hétérogènes sur le reste du génome. Les analyses transcriptomique et protéomique ont permis d'identifier 67 transcrits et trois protéines dont l'abondance relative variait entre les deux sous-populations de lignées recombinantes. Parmi les 67 gènes exprimés différemment, sept ont été cartographiés dans la région chromosomique ciblée. Bien qu'aucun des gènes codant pour les protéines candidates identifiées n'ait été cartographié dans la région ciblée, nous avons montré que le gène *ZmFAtA*, codant un partenaire protéique de la protéine candidate *ZmENR1*, était cartographié au niveau de la région ciblée et exprimé différemment entre les deux sous-populations de lignées recombinantes. L'analyse du transcriptome combinée à celle du protéome a donc au total permis d'identifier huit gènes candidats.

Trois hypothèses peuvent être avancées pour expliquer l'identification de plusieurs gènes candidats : (1) un seul des huit gènes candidats identifiés interfère sur les caractères ciblés et les autres gènes candidats correspondent à des faux positifs (Fig. 5A) ; (2) deux des huit gènes candidats identifiés contrôlent chacun l'un des deux caractères ciblés, et les autres gènes candidats sont des faux positifs (Fig. 5B) ; (3) l'un des gènes candidats identifiés régule l'abondance d'un ou plusieurs autres gènes, co-localisant ou non avec la région ciblée, au niveau transcriptionnel et/ou protéique (Fig. 5C). L'ensemble des résultats obtenus et les données de la littérature tendent en faveur du gène candidat *ZmMYB31*, codant un facteur de transcription MYB-R2R3 du sous-groupe 4, et de la troisième hypothèse. En effet, nous avons montré que l'expression du gène *ZmMYB31* était (1) induite par le déficit hydrique, (2) positivement corrélée à celle de deux de ses cibles, les gènes *ZmCOMT* et *ZmCAD9*, impliqués dans la biosynthèse des monolignols G et S, (3) positivement corrélée à la teneur en monolignols G et S. Ces résultats suggèrent donc que le gène *ZmMYB31* régulerait positivement les gènes *ZmCOMT* et *ZmCAD9*, ce qui permettrait une accumulation accrue de monomères de lignine dans les parois et de ce fait une diminution de la perméabilité membranaire en condition de déficit hydrique (Fig. 6). Bien que le gène *ZmMYB31* ait été identifié comme répresseur de l'expression du gène



**Figure 6. Modèle schématique des voies métaboliques potentiellement régulées par la protéine ZmMYB31 au cours de la croissance des feuilles et des soies en condition de déficit hydrique.** Les transcrits (italique), protéines et métabolites, dont les teneurs diffèrent entre les deux mélanges de lignées recombinantes et qui sont des cibles potentielles de la protéine ZmMYB31, sont indiqués en rouge. Nous faisons l'hypothèse que la protéine ZmFatA (FatA) produit des dérivés lipidiques, tels que les monomères de cutines, susceptibles de participer à la croissance des feuilles et des soies en condition de déficit hydrique. Cuticle : cuticule ; CW : paroi; ER : réticulum endoplasmique ; plastids : plastes ; PM : membrane plasmique.

*ZmCOMT* chez *A. thaliana* (Fornalé et al., 2006, 2010), nos données obtenues par thioacidolyse corroborent les données obtenues par qRT-PCR. Il est possible que le gène *ZmMYB31* puisse à la fois agir comme un activateur et un répresseur transcriptionnel selon l'organisme et les conditions environnementales considérés, comme cela a été suggéré pour le gène *AtMYB15* (Agarwal et al., 2006).

Des données récentes de la littérature montrent que les protéines *AtMYB30* et *AtMYB41* affectent l'expression respectivement des gènes *AtFatB* et *AtFatA* (Raffaele et al., 2008 ; Comineli et al., 2008). Nous pouvons donc faire l'hypothèse que la protéine *ZmMYB31* serait également impliquée dans la synthèse *de novo* des acides gras en régulant directement ou indirectement le gène candidat *ZmFatA* (Fig. 6). Bien que la protéine *ZmFatA* ne soit pas détectable sur gels 2-D ou par d'autres méthodes de protéomiques (Friso et al., 2010 ; Majeran et al., 2010), nous pouvons supposer que l'abondance relative de son transcrite se répercute au niveau protéique et affecte la quantité de la protéine candidate *ZmENR1* afin de maintenir l'activité et les propriétés cinétiques (« metabolic channeling ») des enzymes de cette voie métabolique (Brown et al., 2006). De manière surprenante, nous avons observé une diminution des acides gras dans la sous-population de lignées recombinantes portant l'allèle favorable F où le transcrite du gène *ZmFatA* était le plus abondant. Il est possible que les acides gras formés soient métabolisés en d'autres composés non dosés, tels que les monomères de la cutine, un constituant de la cuticule (Pollard et al., 2008). Il a récemment été montré que l'augmentation de cutine permettait une diminution de la perméabilité de l'épiderme et une réduction de la transpiration (Pollard et al., 2008 ; Kosma et al., 2009). En régulant l'expression du gène *ZmFatA*, la protéine *ZmMYB31* pourrait donc à la fois affecter la quantité de la protéine candidate *ZmENR1* et la teneur en dérivés lipidiques susceptibles de réduire la transpiration foliaire en condition de déficit hydrique (Fig. 6).

Afin d'évaluer le rôle des gènes candidats *ZmMYB31* et *ZmFatA* vis-à-vis de la tolérance à la sécheresse, nous avons entrepris la production et la caractérisation de plantes transgéniques sur-exprimant l'un ou l'autre de ces deux gènes sous le contrôle du promoteur constitutif du gène *ubiquitine 3* de riz. Après sélection des transformants T0, des analyses préliminaires ont été réalisées sur les transformants T1. Il est ainsi apparu que huit évènements indépendants sur-exprimant le gène *ZmMYB31* et deux évènements indépendants sur-exprimant le gène *ZmFatA* avaient une vitesse de dessèchement significativement plus forte que celle du mélange de ségrégants négatifs. Pour deux des évènements *ZmMYB31* et les deux évènements *ZmFatA*, cette différence semble corrélée

au poids à pleine turgescence. Les données de dessèchements semblent en contradiction avec le rôle supposé de ces deux gènes dans la réponse au déficit hydrique. Cependant, il est intéressant de noter que des résultats similaires ont été obtenus avec le gène *AtMYB41* (Cominelli et al., 2008). En effet, bien que ce gène soit induit en réponse à la déshydratation, sa sur-expression entraîne une perte en eau plus importante dans les feuilles (Cominelli et al., 2008).

Comme la protéine *AtMYB41*, la protéine *ZmMYB31* pourrait aussi affecter différents constituants de la membrane plasmique et de la paroi cellulaire (Fig. 6). En effet, dans la listes des gènes différemment exprimés entre les deux sous-population de lignées recombinantes, figurent plusieurs gènes également affectés par la sur-expression du gène *AtMYB41* (Cominelli et al., 2008), en particulier une  $\alpha/\beta$  fold hydrolase localisée dans la membrane plasmique, la pectinestérase PPE8B impliquée dans la modification de la pectine de la paroi, et la protéine GP1 correspondant à une glycoprotéine localisée dans la paroi (Fig. 6). Il a été montré que des changements dans la structure de la pectine influencent le développement des plantes et la réponse aux stress (Pelloux et al., 2007).

L'ensemble des données obtenues nous ont conduits à proposer un modèle de régulation dépendant du gène *ZmMYB31*. Néanmoins, nous ne pouvons pas exclure que l'un des autres gènes candidats identifiés soit impliqué dans la réponse au déficit hydrique. Ainsi, les gènes candidats *ZmREM4.1* et *ZmJAZ2*, présentent des caractéristiques pouvant les relier à la réponse au déficit hydrique. Le gène candidat *ZmREM4.1* est localisé spécifiquement dans la membrane plasmique (Raffaele et al., 2009; T. Ott, communication personnelle). Il semble particulièrement intéressant dans la mesure où : (1) il est co-localisé à environ 5 cM du pic du QTL de sensibilité de la croissance foliaire au déficit hydrique du sol ; (2) l'expression des gènes du groupe 4 à laquelle il appartient est corrélée à celle de gènes associés aux voies énergétiques et aux stress biotiques et abiotiques chez *A. thaliana* et le riz (Raffaele et al. 2007 ; Ray et al., 2010) ; (3) certaines rémorines sont enrichies dans la fraction insoluble au détergent (« detergent insoluble membrane », DIM) de la membrane plasmique, et présentes dans les plasmodesmes où elles interfèrent avec la propagation du virus de la pomme de terre PVX en se fixant à la protéine virale TGBp1 (Raffaele et al. 2009). Par ailleurs, le gène candidat *ZmJAZ2* est un membre de la famille JAZ connue pour réprimer les réponses induites par le jasmonate, telles que la sénescence foliaire (Wasternack, 2007). La jasmonate stimule une interaction entre les protéines JAZ et la protéine ubiquitine ligase SCF<sup>coll</sup>, ce qui entraîne une dégradation des protéines JAZ par les protéases S26 chez *A. thaliana* (Staswick, 2008). Cette dégradation des répresseurs



JAZ libère alors le facteur de transcription MYC2, ce qui induit l'expression de gènes dépendants du jasmonate (Staswick, 2008). Il est possible qu'une forte expression du gène *ZmJAZ2* dans la population favorable permette une protection contre le déficit hydrique. En effet, il a été montré qu'un retard de la sénescence foliaire induisait une tolérance au déficit hydrique chez *Nicotiana tabaccum* cv. SR1 avec un maintien du rendement (Rivero et al., 2007).

## 5. Perspectives

A court terme, des expériences sont d'ores et déjà prévues pour valider les évènements transgéniques sur-exprimant le gène *ZmMYB31* via l'analyse de : (1) leur teneur en protéine ZmCOMT par MS quantitative sans marquage isotopique (« label-free ») à l'aide d'extraits protéiques solubles (« gel-free ») ; (2) leur teneur en monolignols par thioacidolyse. Parallèlement, les évènements sur-exprimant le gène *ZmFatA* seront validés sur la base de : (1) leur teneur en acides gras totaux par chromatographie en phase gazeuse avec détection par ionisation de flamme (GC-FID) ; (2) leur teneur en acides gras dans les différentes espèces lipidiques par chromatographie sur couche mince suivie d'une analyse GC-FID (Contrat de prévalorisation avec Génoplante-Valor nov. 2009-fev. 2011).

A moyen terme, le rôle des gènes *ZmMYB31* et *ZmFatA* vis-à-vis de la tolérance à la sécheresse sera étudié en évaluant le phénotype des évènements sélectionnés : (1) au stade végétatif sur la plateforme de phénotypage Phenodyn (Sadok et al., 2007 ; projet Amaizing, 2012-2019) via la mesure de la vitesse d'élongation foliaire et de la transpiration en réponse à différents potentiels hydriques du sol, (2) au stade reproducteur sur la plateforme PhenoArch (projet Amaizing) et au champ via la mesure de la protandrie en condition de déficit hydrique.

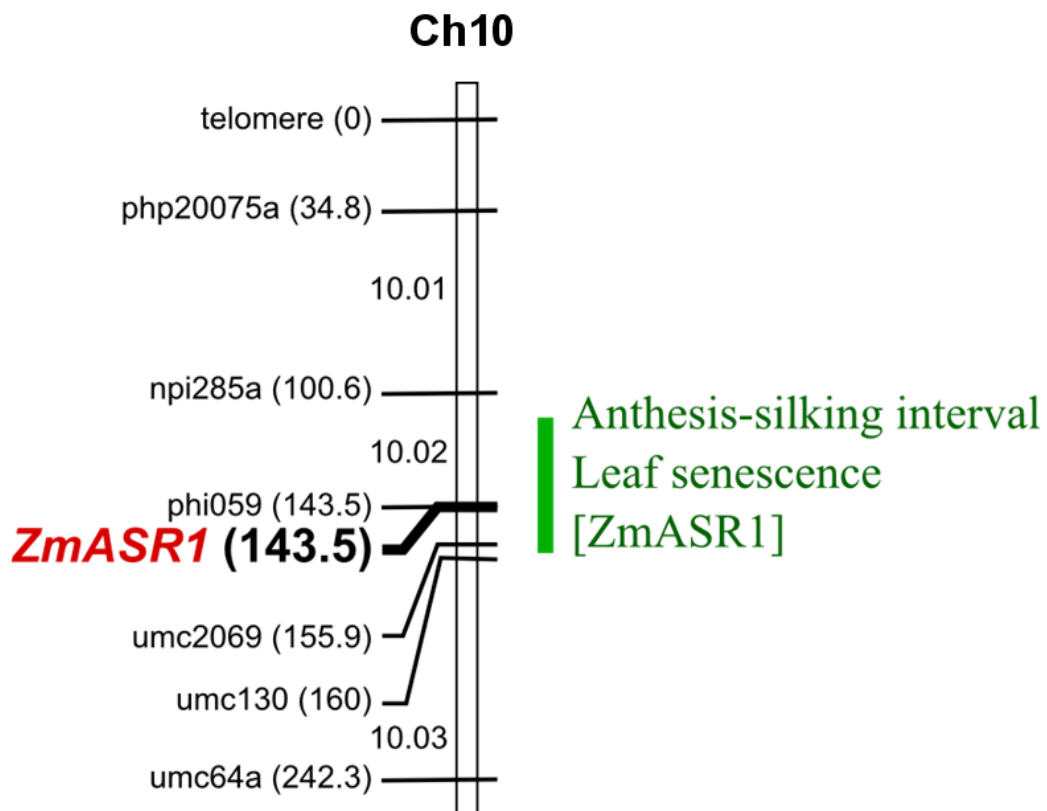
Par ailleurs, il serait intéressant de valider le modèle de régulation dépendant du gène *ZmMYB31* en analysant par qRT-PCR l'expression des cibles connues (*ZmCAD9* et *ZmCOMT*) et supposées (*ZmFatA*, *ZmPPE8B*, *ZmGPI*,  $\alpha/\beta$  fold hydrolase) du gène *ZmMYB31* chez les plantes sur-exprimant le gène *ZmMYB31*. Il serait également intéressant d'étudier l'effet de la sur-expression des gènes *ZmMYB31* et *ZmFatA* sur : (1) la composition de la cutine par GC-FID ; (2) la structure de la cutine par microscopie électronique à balayage ; (3) la perméabilité de l'épiderme par mesure des flux de chlorophylle. Par ailleurs, l'analyse par MS quantitative de la protéine ZmENR1 chez les plantes sur-exprimant le gène *FatA* permettrait de confirmer que les protéines ZmFatA et

ZmENR1 forment un métabolon. Une alternative serait d'étudier l'expression du gène *AtFatA* chez le mutant *mod1* codant une ENR chez *A. thaliana* (Mou et al., 2000).

Pour s'assurer que l'un des autres gènes candidats identifiés n'est pas impliqué dans la régulation du locus situé dans la région ciblée, nous pourrions envisager de : (1) produire d'autres plantes transgéniques sur-exprimant ou sous-exprimant ces gènes ; (2) rechercher des mutants dans les collections ; (3) réaliser une analyse par génétique d'association afin d'associer un polymorphisme dans un ou plusieurs de ces gènes avec une différence phénotypique reliée à la tolérance au déficit hydrique du maïs. Enfin, un moyen d'étudier la fonction des gènes dont la fonction exacte reste méconnue ou qui sont de fonction inconnue pourrait être de compléter avec des ADNc de maïs des mutants d'*A.thaliana*, dont le phénotype présente une altération caractéristique du paramètre ciblé.

## **CHAPITRE 2**

**Caractérisation fonctionnelle de la protéine candidate *ZmASR1*  
et analyse des mécanismes de régulation des gènes *ZmASR***



**Figure 1. La protéine candidate ZmASR1 (adapté de Vienne et al., 1999).** Le gène candidat *ZmASR1* colocalise avec son PQL ([*ZmASR1*]) et des QTL de protandrie (« Anthesis-silking interval ») et de sénescence foliaire (« Leaf senescence ») sur le chromosome 10 du maïs.

## **CHAPITRE 2. Caractérisation fonctionnelle de la protéine candidate ZmASR1 et analyse des mécanismes de régulation des gènes *ZmASR***

### **1. Objectif**

Au laboratoire, une analyse de PQL dans la population de lignées recombinantes issues du croisement entre les lignées parentales de maïs MBS847 et F2 a permis d'identifier ZmASR1 (« *Zea mays* ASR1 ») comme une protéine candidate. En effet, son PQL co-localise avec le gène *ZmASR1* (ce qui suggère que le PQL est le gène *ZmASR1* lui-même) et des QTL de sénescence foliaire et de protandrie en condition de sécheresse (Fig. 1 ; de Vienne et al., 1999). L'effet sur la sénescence en condition de sécheresse a ensuite été confirmé avec des sur-expresssurs et des sous-expresssurs du gène *ZmASR1* (Jeanneau et al., 2002). Des travaux ont donc été initiés au laboratoire afin de mieux appréhender la fonction de cette protéine. De manière intéressante, il a été montré que la famille *ASR* compte au moins neuf membres chez le maïs. De plus, l'analyse quantitative de gels 2D et des Western blot réalisés à l'aide d'un anticorps dirigé contre la protéine ZmASR1, ont montré que trois isoformes *ASR* de maïs, et en particulier la protéine ZmASR1, sont présentes sous la forme de trains de spots, suggérant l'existence d'isoformes.

Dans ce contexte, mon travail de thèse a tout d'abord consisté à préciser le rôle de la protéine ZmASR1 en validant son rôle au champ en condition de sécheresse, et en identifiant ses cibles à l'aide d'approches transcriptomique, protéomique et métabolomique (coll. E. Issakidis-Bourguet, UMR 8618 CNRS; Biogemma ; PAPPSO ; Plate-forme Métabolisme-Métabolome de l'IFR87 ; ANR Génoplante WaterLess). Une autre partie de mon travail de recherche a consisté à étudier les mécanismes de régulation du gène *ZmASR1*, ainsi que ceux des autres membres de la famille *ZmASR* à laquelle il appartient chez le maïs (coll équipes GEAR et ACEP ; P. Rogowsky, UMR 879 INRA, Lyon). Des analyses par qRT-PCR ont tout d'abord permis de déterminer l'abondance relative des transcrits *ZmASR* dans différents organes et en réponse à différents stimuli (coll W. Bouard, stage M1). Des analyses biochimiques (mesure d'activité Ser/Thr et Tyr kinases) et protéomiques [séparation des protéines sur gels 2D, analyse par Western blot, enrichissement en phosphoprotéines et en phosphopeptides, identification de phosphopeptides par spectrométrie de masse (MS)] ont ensuite été initiées pour déterminer si les protéines ZmASR étaient soumises à des modifications post-traductionnelles par phosphorylation (coll. PAPPSO ; T. Vain, stage M1).

## **2. Implication de la protéine ZmASR1 dans la régulation de la biosynthèse des acides aminés branchés et le maintien du rendement en condition de sécheresse**

### ***2.1. Publication 2 : The Zea mays abscisic acid-, stress- and ripening-induced protein ZmASR1 influences branched-chain amino acid biosynthesis and maintains kernel yield under water-limited condition in maize***

Laetitia Virlovet, Marie-Pierre Jacquemot, Denise Gerentes, Hélène Corti, Sophie Bouton<sup>2</sup>, Françoise Gilard, Benoît Valot, Jacques Trouverie<sup>3</sup>, Guillaume Tcherkez, Matthieu Falque, Pascual Perez, Catherine Damerval, Peter Rogowsky, Graham Noctor, Michel Zivy, Sylvie Coursol\*

Univ Paris-Sud, UMR 320 /UMR 8120 Génétique Végétale, F-91190 Gif-sur-Yvette, France (L.V.) ; INRA, UMR 320 /UMR 8120 Génétique Végétale, F-91190 Gif-sur-Yvette, France (M.-P.J., H.C., S.B., B.V., J.T., M.F., S.C.) ; Biogemma Auvergne, F-63028 Clermont-Ferrand Cedex, France (D.G., P.P.) ; CNRS, UMR 8618 Institut de Biotechnologie des Plantes, F-91405 Orsay, France (F.G.) ; Univ Paris-Sud, UMR 8618 Institut de Biotechnologie des Plantes, F-91405 Orsay, France (G.T., G.N.) ; CNRS, UMR 320/UMR 8120 Génétique Végétale, F-91190 Gif-sur-Yvette, France (C.D., M.Z.) ; INRA, UMR 879 Reproduction et Développement des Plantes, F-69364 Lyon, France (P.R.)

### **Running head: ZmASR1 contributes to BCAA homeostasis**

#### **Footnotes**

<sup>1</sup>This work was supported in part by the Génoplante projects “B06” and “WaterLess” (ANR-05-GPLA-034-05). LV was supported by a PhD Research fellowship of the Université Paris-Sud 11.

<sup>2</sup>Current address: Univ Picardie Jules Verne, EA3900 Biologie des Plantes et Contrôle des Insectes Ravageurs, F-80039 Amiens, France

<sup>3</sup>Current address: Univ Caen Basse-Normandie, UMR 11 Ecophysiologie Végétale, Agronomie & nutrition N.C.S, F-14032 Caen, France

\*Corresponding author: Sylvie Coursol, [coursol@moulon.inra.fr](mailto:coursol@moulon.inra.fr)

The author responsible for distribution of materials integral to the findings presented in this article in accordance with the policy described in the Instructions for Authors ([www.plantphysiol.org](http://www.plantphysiol.org)) is Sylvie Coursol ([coursol@moulon.inra.fr](mailto:coursol@moulon.inra.fr)).

## ABSTRACT

Abscisic acid-, stress- and ripening-induced (ASR) proteins were first described about 15 years ago as accumulating to high levels during plant developmental processes and in response to diverse stresses. Currently, the effects of ASRs on water deficit tolerance and the ways in which their physiological and biochemical functions lead to this stress tolerance remain poorly understood. Here, we characterized the *ASR* gene family from maize (*Zea mays*), which contains nine paralogous genes, and showed that maize *ASR1* (*ZmASR1*) was encoded by one of the most highly expressed paralogs. Ectopic expression of *ZmASR1* had a large overall impact on maize yield that was maintained under water-limited stress conditions in the field. Comparative transcriptomic and proteomic analyses of wild-type and *ZmASR1*-overexpressing leaves led to the identification of 3 transcripts and 15 proteins up- or down-regulated by *ZmASR1*. The majority of them were involved in primary and/or cellular metabolic processes, including branched-chain amino acid (BCAA) biosynthesis. Metabolomic and transcript analyses further indicated that *ZmASR1*-overexpressing plants showed a decrease in BCAA compounds and changes in BCAA-related gene expression in comparison with wild-type plants. Interestingly, within-groups correlation matrix analysis revealed a close link between 13 decreased metabolites in *ZmASR1*-overexpressing leaves, including two BCAAs. Among these 13 metabolites, 6 were previously shown to be negatively correlated to biomass, suggesting that *ZmASR1*-dependent regulation of these 13 metabolites might contribute to regulate leaf growth, resulting in improvement in kernel yield.

## INTRODUCTION

Since one-third of the world's food is produced on irrigated land (FAO, 2008), the likely impacts of recurrent heat waves and water stress episodes on global food production are numerous. In the European heat wave of 2003, crop production was reduced by around 30% (Ciais et al., 2005). In maize (*Zea mays*), the most significant reductions in end-of-season kernel yields are observed when water deficit occurs during the flowering stage, either just before floral initiation or immediately after pollination, because of the impact of water deficit on ovary and young kernel abortions (Claassen, 1970; Boyer and Westgate, 2004). Water deficit during the vegetative growth phase also leads to reductions in overall productivity through reductions in kernel numbers (Boyer and Westgate, 2004). Finally, late-stage water deficit during the kernel filling period can lead to reductions in yield, depending upon the dry matter reserves in the plant (McPherson and Boyer, 1977).

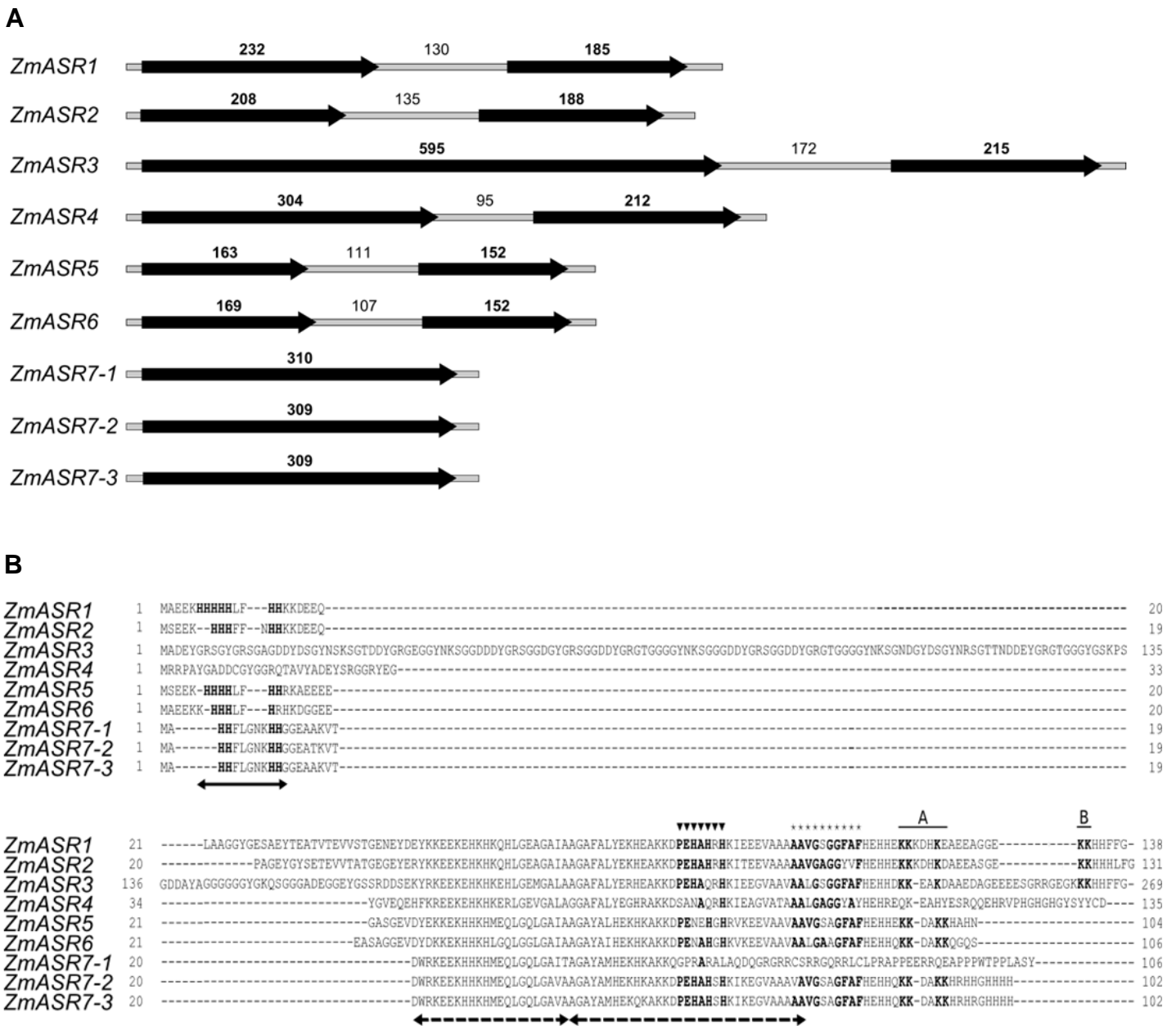
Trait-based approaches considering maize drought avoidance and dehydration tolerance mechanisms have been relatively slow to progress judged by the adoption of improved varieties (Salekdeh et al., 2009). Transgenic maize plants expressing the *betA* gene from *Escherichia coli* encoding choline dehydrogenase, a key enzyme in the biosynthesis of glycine betaine from choline, showed enhanced glycine betaine accumulation, resulting in greater kernel yield after drought stress in field tests (Quan et al., 2004). Expression of a maize CAAT box-transcription factor, ZmNF-YB2, has also been shown to confer drought tolerance and enhanced photosynthetic capacity under drought stress with improvements in kernel yield in maize (Nelson et al., 2007). Additionally, two members of a family of bacterial RNA chaperones, CspA from *E. coli* and CspB from *Bacillus subtilis*, were shown to confer vegetative tolerance and improved end-of-season kernel yield under water-limiting conditions in maize (Castiglioni et al., 2008). These studies clearly demonstrate that maize plants are amenable to improved water deficit tolerance through multiple mechanisms of action.

Having specific target traits and genes can markedly accelerate progress through the marker-assisted selection of parents and progeny in early generations (Tuberosa and Salvi, 2006). We used a proteomics strategy, with the use of a recombinant inbred line population derived from the cross between the maize inbred lines MBS847 and F2 differing in yield under water deprivation conditions, to identify candidate proteins associated with water stress response in maize (de Vienne et al., 1999). The protein quantity profiling of all individuals in the segregating population made it possible to treat the quantity of each protein as a quantitative trait and to identify QTL (quantitative trait locus) for protein quantity hereafter named PQL (protein quantity locus) according to Damerval et al. (1994). When the PQL



colocated with a QTL related to water deficit response, a causal relationship could be inferred between the protein level and the trait variation. Furthermore, when the gene encoding the protein also collocated, it could be seen as a candidate gene. Among the identified candidate genes was a member of the *abscisic acid-* (ABA), *stress- and ripening-induced* (ASR) gene family, *ZmASR1* (for *Zea mays ASR1*), which collocated with its PQL and QTLs for leaf senescence and anthesis-silking interval (de Vienne et al., 1999; Jeanneau et al., 2002). These associations were validated by the observation that transgenic maize lines misexpressing *ZmASR1* showed significant changes in leaf senescence under mild water deficit conditions in the field (Jeanneau et al., 2002). Interestingly, transgenic Arabidopsis plants overexpressing an ASR gene from *Lilium longiflorum* (*LLA23*) or *Musa paradisiaca* (*MpASR*), exhibited enhanced capacity to survive in water-limited conditions (Yang et al., 2005; Liu et al., 2010). Overexpression of tomato ASR1 (*SIASR1*) gene in tobacco plants also resulted in decreased rates of water loss (Kalifa et al., 2004a). Together, these results suggest that water deficit tolerance is mediated at least in part through ASR proteins.

The ASR proteins are highly charged, hydrophilic and low molecular weight proteins that are widely present in the plant kingdom, except in the Brassicaceae family (reviewed by Carrari et al., 2004; Battaglia et al., 2008). Since their discovery more than a decade ago, they have been described as accumulating to high levels during plant developmental processes, such as fruit ripening, pollen maturation and Glc metabolism (Iusem et al., 1993; Wang et al., 1998; Cakir et al., 2003; Frankel et al., 2007; Yang et al., 2008), and in response to diverse stresses, including water deficit, salt, cold, limited light and lately pathogen attack (Schneider et al., 1997; Riccardi et al., 1998; Vaidyanathan et al., 1999; Huang et al., 2000; Maskin et al., 2001; Kalifa et al., 2004a; Philippe et al., 2010; Liu et al., 2010). Nevertheless, it is noteworthy that their exact function remains enigmatic. Indeed, the molecular mechanisms underlying the biological roles of the ASR proteins cannot be deduced simply by sequence homology with other known proteins. *SIASR1* and the grape ASR protein, *VvMSA* (for *Vitis vinifera* maturation-, stress-, ABA-induced protein), have been shown to possess DNA-binding activity (Cakir et al., 2003; Kalifa et al., 2004b; Rom et al., 2006; Maskin et al., 2007; Shkolnik and Bar-Zvi, 2008). On the basis of such findings, these ASR proteins have been proposed to regulate the transcription of sugar- and abiotic stress-regulated genes in fruit and vegetative tissues, respectively (Cakir et al., 2003; Kalifa et al., 2004a; Frankel et al., 2007; Saumonneau et al., 2008). However, a dual function of *LLA23* and *SIASR1* proteins as a regulator and a protective molecule upon water deficit has also been proposed (Yang et al., 2005; Yang et al., 2008; Konrad and Bar-Zvi, 2008).



**Figure 1. Gene structure of *ZmASR* genes.** (A) Schematic drawing of the exon/intron structure of *ZmASR* genes. Black arrows and thin grey bars indicate exons (bold numbers) and introns (normal numbers), respectively, sizes for which are in base pairs. (B) Alignment of the deduced amino acid sequences of *ZmASR* genes. Arrows denote the two highly conserved regions of ASR proteins: a small N-terminal consensus of ~18 to 20 amino acids containing a stretch of six His residues (solid arrow) and a large C-terminal region containing two ABA/WDS signatures (dashed arrows). Amino acid positions determined to be the Zn<sup>2+</sup>-dependent DNA-binding activity domain and a sequence possibly hindering DNA-binding of the SlASR1 protein (Rom et al., 2006), are marked with triangles and stars, respectively. Amino acid positions determined to be the A and B regions of the bipartite nuclear localization signal of the LLA23 protein (Wang et al., 2005), are underlined. Amino acids identical to LLA23 or SlASR1 proteins are written in bold.

To validate further the candidate gene *ZmASR1* and gain insight into its function, we characterized the *ASR* gene family of maize. We showed that *ZmASR1* was one of the most highly expressed *ASR* genes in maize and found evidence that its expression had a large overall impact on maize vegetative productivity and yield that was maintained under water-limited stress conditions in the field. We identified 25 genes that were either transcriptionally or post-transcriptionally regulated by *ZmASR1*, of which 7 were involved in branched-chain amino acid (BCAA) biosynthesis. Our studies further revealed a close link between 13 decreased metabolites in *ZmASR1*-overexpressing leaves, including two BCAAs, and support the idea that *ZmASR1*-dependent regulation of BCAA biosynthetic genes might contribute to yield improvement.

## RESULTS

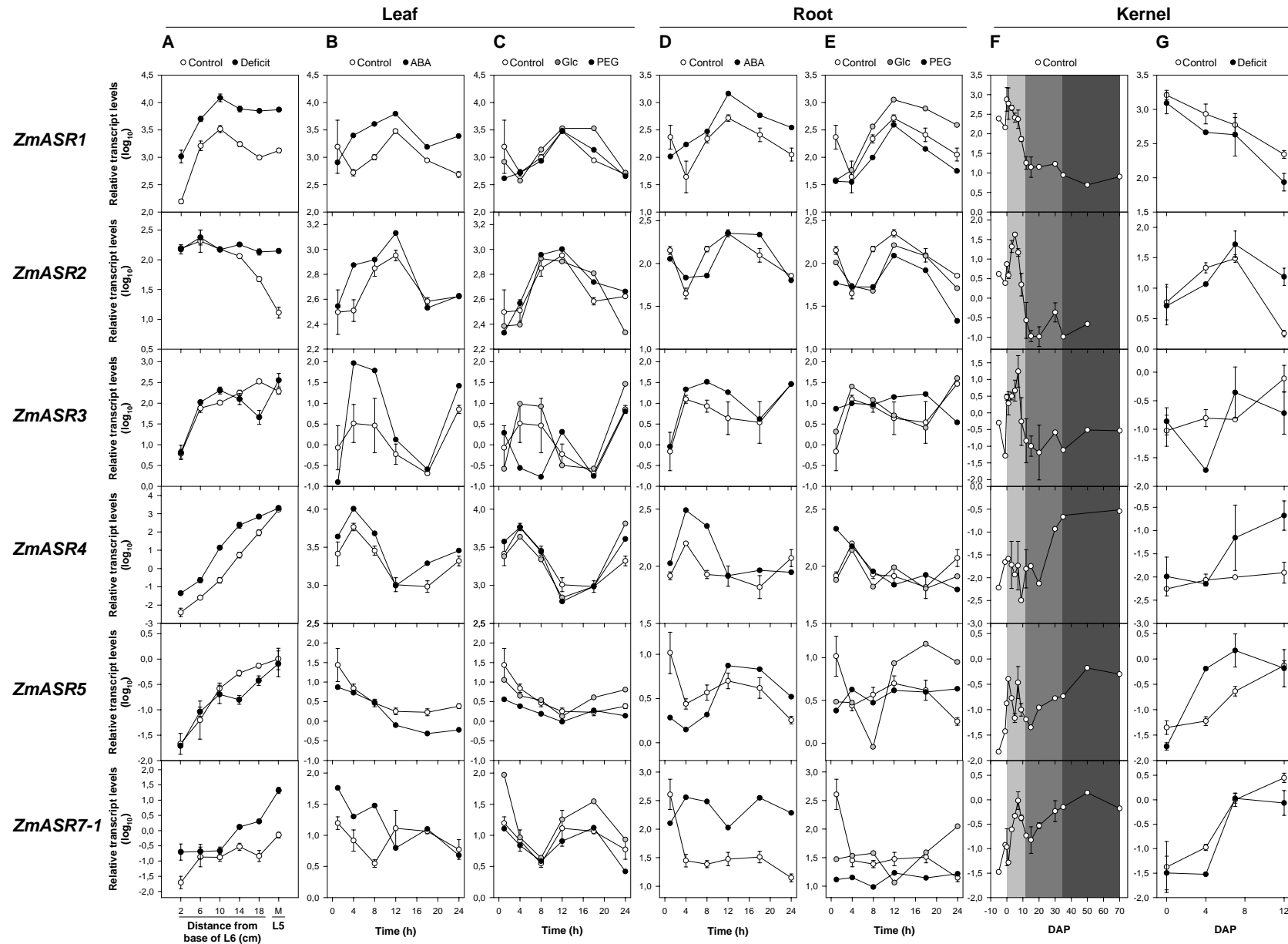
### ***ZmASR1* belongs to the maize *ASR* gene family that consists of at least nine members**

To identify *ZmASR* genes, we first analyzed the public databases for the presence of putative *ASR* coding sequences in maize using the *ZmASR1* protein sequence as the query (Riccardi et al., 1998). The search was then extended to maize genomic contigs (The Institute for Genomic Research), high throughput genomic sequences and the recently released maize genomic sequence (Schnable et al., 2009), which were matched with the EST sequences and used to design specific primers for DNA and cDNA amplification in maize lines used for mapping analysis and transgenesis. This led to the identification of 9 *ZmASR* genes in the maize genome (Fig. 1, Supplemental Tables S1 and S2), including the published gene *Bss1* (for *bundle sheath strands specific* gene 1; Furumoto et al., 2000) renamed hereafter *ZmASR4*. *ZmASR1* to *ZmASR7-3* mapped to 5 of the 10 maize chromosomes with chromosomes 2 and 10 harboring two loci each and chromosome 3 three loci (Supplemental Table S1). *ZmASR7-1* and *ZmASR7-2* were separated by 3 kb, whereas *ZmASR7-3* was separated from this cluster by approximately 100 kb. When the nucleotide sequences of the 9 *ZmASR* cDNAs were aligned, sequence identity values of 15 to 97% were observed between the individual maize genes (Supplemental Table S3). All *ZmASR* genes possessed a conserved structure composed of two exons and one intron, except *ZmASR7-1*, *ZmASR7-2* and *ZmASR7-3* genes, whose first and second exons were fused (Fig. 1A). This fusion between exon 1 and exon 2 was also found in sorghum (*Sorghum bicolor*) *SbASR6* and *SbASR7* genes, suggesting that it took place before the divergence of those two species (Supplemental Table S4). In general, the length of exons 1 and 2 was conserved (approximately 200 bp), with the exception of exon 1 of *ZmASR3*

gene, which was three times longer, like its barley, sorghum and rice counterparts (Supplemental Table S4).

The maize *ASR* loci encoded small proteins of 102 to 269 amino acid long that met the hydrophilin criteria (Garay-Arroyo et al., 2000) in that their GRAVY index was between -1.13 and -1.37, and 8 to 28% of their amino acid residues are Gly, and were predicted to be “natively unfolded” in solution given their enrichment in disorder-promoting charged amino acids (Supplemental Table S4). They all contained the two ASR-specific conserved motifs, e.g. a small N-terminal consensus of 18 to 20 amino acids containing a typical stretch of six His residues, and a large C-terminal region of at least 80 amino acids containing two ABA/WDS signatures (Canel et al., 1995; Padmanabhan et al., 1997), except *ZmASR3* and *ZmASR4*, which did not possess the N-terminal His-rich domain (Fig. 1B; Supplemental Table S4). The first exon of *ZmASR3* encoded an additional domain that was not conserved in other *ZmASR* proteins. Additionally, *ZmASR7-1* presented a single nucleotide insertion in a position corresponding to amino acid 57 within the second ABA/WDS signature, leading to a frameshift and consequently to a unique and maize-specific deduced amino acid sequence at the C-terminus (Fig. 1B). With the exception of *ZmASR4* and *ZmASR5*, *ZmASR* proteins contained a sequence motif at the C-terminus (Fig. 1B and Supplemental Table S4), presenting highest identity (71 to 86%) with the Zn<sup>2+</sup>-dependent DNA-binding activity domain of the *SlASR1* protein (Rom et al., 2006). Close examination of the C-terminal extremity of *ZmASR1*, *ZmASR2* and *ZmASR3* revealed the presence of a region structurally similar to the bipartite nuclear localization signal (NLS) of *LLA23* (Fig. 1B and Supplemental Table S4; Wang et al., 2005), while 5 other *ZmASR* proteins presented only the first (A in Fig. 1B) but lacked the second motif (B in Fig. 1B).

To assess the diversity of the *ASR* gene family beyond maize, a phylogenetic tree was constructed that included the 9 maize genes and 91 related genes from representatives of different groups of Spermatophyta found in the data banks (Supplemental Fig. S1). In the case of rice we adopted the nomenclature published during the time course of this study (Philippe et al., 2010). Maximum likelihood (ML) and Bayesian reconstruction methods were congruent and confirmed the previous established division of plant ASR proteins in three distinct clades corresponding to conifer, eudicot and monocot sequences (Supplemental Fig. S1; Frankel et al., 2007). By adding all available maize sequences, we showed that within monocots, the Commelinid sequences form a monophyletic group, with Poaceae sequences falling in two distinct clades, the I-1/I-2/I-3 clade and the II-1/II-2 clade (Supplemental Fig. S1). Within the I-1/I-2/I-3 clade *ZmASR1*, *ZmASR2*, *ZmASR3* and *ZmASR4* were related to



**Figure 2. Transcript levels of *ZmASR* genes in leaf, root and kernel tissues.** (A) *ZmASR* transcript levels in different leaf sections of B73 plants grown under well-watered (control) and water deficit (deficit) conditions. L5: mature leaf 5; L6: growing leaf 6; M: middle of the 5th leaf blade. (B-E) *ZmASR* transcript levels in leaves (B-C) and roots (D-E) from 10 d-old F2 plantlets supplied in continuous light during 24 h with culture medium (control) complemented with 3.7  $\mu$ M ABA (B and D), 1% (w/v) Glc (C and E) or 7% (w/v) polyethylene glycol (PEG) 8000 (C and E). (F-G) *ZmASR* transcript levels in developing kernels from A188 (F) or MBS847 (G) plants grown under well-watered (control) and water deficit (deficit; water interruption 7 days before pollination) conditions. The light grey, grey and dark grey boxes indicate the early, filling and desiccation phases of the maize kernel, respectively. DAP: day after pollination. Quantitative RT-PCR was performed on total RNA of the indicated tissues using gene-specific primers (Supplemental Table S2). Transcript levels were normalized against the stable endogenous *ZmGRP2* gene and shown relative to *ZmASR5* transcript levels in the middle of the 5th leaf blade in control conditions. Values represent the mean of three biological replicates  $\pm$  SE.

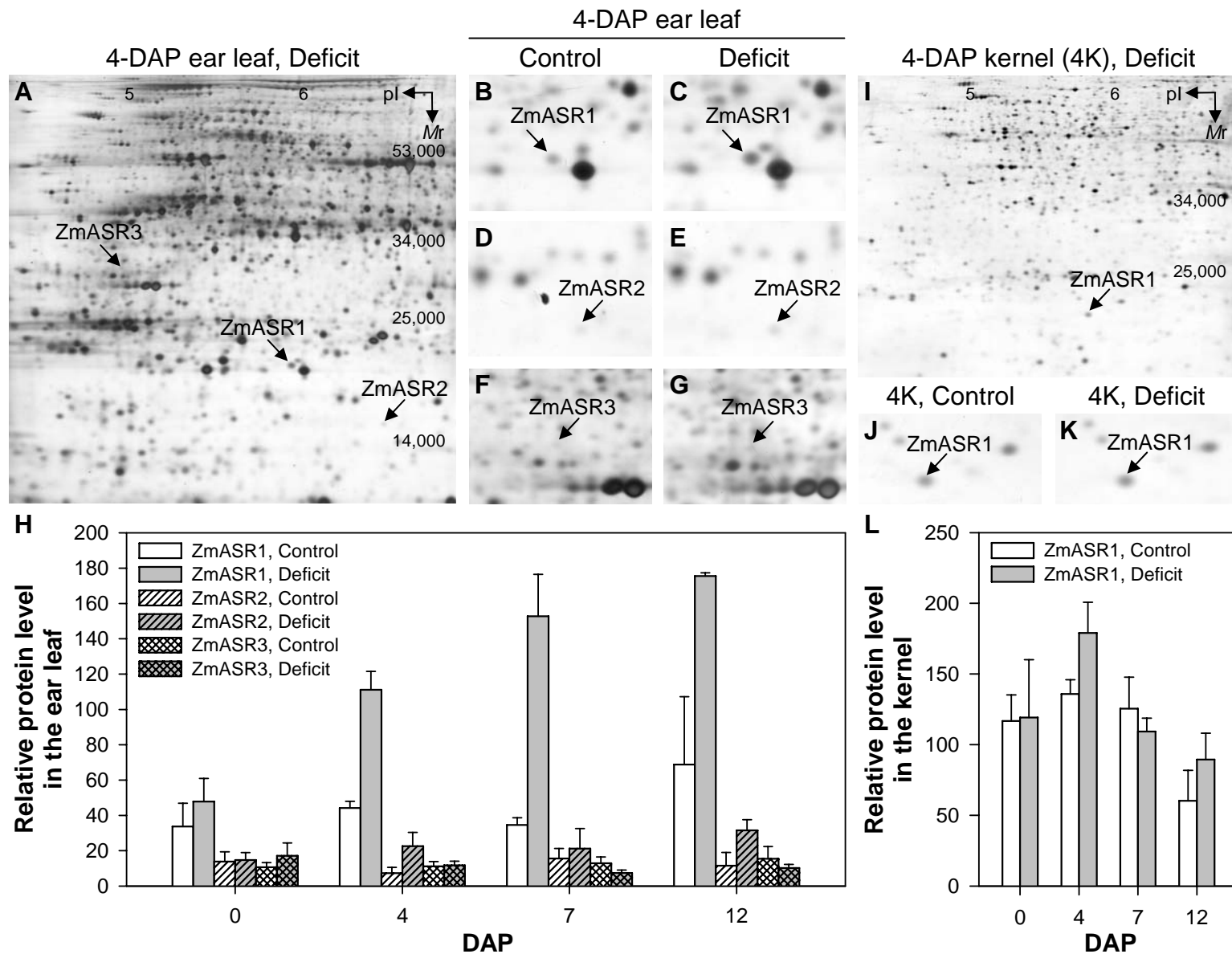
*SbASR1*, *SbASR2*, *SbASR3* and *OsASR6*, respectively (Supplemental Fig. S1). Within the II-1/II-2 clade, *ZmASR5* and *ZmASR6* were related to *SbASR5* and *SbASR4*, respectively, while *ZmASR7-1*, *ZmASR7-2* and *ZmASR7-3* appeared as three recent paralogs that were related to *SbASR7* (Supplemental Fig. S1).

### **Response of *ZmASR* transcript levels to water deficit and water stress-related treatments**

To investigate the role of the different *ZmASR* genes in the maize plant and under water stress conditions, quantitative reverse transcription (qRT)-PCR was used to monitor their transcript levels in leaf and kernel tissues at different developmental stages, the growth of both tissues being very sensitive to water deficit, and root tissue, which partly maintains growth under water deficit (Westgate and Steudle, 1985). The expression patterns of *ZmASR6*, *ZmASR7-2* and *ZmASR7-3* were not analyzed because it was not possible to design gene-specific primers of sufficient quality for qRT-PCR. The relative abundance of the other six *ZmASR* amplicons could be compared as we showed that the PCR efficiency for each gene was very similar (see the Methods section).

Under well-watered conditions, all the *ZmASR* genes tested were transcribed in leaf, kernel and root tissues (Fig. 2). In leaves, the expression of *ZmASR1* displayed a bell-shaped expression pattern (Fig. 2A) peaking at 10 cm from the leaf insertion point, e.g. beyond the growing zone, which has a constant length of 7-8 cm in maize (Tardieu et al., 2000). The transcript levels of *ZmASR3*, *ZmASR4*, *ZmASR5* and *ZmASR7-1* increased along the leaf, while the transcript levels of *ZmASR2* were rather stable along the segments from 2 to 10 cm and decreased in the mature part of the leaf (Fig. 2A). In unfertilized and fertilized caryopses, the transcript levels of *ZmASR1*, *ZmASR2* and *ZmASR3* displayed a bell-shaped expression pattern, which peaked at 0, 7 and 9 d after pollination (DAP), respectively, and remained rather stable after 12 DAP (Fig. 2F, G). The transcript levels of *ZmASR4* increased moderately during the filling stage, whereas expression of *ZmASR5* and *ZmASR7-1* peaked at 7 DAP and, after a drop at 12 DAP, remained rather stable throughout development (Fig. 2F, G). Under water deficit conditions, statistically significant transcript level increases were observed for *ZmASR1*, *ZmASR2*, *ZmASR4* and *ZmASR7-1* in leaves (Fig. 2A) and only *ZmASR4* in kernels (Fig. 2G).

For plants, the responses to water deficit include both ABA-dependent and ABA-independent pathways (Nakashima et al., 2009). Moreover, ABA induces some *ASR* genes in a range of plant species, including tomato, tobacco, grape, sugarcane and rice (Rossi et al.,



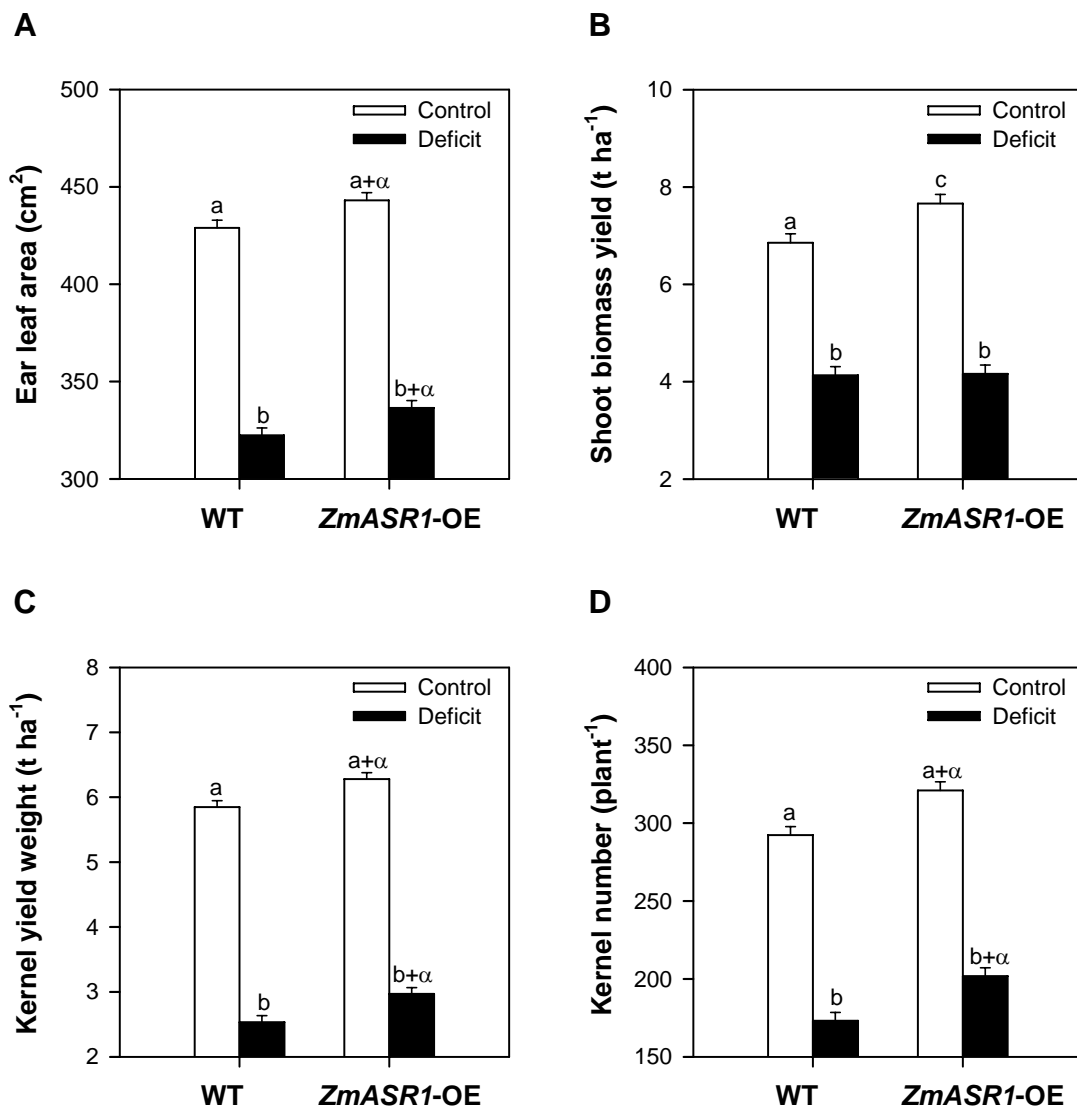
**Figure 3. Expression profile of ZmASR1, ZmASR2 and ZmASR3 proteins in ear leaf and kernel tissues.** Expression profile of ZmASR1, ZmASR2 and ZmASR3 proteins in ear leaf and kernel tissues. 2-DE gels of ZmASR1, ZmASR2 and ZmASR3 proteins extracted from 0-, 4-, 7- and 12-DAP ear leaf (150  $\mu$ g of protein per strip) or kernel (30  $\mu$ g of protein per strip) of MBS847 plants daily irrigated (control) or submitted to water deprivation (deficit) seven days before pollination. (A-G) 2-DE gel images of 4-DAP ear leaf in well-watered (B, D, F) and water deficit conditions (A, C, E, G) with the identified ZmASR1, ZmASR2 and ZmASR3 isoforms. (H) Quantification of ZmASR1, ZmASR2 and ZmASR3 isoforms in the ear leaf. (I-K) 2-DE gel images of 4-DAP kernel (4K) in well-watered (J) and water deficit conditions (I, K) with the identified ZmASR1 isoform. (L) Quantification of ZmASR1 isoform in the kernel. Values represent the mean of three biological replicates  $\pm$  SE.

1998; Sugiharto et al., 2002; Cakir et al., 2003; Takasaki et al., 2008). Sugars, such as Glc, also exhibit interactions with ABA in controlling seedling development (Rolland et al., 2006), and grape and tomato ASR proteins may be involved in Glc metabolism (Cakir et al., 2003; Frankel et al., 2007). Additionally, PEG-induced water stress increases tomato, potato and sugarcane ASR transcript levels (Amitai-Zeigerson et al., 1995; Doczi et al., 2002; Huang et al., 2000; Sugiharto et al., 2002). Therefore, we also studied *ZmASR* transcript levels in response to exogenous ABA (3.7  $\mu$ M), Glc (1%) and PEG (7%) treatments. Transcript levels of *ZmASR1*, *ZmASR2*, *ZmASR3* and *ZmASR4* were up-regulated between 4 and 18 h in control leaves and roots, while those of *ZmASR5* were slightly down-regulated after 4 h and up-regulated at 12 h in control leaves and roots, respectively (Fig. 2B and 2D). Comparatively, transcript levels of *ZmASR7-1* were up-regulated at 12 h and stable in control leaves and roots, respectively (Fig. 2B and 2D). These expression data might be due to the memory of a circadian cycle. In response to ABA treatment, we found that in leaves transcript levels of *ZmASR5* were down-regulated, while those of *ZmASR1*, *ZmASR3* and *ZmASR4* were up-regulated (Fig. 2B). In roots, up-regulation by ABA appeared a common feature to *ZmASR1*, *ZmASR2*, *ZmASR4* and *ZmASR7-1* (Fig. 2D). Supplying Glc barely altered *ZmASR1* transcript levels in leaves (Fig. 2C). In contrast, in roots, up-regulation by Glc appeared a common feature to *ZmASR1* and *ZmASR5* (Fig. 2E). This Glc response was unlikely to be due to an osmotic effect since the PEG treatment, at an equal osmotic potential, had no effect on both *ZmASR1* and *ZmASR5* expression (Fig. 2E). Nevertheless, supplying PEG decreased *ZmASR5* transcript levels in leaves as well as *ZmASR2* and *ZmASR7-1* transcript levels in roots (Fig. 2C and 2E).

### **ZmASR1 is the primary detectable ZmASR protein responding to water deficit in leaves**

Expression at the transcript level is not always reflected at the protein level, so we combined separation of soluble proteins by two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) with quantitative analysis of silver-stained gels and identification by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) to investigate the protein expression pattern of the ZmASR proteins in ear leaf and kernel tissues harvested at different DAPs from plants submitted to water deprivation 7 d before pollination. Our 2-DE condition allowed the analysis of 5 ZmASRs (*ZmASR1*, *ZmASR2*, *ZmASR3*, *ZmASR4* and *ZmASR5*), the pI of the remaining ZmASRs (*ZmASR6*, *ZmASR7-1*, *ZmASR7-2* and *ZmASR7-3*) being higher than that of the immobilized pH gradient strips used. The highly alkaline pI of *ZmASR7-1*, *ZmASR7-2* and *ZmASR7-3* (between 9.7 and 10.6) would need specific basic isoelectric



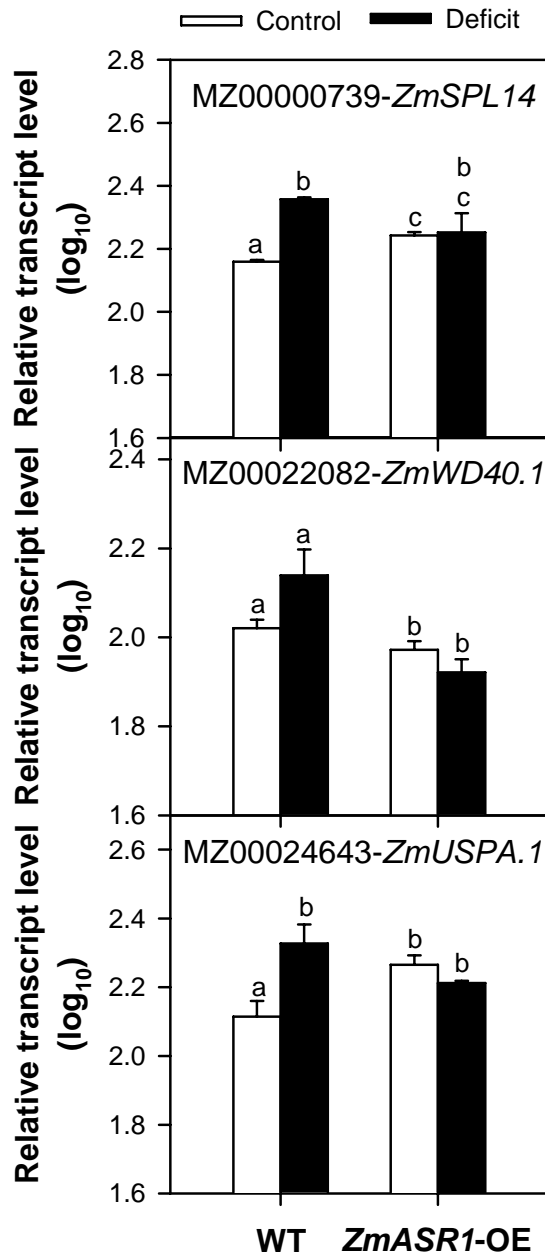


**Figure 4. *ZmASR1*-OE plants demonstrate improved vegetative and reproductive performance under water-limiting conditions.** Ear leaf area (A), shoot biomass yield (B), kernel yield weight (C) and kernel number (D) values of WT and *ZmASR1*-OE plants are shown for groupings of 9 individual *ZmASR1* events. Values are means  $\pm$  SE (n = 52 to 60). When two samples show different letters above the bar, the difference between them is significant (normal letters:  $P < 0.05$ ). When both genotype and treatment effects are significant, a, b, a+ $\alpha$  and b+ $\alpha$  are indicated (see the Methods section and Supplemental Table S5).

focusing gels that are in general not favorable to quantitative 2-DE analysis. Our 2-DE analysis revealed ZmASR1, ZmASR2 and ZmASR3 in ear leaves (Fig. 3A-G) and only ZmASR1 in kernels (Fig. 3I-K). Interestingly, ZmASR1 encoded by one of the most highly expressed *ZmASR* genes, was the most abundant detected ZmASR isoforms (Fig. 3H). Under well-watered conditions, its expression was rather stable during the early phase in kernels (Fig. 3H), paralleling the slight decrease observed at the transcript levels only after 7 DAP (Fig. 2G). Under water deficit conditions, its expression gradually increased in ear leaves (Fig. 3H), while it did not show any significant change in kernels (Fig. 3L). In contrast, ZmASR2 showed relatively moderate increase in ear leaves in response to water deficit, while ZmASR3 did not show any change (Fig. 3H). These data suggest that *ZmASR1* encodes the major ASR isoform for water stress responses in maize.

### **Ectopic expression of *ZmASR1* maintains kernel yield under water-limited conditions**

To address *ZmASR1* function, transgenic maize plants overexpressing the *ZmASR1* coding sequence (*ZmASR1*-OE) under the control of the constitutive *CsVMV* promoter (Verdaguer et al., 1998) were generated. After selection and regeneration, followed by two backcrosses with the maize line F2, 9 independent hemizygous lines that carried a unique T-DNA insertion and expressed ZmASR1 protein (data not shown), and their wild-type sister (WT) lines were selected and evaluated in a field site under well-watered and water-limited conditions (see the Methods section and Supplemental Fig. 2A-B). Quantitative RT-PCR experiments on leaves 11 (below the ear leaf) 5 d before silk emergence showed that transgenic lines expressed *ZmASR1* about 13-fold and 4-fold more than WT lines under well-watered and water-limited conditions, respectively (Supplemental Fig. S2C). An across-event analysis demonstrated that *ZmASR1*-OE plants exhibited a significant 3% and 4% increase in ear leaf area relative to WT plants under both well-watered and water-limited stress conditions, respectively, and a significant 12% increase in shoot biomass yield in well-watered conditions (Fig. 4A and 4B, Supplemental Table S5). *ZmASR1*-OE plants also demonstrated an increase ( $P < 0.10$ ) in dry leaf weight and total chlorophyll content under both well-watered and water-limited stress conditions (Supplemental Table S5). Mean yield of WT plants at the water deficit block was 2.5 tons (t) per ha, representing an approximately 43% reduction in yield compared with WT plants under well-watered conditions (Fig. 4C, Supplemental Table S5). Yield averages of *ZmASR1*-OE plants as a group were significantly greater than WT plants, by 7% and 17% under well-watered and water-limited conditions, respectively (Fig. 4C and 4D, Supplemental Table S5). Together, these results provided



**Figure 5. Transcript levels of confirmed *ZmASR1* target genes identified by microarray.** Quantitative RT-PCR was performed on total RNA prepared from the 11th leaves of WT and *ZmASR1*-OE plants that had been used for the initial microarray analysis using gene-specific primers (Supplemental Table S2). Transcript levels were normalized against the stable endogenous *ZmGRP2* gene and shown relative to *ZmBCAT2* transcript levels in the 11th leaf in well-watered (control) conditions. Values represent the mean of biological duplicates  $\pm$  SE. When two samples show different letters above the bar, the difference between them is significant (normal letters:  $P < 0.05$ ).

evidence that ectopic expression of *ZmASR1* improved and maintained maize kernel yield under well-watered and water-limited conditions in the field.

### **Transcriptomic, proteomic and metabolic adjustments in *ZmASR1*-OE plants**

To obtain additional cues with regard to *ZmASR1* function, we used the 46K array constructed by the Maize Oligonucleotide Array Project (<http://www.maizearray.org>) followed by qRT-PCR experiments, 2-DE and gas chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry (GC-TOF-MS) analysis to contrast the transcriptome, the proteome and the metabolome, respectively, of *ZmASR1*-OE leaves with that of WT leaves 5 d before silk emergence under well-watered and water deficit conditions.

A first gene list of 16 differentially expressed genes was established from the transcriptome comparison between *ZmASR1*-OE and WT leaves under both treatment conditions based on  $P < 0.01$  by two-way ANOVA analyses and the criterion of a 1.5-fold change in transcript abundance. To confirm the differential expression, qRT-PCR experiments were performed based on the same samples that had been used for the initial microarray analysis. Because it was not possible to design gene-specific primers of sufficient quality for qRT-PCR for 5 target genes, the list was shortened to 11 candidates. Only three of the 11 potential target genes were significantly affected by *ZmASR1*-OE with opposite effects: (1) up-regulation of MZ00000739 and MZ00024643 by *ZmASR1*-OE under well-watered conditions; (2) down-regulation of MZ00022082 by *ZmASR1*-OE under both well-watered and water deficit conditions (Fig. 5, Supplemental Table S2). MZ00000739 (*ZmSPL14*) likely encoded a nuclear *SQUAMOSA* (*SQUA*) promoter binding protein (SBP)-box transcription factor of the plant-specific subfamily IIa most closely related to AtSPL14 from Arabidopsis (Stone et al., 2005; Guo et al., 2008). MZ00022082 encoded a protein with unknown function carrying a WD40 repeat-like containing domain and was accordingly hereafter named *ZmWD40.1*. Finally, MZ00024643 shared highest identity with *At5g14680* (75%) and *At3g01520* (71%) sequences encoding Arabidopsis vacuolar USPA (for universal stress protein A of *Escherichia coli*) domain proteins (Kerk et al., 2003; Endler et al., 2006) and was accordingly hereafter named *ZmUSPA.1*.

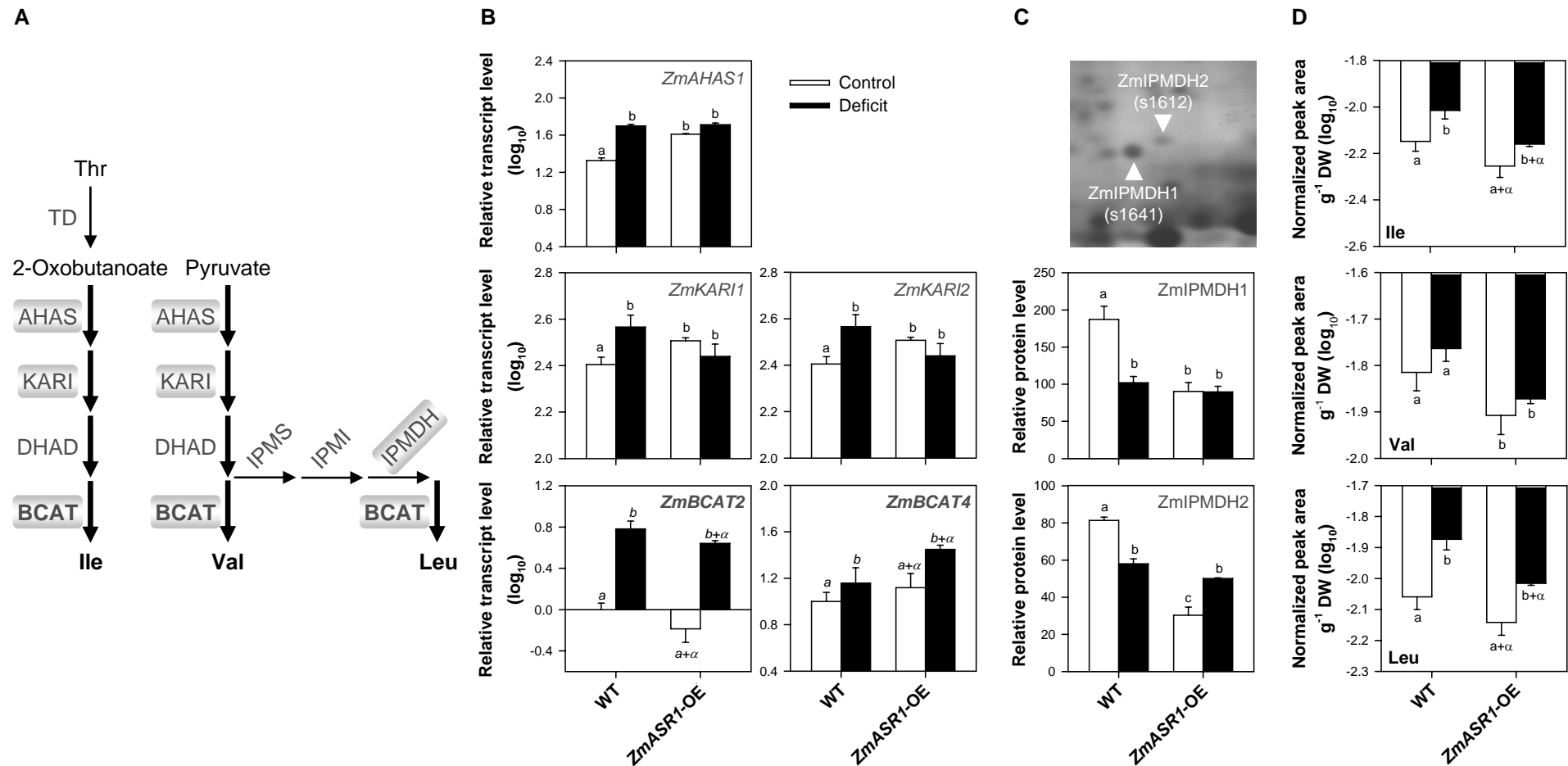
The proteome comparison revealed 22 protein spots that were consistently and significantly more abundant (7 spots) or less abundant (15 spots) in *ZmASR1*-OE leaves than in WT leaves in one or both treatment conditions (Table I). Subsequent analyses by LC-MS/MS led to the identification of 16 of them and showed that they were encoded by 15 distinct genes (Table I, Supplemental Table S6). These comprised five up-regulated proteins

annotated as class II aspartyl-tRNA synthetase,  $\beta$ -D-glucosidase, spermidine synthase 1, glucan endo-1,3- $\beta$ -glucosidase 5 and NAD-dependent epimerase/dehydratase, and 11 down-regulated proteins annotated as trigger factor-like protein, adenylosuccinate synthetase (two spots encoded by the same gene), plastid transcriptionally active 16, 3-isopropylmalate dehydrogenase (IPMDH; two isoforms, ZmIPMDH1 and ZmIPMDH2), pyruvate dehydrogenase subunit E1 $\beta$ , sedoheptulose-1,7-bisphosphatase, photosystem II stability/assembly factor, C2-domain containing protein and thiazole biosynthetic enzyme 1-1. Interestingly, none of the corresponding 15 genes generated expression data with significant *P* value thresholds in the transcriptomic analysis (data not shown).

Non-targeted metabolite profiling identified 84 unique compounds. Among them, 20 were consistently and significantly affected by *ZmASR1*-OE with opposite effects: increase in lactate and urea in water deficit conditions and decrease in 18 other metabolites, including 10 amino acids (Ile, Leu, Val, Phe, Trp, Asn, Gln, Pro, Ala and Gly), two of their derivatives or potential precursors (benzoate and citramalate) and three sugars (galactinol, Glc and Suc), in both well-watered and water deficit conditions (Table II).

### ***ZmASR1*-OE influences the expression of additional BCAA- and Pro-related target genes and a specific combination of metabolites**

Since the decrease in the three BCAAs Ile, Leu and Val was in reasonable agreement with that of the ZmIPMDH1 and ZmIPMDH2 isoforms involved in Leu biosynthesis (Fig. 6), we hypothesized that *ZmASR1* could regulate the transcription of key genes involved in drought-responsive pathways that were modified by *ZmASR1*-OE. Therefore, we identified those genes in the maize genome based on sequence homology to Arabidopsis genes and examined the expression level of 26 of them in WT and *ZmASR1*-OE leaves by qRT-PCR experiments (Fig. 6, Supplemental Fig. S3 and Table S2; The Arabidopsis Information Resource (TAIR) and AraCyc; Fang et al., 1992; Taji et al., 2002; Martin et al., 2006; Less and Galili, 2008; Urano et al., 2009). We did not find evidence for transcriptional regulation of *ZmIPMDH1* and *ZmIPMDH2/3* genes, in agreement with the transcriptomic analysis (Fig. 6). However, three other BCAA-related transcripts, one for acetohydroxyacid synthase (*ZmAHAS1*) and two for ketolacid reductoisomerase (*ZmKARI1* and *ZmKARI2*), showed a significant increase in *ZmASR1*-OE leaves in comparison with WT leaves under well-watered conditions (Fig. 6). Furthermore, one transcript for branched-chain aminotransferase (*ZmBCAT4*, BCAA biosynthesis) and two transcripts for  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate



**Figure 6. *ZmASR1*-OE influences BCAA-related gene expression and BCAA composition.** (A) The BCAA biosynthetic pathway. Substrates and products are in normal and bold text, respectively, and enzymes are in grey. The enzymes in bold are the rate-limiting enzymes during the water deficit response. Thick arrows indicate common steps in BCAA biosynthesis. Enzymes in boxes are *ZmASR1* targets. (B-D) Relative transcript (B), protein (C) and metabolite (D) levels in the 11th leaves of WT and *ZmASR1*-OE plants according to Fig. 5, Table I and Table II. Values represent the mean of biological duplicates  $\pm$  SE. When two samples show different letters above the bar, the difference between them is significant (normal letters:  $P < 0.05$ ; italic letters:  $P < 0.10$ ). When both genotype and treatment effects are significant, a, b, a+ $\alpha$  and b+ $\alpha$  are indicated (see the Methods section). AHAS, acetoxyacid synthase; BCAT, branched-chain aminotransferase; DHAD, dihydroxyacid dehydratase; IPMDH, isopropylmalate dehydrogenase; IPMI, isopropylmalate isomerase; IPMS, isopropylmalate synthase; KARI, Ketolacid reductoisomerase; TD, Thr deaminase.

synthetase (*ZmP5CS2* and *ZmP5CS3*; Pro biosynthesis) were up-regulated under both treatment conditions, while an other branched-chain aminotransferase paralog (*ZmBCAT2*) was down-regulated in *ZmASR1*-OE leaves under both treatment conditions ( $P < 0.10$ ; Fig. 6, Supplemental Fig. S3). These 7 biosynthetic genes were induced in response to water deficit, but only one, *ZmBCAT2*, had an expression pattern consistent with the metabolic changes in *ZmASR1*-OE leaves compared to WT leaves (Fig. 6).

To provide further insight into the impact of *ZmASR1*-OE on the transcriptome, proteome and metabolome of the maize leaf, a within-groups correlation matrix analysis was performed. Among 9316 pair-wise correlations computed between 30 transcripts (*ZmASR1*, *ZmSPL14*, *ZmWD40.1*, *ZmUSPA.1* and the 26 genes related to metabolic pathways modified by *ZmASR1*-OE), 22 protein spots, the total chlorophyll content and 84 metabolites, we obtained 726, 158 and 23 individual significant correlations at  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$  and  $P < 0.001$ , respectively (Supplemental Tables S7A and S7B). These numbers were nearly twice that expected under the null hypothesis (Supplemental Table S7B). Furthermore, the number of positive and negative individual significant correlations did not follow a symmetric binomial distribution (Supplemental Table S7B). Similar differences were observed for the transcript-transcript, metabolite-metabolite and transcript-metabolite submatrices, suggesting that the individual significant correlations obtained for these submatrices were most likely valuable (Supplemental Table S7B). The analysis of the metabolite-metabolite submatrix revealed that 13 of the 18 metabolites that were less abundant in *ZmASR1*-OE leaves than in WT leaves, showed high positive correlation to each other (Table III). Interestingly, 6 of them were previously reported to be negatively correlated to biomass in Arabidopsis (Table III; Meyer et al., 2007; Sulpice et al., 2009). Furthermore, 6 others showed high positive correlation with metabolites negatively correlated to biomass in Arabidopsis (Table III; Meyer et al., 2007; Sulpice et al., 2009). The analysis of the transcript-metabolite submatrix showed that *ZmASR1* target transcripts involved in BCAA biosynthesis were positively correlated with each other and/or BCAAs, and revealed a close link between 6 *ZmASR1* target transcripts (*ZmBCAT4*, *ZmKARI2*, *ZmP5CS2*, *ZmP5CS3*, *ZmUSPA.1* and *ZmWD40.1*) and the specific combination of 13 decreased metabolites (Supplemental Tables S7C and S7D).

## DISCUSSION

### Expression of ASR genes in response to water deficit in maize and other Poaceae species

Here, we identified 9 *ASR* genes in the maize genome, making the *ZmASR* gene family the biggest *ASR* gene subfamily identified to date. Phylogenetic analyses indicated several duplication events after the divergence of Liliales from Commelinids, giving rise to 5 paralogous clades of *ASR* genes in the Poaceae family. Anchoring of the *ASR* genes on the maize physical map shows that all Poaceae sequences can be assigned to one of the Poaceae ancestor protochromosomes previously defined by Salse et al. (2008). Thus, sequences from the subclades I-1, I-2, I-3, II-1 and II-2 trace back to chromosomes A11/A12, A4, A1, A2/A4 and A1, respectively. Consequently, the data support the idea that the Poaceae intermediate ancestor with 12 protochromosomes (Murat et al., 2010) had already 7 *ASR* genes. The sequence of events raising this small gene family in grasses might have taken place during the diploidisation process following the Poaceae specific whole-genome duplication (Murat et al., 2010). A larger sample of sequence data from monocots other than Poaceae might help to further elucidate this point.

Our gene-specific qRT-PCR expression data combined with 2-DE analysis and the recent work of Philippe et al. (2010) in rice strongly suggest that members of the Poaceae subclade I-1, including *ZmASR1* and *OsASR5*, are the most prevalent *ASR* proteins in major plant tissues. It is noteworthy that recently released large-scale quantitative proteomics only revealed *ZmASR1* and *ZmASR2* in maize leaves (Friso et al., 2010; Majeran et al., 2010). In  $C_4$  Poaceae, such as maize, a key component of mature leaves is the partitioning of photosynthetic processes between the bundle sheath and the mesophyll. Among the 25,800 transcripts (about 80% of the predicted maize transcriptome) that were revealed along the maize leaf gradient, Li et al. (2010) identified only 5 (*ZmASR1*, *ZmASR2*, *ZmASR3*, *ZmASR4* and *ZmASR5*) of the 9 *ZmASR* genes characterized in this study. It is striking that they all belong to the suite of genes (21%) that were determined to be differentially expressed between bundle sheath and mesophyll cells (Li et al., 2010). Thus, *ZmASR4* showed enriched expression in bundle sheath cells, in agreement with a previous work that used differential screening analysis (Furumoto et al., 2000), while *ZmASR1*, *ZmASR2*, *ZmASR3* and *ZmASR5* showed enriched expression in mesophyll cells. Such a pattern of expression suggests that the *ZmASR* gene family shows subfunctionalization. Interestingly, almost all Poaceae sequences in subclades I-1, I-2 and II-2, including *ZmASR1*, *ZmASR2*, *ZmASR3*, *ZmASR7-2* and *ZmASR7-3*, share a putative NLS and substantial sequence identity with the  $Zn^{2+}$ -dependent DNA binding activity domain of LLA23 and SlASR1 proteins, raising the interesting possibility that the *ASR* proteins belonging to these subclades act as regulators modulating gene expression.



Additionally, our transcript and protein expression data confirmed and extended findings of up-regulation by water deficit of *ZmASR1* in maize leaves (Riccardi et al., 1998, 2004). Indeed, we showed up-regulation of *ZmASR1*, *ZmASR2*, *ZmASR4* and *ZmASR7-1* by water deficit in leaves, although direct treatment with ABA in leaves induced elevation of *ZmASR1*, *ZmASR3* and *ZmASR4*. Up-regulation by water deficit and ABA treatment was previously shown for the sugarcane and rice *ZmASR1* orthologs *SoDIP22* and *OsASR5* (Sugiharto et al., 2002; Rabbani et al., 2003; Takasaki et al., 2008). These data indicate that members of the Poaceae subclade I-1, except *ZmASR2*, may play important role in ABA-dependent pathways in the water deficit response in Poaceae leaves. In contrast, *ZmASR2* and *ZmASR7-1* are regulated by ABA-independent pathways under water deficit in mature leaves, as previously reported for potato *DS2* genes (Silhavy et al., 1995; Doczi et al., 2002). It is worth noting that maize and rice (Philippe et al., 2010) *ASR* genes belonging to Poaceae subclades I-3 (*ZmASR4* and *OsASR6*) and II-2 (*ZmASR7-1* and *OsASR1*) were all up-regulated by water deficit in mature leaves. In contrast, maize and rice *ASR* genes belonging to Poaceae subclades I-2 (*ZmASR3* and *OsASR4*) and II-1 (*ZmASR5* and *OsASR3*) were not significantly altered and down-regulated by water deficit in mature leaves, respectively. Therefore, these data suggest that the *ASR* expression in response to water deficit represents an evolutionarily conserved regulatory mechanism in the Poaceae and several unrelated eudicot plants. A better understanding of the physiological roles of the maize *ASR* genes will require more exhaustive definition of their expression profiles in response to water deficit at the cellular level. It would also be important to determine whether these genes are affected by water deficit at the post-translational level.

### ***ZmASR1* maintained kernel yield under water deficit conditions through a set of low-molecular-weight metabolites related to growth rate**

*ASR* overexpression studies in plants are exemplified by works carried out on Solanoideae (Kalifa et al., 2004a; Frankel et al., 2007) and *Arabidopsis*, although the latter does not include any *ASR* homologous genes (Yang et al., 2005; Liu et al., 2010). Our study demonstrated that *ZmASR1*-OE improved kernel yield of transgenic maize in the field under well-watered and water-limited conditions. The positive yield impact of *ZmASR1* was both on kernel number and weight. These results were unexpected based on our previous PQL study, which did not reveal any QTL for maize yield and its component in the vicinity of the *ZmASR1* chromosomal region (de Vienne et al., 1999; Jeanneau et al., 2002). Nevertheless, it may be point out that recently identified QTLs for ear length under water-stressed conditions

(Lu et al., 2006) and female flowering time (Marino et al., 2009) are centered on the *ZmASRI* locus. The finding that *ZmASRI*-OE plants demonstrated significant improvements in ear leaf area and shoot biomass yield, as well as an increase in leaf dry weight and total chlorophyll content, implies that these improvements in vegetative productivity translated into improvements in reproductive performance and kernel yield. Enhanced vegetative tolerance under well-watered conditions is surprising as we would have expected no significant differences as previously described under mild water deficit conditions (Jeanneau et al., 2002). Nevertheless, transgenic maize plants overexpressing *ZmNF-YB2* were darker green and flowered 1-3 d earlier than the control plants under conditions of ample water supply (Nelson et al., 2007). Additionally, enhanced vegetative tolerance and improved kernel yield under water deficit conditions were produced by the overexpression of *ZmNF-YB2*, *betA* or *Csp* genes in maize (Quan et al., 2004; Nelson et al., 2007; Castiglioni et al., 2008). Continued evaluation of *ZmASRI*-OE across different hybrid genetic backgrounds adapted for the marketplace will be important ongoing work. Furthermore, testing the ability of other water deficit-inducible *ZmASR* genes for their ability to confer water deficit tolerance will further define the structure-function relationships and improve our understanding of the mode of action of the *ZmASR* proteins.

A noteworthy observation from our data is that 18 low-molecular-weight metabolites decrease in mature *ZmASRI*-OE leaf. Of high relevance are 12 standard or related-amino acids and three sugars: (1) Ala, which is synthesized from pyruvate; (2-3) Asn and Gln, which are the central regulators of carbon/nitrogen metabolism; (4) Gly, whose metabolism occurs by several different pathways, including Thr catabolism; (5-7) Ile (Thr-derived pathway) and the two other BCAAs, Leu and Val (pyruvate-derived pathway) that show the highest hydrophobicity among the proteinogenic amino acids and are accordingly the major constituents of transmembrane regions of membrane proteins; (8-9) Phe and Trp, whose synthesis initiates from chorismate and serve in plants as precursors for a wide range of secondary metabolites having multiple functions; (10) Pro, which is synthesized from either Glu or Orn and has multiple functions in stress adaptation, recovery and signaling; (11) benzoate, which derives from Phe and is a precursor to several important benzenoid compounds, including the defense signaling compound salicylic acid; (12) citramalate, which may serve as a precursor for Ile biosynthesis in plants similarly as in microorganisms (de Kraker et al., 2007; Joshi et al., 2010; Less et al., 2010; Szabados and Savoure, 2010); (13) Suc, which is the major end product of photosynthesis and the major transport form of carbon from source and sink; (14) its cleavage product Glc, which enhances the expression of genes

implied in carbohydrate metabolism (Koch, 1996; Trouverie et al., 2004); (15) galactinol, which plays a novel role in the protection of cellular metabolism, in particular, the photosynthesis of chloroplast, from oxidative damage caused by several types of abiotic stresses (Nishizawa et al., 2008). Our finding that *ZmASR1*-OE triggers adjustment on Glc level is in good agreement with the observation that a QTL for hexose content colocalizes with the *ZmASR1* locus (Pelleschi et al., 2006) and a previous report in potato in which tomato *SIASR1* was overexpressed (Frankel et al., 2007). Decreased levels of Phe, Pro, Val, and Suc had also been described for tobacco and potato plants overexpressing tomato *SIASR1* (Kalifa et al., 2004a; Frankel et al., 2007), although the remaining other decreased metabolites had never been identified before. Interestingly, among the 18 decreased metabolites, 13 were positively correlated to each other. Previous reports documented that biomass can be predicted by a specific metabolite status (Meyer et al., 2007; Sulpice et al., 2009). It is intriguing that among the 13 positively correlated metabolites, 6 (Ala, Phe, Val, Suc, benzoate and citramalate) were previously shown to be negatively correlated to biomass (Meyer et al., 2007; Sulpice et al., 2009). It is also noteworthy that 6 others (*trans*-aconitate, *trans*-caffeoylquinic acid, galactinol, Glc, monomethylphosphate and Pro) showed positive correlation to metabolites negatively correlated to biomass (Meyer et al., 2007; Sulpice et al., 2009). Since *ZmASR1*-OE plants demonstrated improvement and maintenance in shoot biomass yield under well-watered and water-limited conditions, respectively, as well as a decrease in this specific set of 13 metabolites under both treatment conditions, we hypothesize that *ZmASR1* might regulate the level of these 13 metabolites, which would contribute to biomass yield and subsequently result in improvements and maintenance of kernel yield under well-watered and water deficit conditions, respectively.

### **Influence of *ZmASR1* on the expression of genes involved in BCAA biosynthesis**

What is the relationship between *ZmASR1* and the level of these 13 metabolites that may impact on biomass and kernel yield? Our global comparative study led to the identification of 25 genes that were either transcriptionally (10 genes) or post-transcriptionally (15 genes) up-regulated (8 transcripts and 5 proteins) or down-regulated (2 transcripts and 11 proteins) by *ZmASR1*-OE in mature leaves. Three quarters of them encoded proteins normally localized in plastids or accumulating in these organelles under osmotic stress and involved in primary metabolic pathways. Importantly, the microarray analysis and the additional qRT-PCR experiments revealed different target genes from the proteomic analysis. Therefore the two approaches were complementary. It is quite evident that some

genes with transcript changes in *ZmASR1*-OE leaves compared with WT leaves might have not been revealed by the proteomic analysis because of their low abundance. Nevertheless, it is noteworthy that none of the identified proteins that showed substantial changes in abundance in *ZmASR1*-OE leaves compared to WT leaves were transcriptionally regulated in *ZmASR1*-OE leaves. The data therefore strengthens the idea that ZmASR1 similarly to other ASR proteins may act both as a transcriptional regulator and a chaperone-like protein protector (Saumonneau et al., 2008; Urtasun et al., 2010). A synergistic relationship was found between the osmolyte glycine betaine and the SIASR1 protein, suggesting a combined mechanism of action of these two proteins in response to abiotic stresses (Konrad and Bar-Zvi, 2008). However, the enhanced glycine betaine accumulation in transgenic *betA* overexpressing maize lines led to greater increases in total soluble sugars and free amino acids (Quan et al., 2004) in contrast to the metabolite effects we report in *ZmASR1*-OE plants. Thus, the mechanism of action of ZmASR1 is likely to be different from that of glycine betaine. Just recently, a wheat group 2 LEA protein named DHN-5 that is closely related to the maize LEA protein RAB17 and involved in salt and osmotic tolerance (Brini et al., 2007), has been shown to enhance the thermostability and activity of  $\beta$ -D-glucosidase (Brini et al., 2010), a target protein of ZmASR1. It is striking that  $\beta$ -D-glucosidase and 12 other ZmASR1 target genes belong to the list of established and potential thioredoxin (Trx) targets (Montrichard et al., 2009; He et al., 2009). Closer analysis shows that 7 additional ZmASR1 target genes may contain Cys residues involved in disulfide bridges, making a total of 20 the ZmASR1 target genes potentially linked to Trx. Thus, our results open the way to the very speculative hypothesis that ZmASR1 exhibits a chaperone-like activity on selectively redox-regulated proteins.

Among the established and potential Trx targets with expression changes in *ZmASR1*-OE plants, we found 7 genes involved in BCAA biosynthesis. A unique feature of BCAA biosynthesis, which seems to occur exclusively in plastids, is that Val and Ile are formed in two parallel pathways using the same enzymes, namely AHAS, KARI, dihydroxyacid dehydratase and BCAT, while Leu formation branches off from 2-oxoisovalerate, the last intermediates of the Val biosynthetic pathway, to follow a three-step chain elongation catalyzed by isopropylmalate synthase, isopropylmalate isomerase and IPMDH, which ends with a transamination step catalyzed by a BCAT (Binder et al., 2007; Joshi et al., 2010). Decreases in *ZmBCAT2* transcripts and ZmIPMDH1 and ZmIPMDH2 proteins in *ZmASR1*-OE leaves in comparison with WT leaves, fit well with the finding that *ZmASR1*-OE triggers significant decreases in BCAAs. Furthermore, transcript levels of *ZmAHAS1*, *ZmKAR1*,

*ZmKARI2* and *ZmBCAT4* were correlated with each other and/or the levels of the specific set of 13 decreased metabolites. Importantly, *ZmKARI1* and *ZmKARI2*, showed enriched expression in mesophyll cells in comparison with bundle sheath cells (Majeran et al., 2005; Friso et al., 2010), similarly to that was observed for *ZmASR1* (Li et al., 2010). There are contradictory reports in the literature on the distribution of *ZmIPMDH1* and *ZmIPMDH2* across mesophyll and bundle sheath chloroplasts, with a 2-fold enrichment in either mesophyll (Majeran et al., 2005) or bundle sheath (Friso et al., 2010) chloroplasts. Distribution of *ZmAHAS1*, *ZmBCAT2* and *ZmBCAT4* are as yet unavailable, although it is noteworthy that *ZmBCAT1* and *ZmBCAT3* showed enriched expression in mesophyll cells (Friso et al., 2010). Additionally, it may be noted that Arabidopsis Trx-m1 is the most effective Trx on AtIPMDH1 in comparison with Arabidopsis Trx-f1 or bacterial Trx (He et al., 2009). Its maize ortholog (Trx-m4) also showed enriched expression in mesophyll cells (Majeran et al., 2005; Friso et al., 2010). Taken together, our data demonstrate the causal relationship between the overexpression of *ZmASR1* and genes involved in BCAA biosynthesis and support the idea that the improvement in biomass associated with *ZmASR1*-OE involves the coordinated transcriptional regulation of BCAA biosynthetic genes. The resolution of the other *ZmASR1* target genes is severely hampered by the fact that only limited functional information is available on them. In this respect, a noteworthy observation is that Canas et al. (2010) have just recently shown that increasing the expression of the enzyme P5CS may have a beneficial effect on yield. Additional experiments will be required to reveal the role of the other *ZmASR1* gene targets in water deficit tolerance.

## **METHODS**

### **Plant materials and cultures**

*Stress treatments at vegetative stage.* To carry out the water deficit experiment, maize B73 plants grown in a greenhouse (period of 16 h supplemented with artificial lighting, 25/18°C (d/night) and 60/55% (d/night) relative humidity) with appropriate daily watering (50% soil water content) until the 5th leaf reached a 35-cm length (about 21 d in average), were deprived of water (water deficit stress test) or daily irrigated (50% soil water content; control condition). The 5th and 6th leaves were harvested when growth of the 6th leaf stopped ( $\leq 0.2$  cm; water deficit stress test) or after 3 d of constant leaf elongation rate (control condition), 5 to 7 h after the onset of the light period. Four-cm-long fragments of the 6th leaves and a 10-cm-long fragment in the middle of the 5th leaf blades were immediately frozen in liquid nitrogen. For ABA, Glc and PEG treatments, we used leaves and roots

described in detail by Trouverie et al. (2004). All samples were ground in a 2-mL microcentrifuge tube containing both 5 and 7 mm steel beads for two to three series of 20 s using a TissueLyser II at 20 Hz (Qiagen) and stored at -80°C until analysis.

*Stress treatment at reproductive stage.* Tissues used to establish expression profiles during maize ovule and kernel development (-5 to 70 DAP), were described in detail by Massonneau et al. (2005). To carry out the water deficit experiment, maize MBS847 plants were grown in the greenhouse as described by Qin et al. (2004). Seven d before pollination, plants were deprived of water or irrigated daily. Sampling took place at 0, 4, 7 and 12 DAP, 5 to 7 h after the onset of the light period. The ears and 10-cm-long fragments in the bottom thirds of the corresponding axillary leaves were harvested from plants subjected to each treatment. Mature ovules and kernels were collected from the central part of the ears, separated from the adhering perianth and the pedicel, and stored in liquid nitrogen. All plant materials were ground in a mortar in liquid nitrogen and stored at -80°C until analysis.

*Stress treatment and yield trial in the field.* To evaluate the *ZmASRI*-OE plants in the field under limited water-treatment, 9 independently integrated *ZmASRI*-OE events were grown at Magneraud, France, in May 2005, using two randomized block design (1 to 4 rows per event; 45 plants per row in each block, transgene-positive and transgene-negative plants in each row identified by PCR during the late vegetative stage of development). One block was maintained in a well-watered condition and the other one placed under limited water-supply using mobile devices preventing watering by rainfall (Supplemental Fig. S1A) and three sets of two Watermark probes dispatched at the top third, middle and bottom third of each block. For each location, there were two probes placed vertically in the soil, 30 and 60 cm below the surface, respectively, and connected to a datalogger allowing daily collection of soil water potential data. These data and growth stage of plants were integrated into the “grapher Watermark” software designed for a specific quality of soil, and therefore allowed the monitoring of the trial for signs of water deficit throughout the season. Consequently, the limiting-water condition was achieved at the late vegetative stage of development, e.g. from 19 d before silk emergence (Supplemental Fig. S1B-C). Among the 9 events, 3 with strongest expression of the transgene (2 to 3 rows per event in each block) were selected for further analysis. Two-cm-long fragments in the bottom third of the 11th leaves below the ear leaf were collected 57 d after sowing (5 d before silk emergence), 5 to 7 h after the onset of the light period and immediately frozen in liquid nitrogen. They were then ground in a 2-mL microcentrifuge tube containing both 5 and 7 mm steel beads for two to four series of 20 s, using a TissueLyser II at 20 Hz (Qiagen). Biological duplicates were formed by dividing each

row in two groups and pooling the three selected events, without changing the proportion of each row: samples included 46 plants in total with 14 to 18 plants per event and two to three row per event. All samples were stored at -80°C until analysis.

### **Plant transformation**

The plasmid used for the production of *ZmASR1*-OE plants contains the backbone of vector pSB12 (Komari et al., 1996), a Basta resistance cassette (rice *Actin* promoter and intron, *Bar*, *Nos* terminator) next to the right border, and the *ZmASR1* cDNA of maize MBS847 (Genbank accession number AX297905), under the control of the *CsVMV* promoter next to the left border. *Agrobacterium*-mediated transformation of maize inbred line A188 was based on a published protocol (Ishida et al., 1996). For each transformation event, the number of T-DNA insertions was evaluated by Southern blot, the integrity of the transgene was verified by PCR, and the expression level of the transgene was evaluated by RT-PCR and 2-DE as described (Depege-Fargeix et al., 2011; Jeanneau et al., 2002). Seventeen independent transformation events were crossed with the maize inbred line F2, in which the *ZmASR1* protein is not detected (Riccardi et al., 1998. Jeanneau et al., 2002). T1 events were then selected and backcrossed one more time with the maize inbred line F2. Among the 17 independently integrated T2 events, the 9 with strongest expression of the transgene compared to the endogenous *ZmASR1* gene based on 2-DE, were evaluated in the field. In the T2 generation containing 50% transgenics, the WT plants were used as control plants.

### **Database search, gene structure determination and chromosomal location of *ZmASR* genes**

To search for *ZmASR1* homologs in maize, we used the *ZmASR1* cDNA in BLAST analysis using EST assemblies in The Gene Index data base (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/plant.html>), assemblies of genomic DNA fragments at The Plant Genomics Resources ([http://blast.jcvi.org/tgi\\_maize/index.cgi](http://blast.jcvi.org/tgi_maize/index.cgi)), high-throughput genomic sequences (HTGS) from BAC clones at the National Center for Biotechnology Information (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/HTGS>) and the recently release of the maize genome sequence (<http://maizesequence.org>). The members of the maize *ASR* gene family suggested from these combined *in silico* analyses were confirmed by sequencing of amplified cDNA and genomic DNA of maize B73 plus 1 to 5 additional maize inbred lines (Mo17, F2, F252, MBS847 and/or A188). They were then mapped on the IBM or LHRF mapping panels using the REFMAP050110 (IBM\_Gnp2004) or LHRF\_Gnp2004 framework

map, respectively (Falque et al., 2005), using gene-specific primers (Table S2). Alternatively, BLAST analysis on MaizeSequence.org was used in the absence of polymorphism between the maize inbred lines that led to the IBP or LHRF mapping panels. Deduced amino acid sequences were annotated by BLAST against known ASR proteins at NCBI and query against InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan/>). The ProtParam tool (Gasteigler et al., 2005; <http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>) was also used to get the physical and chemical properties of the deduced amino acid sequences.

### **Phylogenetic analysis**

Sequence alignments were managed using BioEdit version 7.0.0 (Hall, 1999), and visually refined on the basis of the amino acid sequences. Bayesian phylogenetic analysis was carried out using MrBayes version 3.1.1 (Huelsenbeck and Ronquist, 2001) with a general time-reversible model with a proportion of invariable sites and a  $\gamma$ -distribution for site-specific rates and a partition according to the three codon positions on the four most conserved regions only (272 nucleotide alignment matrix). Three chains (two-heated) were run twice for  $10^7$  generations, with a sampling of the cold chain parameters every 100 generations and a burn-in of 25,000 samples. Convergence was followed with potential scale reduction factor and average SD of split frequencies. A majority rule consensus tree was built with posterior probabilities of nodes above  $0.85 \times 100$  indicated.

### **qRT-PCR analysis**

The total RNA isolation from maize tissues collected in the stress experiments (leaves, roots, mature ovules and kernels) with the TRIzol Reagent (Invitrogen) and ethanol precipitation was carried out as described (Trouverie et al., 2004). Subsequent DNase treatment and DNase inactivation were carried out according to the instructions of the supplier (Ambion). Two  $\mu\text{g}$  of total RNA were reverse transcribed using random hexamers (Invitrogen), 100 units of SuperScript II (Invitrogen) and 40 units of recombinant Rnasin ribonuclease inhibitor (Promega) in a final volume of 20  $\mu\text{L}$ . For expression profiles in the maize ovules and kernels, the total RNA isolation with phenol/chloroform extraction and acetic acid/ethanol precipitation, as well as subsequent DNase treatment and reverse transcription were carried out as described (Massonneau et al., 2005).

Primer sequences were designed using Primer Express 2.0 (Applied Biosystem). Subsequent qRT-PCR analysis was carried out as described (Capelle et al., 2010). The calibration step of the experiment checked for equivalent PCR efficiency of the different



genes (to allow comparison and normalization). Standard curves (log of cDNA dilution vs.  $C_t$ ) using serial 10-fold dilution of cDNA were built for each pair of selected primers, a 100% efficiency corresponding to a slope of -3.3 (Marino et al., 2003). Practically, only pairs of primers yielding a slope of  $-3.3 \pm 0.1$  were selected. The specificity of the amplification (checked by dissociation curve analysis, gel electrophoresis and sequencing of the PCR product) and the use of appropriate control genes were also assessed. Normalization of the results was achieved using the *glycine-rich RNA-binding protein 2 (ZmGRP2)* gene, the expression of which was shown to be stable in the different investigated maize lines, tissues and treatments.

### **Microarray analysis**

Total RNA was extracted using the Nucleospin 8 RNA extraction Kit (Macherey-Nagel) and *in vitro*-amplified based on suggestions from the Maize Oligonucleotide Array Project ([http://www.maizearray.org/files/cRNA\\_Target\\_Production\\_Using\\_RNA\\_Amplification.pdf](http://www.maizearray.org/files/cRNA_Target_Production_Using_RNA_Amplification.pdf)). Hybridization was carried out as described ([http://www.maizearray.org/files/Hybridization\\_Protocol\\_For\\_cRNA\\_Targets.pdf](http://www.maizearray.org/files/Hybridization_Protocol_For_cRNA_Targets.pdf)) using the 46K array constructed by the Maize Oligonucleotide Array Project. Quantile normalization of the raw data was carried out using the R version 2.4.1 software with a  $\log_{10}$  transformation of the data initially performed. The criteria for the inclusion of a gene in the list of differentially expressed genes were a 1.5-fold increase or decrease and  $P < 0.01$  by two-way ANOVA analysis. The cDNA and genomic sequences corresponding to the 70mers present on the microarray were established by BLAST of the 70mers against the HTGS database and the recently release of the maize genome sequence, and regularly updated. Deduced amino acid sequences were annotated by BLAST against the *A. thaliana* genome at NCBI and screened for known conserved domains using the CBS database.

### **Protein extraction, gel staining and 2-DE analysis**

Protein extraction with TCA/acetone precipitation was carried out as described (Mechin et al., 2007). Proteins were solubilized in UKS buffer (Mechin et al., 2007) and quantified using the 2-D Quant Kit (GE Healthcare Life Sciences). Isoelectrofocusing (IEF) was carried out using 24-cm long, pH 4-7 Immobiline Dry Strips (GE Healthcare Life Sciences) to which 50  $\mu\text{g}$  (for protein quantification; 150 and 30  $\mu\text{g}$  for ear leaf and kernel tissues, respectively) or 300  $\mu\text{g}$  (for protein identification) of dissolved protein was added.

Active rehydration and focusing were achieved at 20°C in a Protean IEF Cell (Bio-Rad) by increasing the voltage step by step from 50 to 10,000 V (13 h at 50 V, 0.5 h at 200 V, 0.5 h at 500 V, 1 h at 1,000 V, then increase at 10,000 V) and stopped when 84,000 Vh were reached. Strips were equilibrated as described (Görg et al., 1987) and sealed at the top of a 1-mm-thick 2-D gel (24 x 22 cm) with 1% (w/v) low-melting agarose in SDS electrophoresis buffer (25 mM Trizma base, 0.2 M glycine, and 0.1% (v/v) SDS). Separation of continuous gels (11% (p/v) acrylamide, 2.9% (w/v) piperazine diacrylamide) was performed at 14°C (20 V for 1 h, 140 V for 15h and 20 V for 2 h) in a Protean Plus Dodeca Cell Electrophoresis Chamber (Bio-Rad) until the bromophenol blue front reached the end of the gel. For protein quantification, a silver-staining procedure was performed as described (Mechin et al., 2003). Scanning was carried out at 300 dpi with a 16-bit grayscale pixel depth using an image scanner (Amersham Biosciences) and analyzed with Progenesis software (Nonlinear Dynamics) according to Zivny (2007). For protein identification, gels were stained in colloidal Coomassie blue according to Yan et al. (2000) and spots were excised for MS. Excised gels were re-stained with silver nitrate as described (Mechin et al., 2003) and compared with the non-excised silver stained gels.

### **LC-MS/MS and protein identification**

2-D gel spot digestion and LC-MS/MS analysis were performed as described (Page et al., 2010). A database search was performed with XTandem (version 2010.01.01.4) (<http://www.thegpm.org/TANDEM/>). Enzymatic cleavage was declared as a trypsin digestion with one possible misscleavage. Cys carboxyamidomethylation and Met oxidation were set to static and possible modifications, respectively. Precursor mass and fragment mass tolerance were 2.0 and 0.8, respectively. A refinement search was added with similar parameters, except that semi-trypsinic peptide and possible N-terminal protein acetylation were searched. The maize genome sequence (release 4a.53, 53764 entries), UniProt database restricted to *Zea mays* (<http://www.uniprot.org>, release 15.11, 43694 entries) and a contaminant database including in particular trypsin and keratins, were used. Only peptides with a E value smaller than 0.1 were reported. Identified proteins were filtered and grouped using X!Tandem pipeline (<http://pappso.inra.fr/bioinfo/xtandempipeline/>) with the following criterions: (1) a minimum of two different peptides was required with a E value smaller than 0.05; (2) a protein E value (calculated as the product of unique peptide E values) smaller than  $10^{-4}$  was required. In case of identification with only two or three MS/MS spectra, similarity between the experimental and the theoretical MS/MS spectra was visually checked. To take

redundancy into account, proteins with at least one peptide in common were grouped. This allowed grouping of proteins of similar function. Within each group, proteins with at least one specific peptide relative to other members of the group were reported as sub-groups.

### **Chlorophyll content measurement and metabolite analysis**

Total chlorophyll content was measured after extraction of leaf material into 80% acetone and assay at 663 and 645 nm as described (Arnon, 1949). GC-TOF-MS analysis was carried out as described (Noctor et al., 2007). Because automated peak integration was occasionally erroneous, integration was verified manually for each compound in all analyses.

### **Two-way ANOVA analysis and within-groups correlation matrix analysis**

A  $\log_{10}$  transformation of the data was initially performed when the standard error values showed that the standard error increased in proportion to the treatment. Either non-transformed or  $\log_{10}$ -transformed values were then used for two-way ANOVA analyses using R software version 2.8.1 (<http://cran.at.r-project.org>). The two possible means models for two-way ANOVA are the additive model and the interaction model (Scheffé, 1999; Seltman, 2010). An F-test for interactions was performed to determine whether the additive model could be retained. When the interaction model was needed, the Bonferroni method was applied for pairwise comparisons. The significance was placed at a 0.05 level.

In a multivariate anova (MANOVA) model, the within-groups correlation matrix is calculated from the correlation matrix of residuals after regressing out the influence of the fixed effects by linear regression (Hair et al., 2010). Functions of the R software were used. We were unable to test the association between two variables independently of the others because we did not have enough data to determine partial correlation coefficients. Therefore, the null hypothesis of a pair-wise correlation coefficient was evaluated by a test derived from a F-test and extended to all correlation coefficients using the Bonferroni method. The significance was placed at a 0.05 level.

### **ACKNOWLEDGMENTS**

We thank Ingrid Doridant and Carine Hécart for maize transformation and culture, Carine Remoué for help with physical mapping, the Biogemma transcriptomic team for the hybridization and analysis of microarray, and Jean Coursol for guiding us through the statistical analyses. Caroline Lelarge-Trouverie is acknowledged for preliminary metabolomic analysis on *ZmASRI-OE*.

## LITERATURE CITED

- Amitai-Zeigerson H, Scolnik PA, Bar-Zvi D** (1995) Tomato Asr1 mRNA and protein are transiently expressed following salt stress, osmotic stress and treatment with abscisic acid. *Plant Sci* **110**: 205-213
- Arcade A, Labourdette A, Falque M, Mangin B, Chardon F, Charcosset A, Joets J** (2004) BioMercator: integrating genetic maps and QTL towards discovery of candidate genes. *Bioinformatics* **20**: 2324-2326
- Arnon DI** (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol* **24**: 1-15
- Battaglia M, Olvera-Carrillo Y, Garcarrubio A, Campos F, Covarrubias AA** (2008) The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. *Plant Physiol* **148**: 6-24
- Binder S, Knill T, Schuster J** (2007) Branched-chain amino acid metabolism in higher plants. *Physiol Plant* **129**: 68-78
- Boyer JS, Westgate ME** (2004) Grain yields with limited water. *J Exp Bot* **55**: 2385-2394
- Brini F, Hanin M, Lumbreras V, Amara I, Khoudi H, Hassairi A, Pagès M, Masmoudi K** (2007) Overexpression of wheat dehydrin DHN-5 enhances tolerance to salt and osmotic stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep* **26**: 2017-2026
- Brini F, Saibi W, Amara I, Gargouri A, Masmoudi K, Hanin M** (2010) Wheat dehydrin DHN-5 exerts a heat-protective effect on  $\beta$ -glucosidase and glucose oxidase activities. *Biosci Biotechnol Biochem* **74**: 1050-1054
- Cakir B, Agasse A, Gaillard C, Saumonneau A, Delrot S, Atanassova R** (2003) A grape ASR protein involved in sugar and abscisic acid signaling. *Plant Cell* **15**: 2165-2180
- Canas R, Quilleré I, Lea PJ, Hirel B** (2010) Analysis of amino acid metabolism in the ear of maize mutants deficient in two cytosolic glutamine synthetase isoenzymes highlights the importance of asparagine for nitrogen translocation within sink organs. *Plant Biotechnol J* **8**: 966-978
- Canel C, Bailey-Serres JN, Roose ML** (1995) Pummelo fruit transcript homologous to ripening-induced genes. *Plant Physiol* **108**: 1323-1324
- Capelle V, Remoue C, Moreau L, Reyss A, Mahe A, Massonneau A, Falque M, Charcosset A, Thevenot C, Rogowsky P, Coursol S, Prioul JL** (2010) QTLs and candidate genes for desiccation and abscisic acid content in maize kernels. *BMC Plant Biol* **10**: 2

- Carrari F, Fernie AR, Iusem ND** (2004) Heard it through the grapevine? ABA and sugar cross-talk: the ASR story. *Trends Plant Sci* **9**: 57-59
- Castiglioni P, Warner D, Bensen RJ, Anstrom DC, Harrison J, Stoecker M, Abad M, Kumar G, Salvador S, D'Ordine R, Navarro S, Back S, Fernandes M, Targolli J, Dasgupta S, Bonin C, Luethy MH, Heard JE** (2008) Bacterial RNA chaperones confer abiotic stress tolerance in plants and improved grain yield in maize under water-limited conditions. *Plant Physiol* **147**: 446-455
- Ciais P, Reichstein M, Viovy N, Granier A, Ogee J, Allard V, Aubinet M, Buchmann N, Bernhofer C, Carrara A, Chevallier F, De Noblet N, Friend AD, Friedlingstein P, Grunwald T, Heinesch B, Keronen P, Knohl A, Krinner G, Loustau D, Manca G, Matteucci G, Miglietta F, Ourcival JM, Papale D, Pilegaard K, Rambal S, Seufert G, Soussana JF, Sanz MJ, Schulze ED, Vesala T, Valentini R** (2005) Europe-wide reduction in primary productivity caused by the heat and drought in 2003. *Nature* **437**: 529-533
- Claassen HC** (1970) The determination of low levels of cobalt-60 in environmental waters by liquid scintillation counting. *Anal Chim Acta* **52**: 229-235
- Damerval C, Maurice A, Josse JM, de Vienne D** (1994) Quantitative trait loci underlying gene product variation: a novel perspective for analyzing regulation of genome expression. *Genetics* **137**: 289-301
- Depege-Fargeix N, Javelle M, Chambrier P, Frangne N, Gerentes D, Perez P, Rogowsky PM, Vernoud V** (2011) Functional characterization of the HD-ZIP IV transcription factor OCL1 from maize. *J Exp Bot* **62**: 293-305
- Doczi R, Csanaki C, Banfalvi Z** (2002) Expression and promoter activity of the desiccation-specific *Solanum tuberosum* gene, *StDS2*. *Plant Cell Environ* **25**: 1197-1203
- Endler A, Meyer S, Schelbert S, Schneider T, Weschke W, Peters SW, Keller F, Baginsky S, Martinoia E, Schmidt UG** (2006) Identification of a vacuolar sucrose transporter in barley and Arabidopsis mesophyll cells by a tonoplast proteomic approach. *Plant Physiol* **141**: 196-207
- Falque M, Décousset L, Dervins D, Jacob AM, Joets J, Martinant JP, Raffoux X, Ribière N, Ridet C, Samson D, Charcosset A, Murigneux A** (2005) Linkage mapping of 1454 new maize candidate gene loci. *Genetics* **170**: 1957-1966
- Fang LY, Gross PR, Chen CH, Lillis M** (1992) Sequence of two acetohydroxyacid synthase genes from *Zea mays*. *Plant Mol Biol* **18**: 1185-1187

- Frankel N, Nunes-Nesi A, Balbo I, Mazuch J, Centeno D, Iusem ND, Fernie AR, Carrari F** (2007) *ci21A/Asr1* expression influences glucose accumulation in potato tubers. *Plant Mol Biol* **63**: 719-730
- Friso G, Majeran W, Huang M, Sun Q, van Wijk KJ** (2010) Reconstruction of metabolic pathways, protein expression, and homeostasis machineries across maize bundle sheath and mesophyll chloroplasts: large-scale quantitative proteomics using the first maize genome assembly. *Plant Physiol* **152**: 1219-1250
- Furumoto T, Hata S, Izui K** (2000) Isolation and characterization of cDNAs for differentially accumulated transcripts between mesophyll cells and bundle sheath strands of maize leaves. *Plant Cell Physiol* **41**: 1200-1209
- Garay-Arroyo A, Colmenero-Flores JM, Garcarrubio A, Covarrubias AA** (2000) Highly hydrophilic proteins in prokaryotes and eukaryotes are common during conditions of water deficit. *J Biol Chem* **275**: 5668-5674
- Gasteigler E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, GBairoch A** (2005) Protein identification and analysis tools on ExPASy Server. *In* JM Walker, ed, *The proteomics protocols handbook*. Humana press, pp 571-607
- Görg A, Postel W, Weser J, Günther S, Strahler JR, Hanash SM, Somerlot L** (1987) Elimination of point streaking on silver stained two-dimensional gels by addition of iodoacetamide to the equilibration buffer. *Electrophoresis* **8**: 122-124
- Guo AY, Zhu QH, Gu X, Ge S, Yang J, Luo J** (2008) Genome-wide identification and evolutionary analysis of the plant specific SBP-box transcription factor family. *Gene* **418**: 1-8
- Hair JF, Black WC, Anderson RE** (2010) *Multivariate data analysis (7th ed.)*. Prentice Hall, Inc.
- Hall TA** (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* **41**: 95-98
- He Y, Mawhinney TP, Preuss ML, Schroeder AC, Chen B, Abraham L, Jez JM, Chen S** (2009) A redox-active isopropylmalate dehydrogenase functions in the biosynthesis of glucosinolates and leucine in *Arabidopsis*. *Plant J* **60**: 679-690
- Huang JC, Lin SM, Wang CS** (2000) A pollen-specific and desiccation-associated transcript in *Lilium longiflorum* during development and stress. *Plant Cell Physiol* **41**: 477-485
- Huelsenbeck JP, Ronquist F** (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* **17**: 754-755

- Ishida Y, Saito H, Ohta S, Hiei Y, Komari T, Kumashiro T** (1996) High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature Biotechnol* **14**: 745-750
- Iusem ND, Bartholomew DM, Hitz WD, Scolnik PA** (1993) Tomato (*Lycopersicon esculentum*) transcript induced by water deficit and ripening. *Plant Physiol* **102**: 1353-1354
- Jeanneau M, Gerentes D, Foueillassar X, Zivy M, Vidal J, Toppan A, Perez P** (2002) Improvement of drought tolerance in maize: towards the functional validation of the *Zm-Asr1* gene and increase of water use efficiency by over-expressing C4-PEPC. *Biochimie* **84**: 1127-1135
- Joshi V, Joung JG, Fei Z, Jander G** (2010) Interdependence of threonine, methionine and isoleucine metabolism in plants: accumulation and transcriptional regulation under abiotic stress. *Amino Acids* **39**: 933-947
- Kalifa Y, Perlson A, Gilad A, Konrad Z, Scolnik PA, Bar-Zvi D** (2004a) Over-expression of the water and salt stress-regulated *Asr1* gene confers an increased salt tolerance. *Plant Cell Environ* **27**: 1459-1468
- Kalifa Y, Gilad A, Konrad Z, Zaccari M, Scolnik PA, Bar-Zvi D** (2004b) The water- and salt-stress-regulated *Asr1* (abscisic acid stress ripening) gene encodes a zinc-dependent DNA-binding protein. *Biochem J* **381**: 373-378
- Kerk D, Bulgrien J, Smith DW, Gribskov M** (2003) Arabidopsis proteins containing similarity to the universal stress protein domain of bacteria. *Plant Physiol* **131**: 1209-1219
- Koch KE** (1996) Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **47**: 509-540
- Komari T, Hiei Y, Saito H, Murai N, Kumashiro T** (1996) Vectors carrying two separate T-DNAs for co-transformation of higher plant mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and segregation of transformants free from selection markers. *Plant J* **10**: 165-174
- Konrad Z, Bar-Zvi D** (2008) Synergism between the chaperone-like activity of the stress regulated ASR1 protein and the osmolyte glycine-betaine. *Planta* **227**: 1213-1219
- de Kraker JW, Luck K, Textor S, Tokuhisa JG, Gershenzon J** (2007) Two Arabidopsis genes (*IPMS1* and *IPMS2*) encode isopropylmalate synthase, the branchpoint step in the biosynthesis of leucine. *Plant Physiol* **143**: 970-986

- Less H, Angelovici R, Tzin V, Galili G** (2010) Principal transcriptional regulation and genome-wide system interactions of the Asp-family and aromatic amino acid networks of amino acid metabolism in plants. *Amino Acids* **39**: 1023-1028
- Less H, Galili G** (2008) Principal transcriptional programs regulating plant amino acid metabolism in response to abiotic stresses. *Plant Physiol* **147**: 316-330
- Li P, Ponnala L, Gandotra N, Wang L, Si Y, Tausta SL, Kebrom TH, Provart N, Patel R, Myers CR, Reidel EJ, Turgeon R, Liu P, Sun Q, Nelson T, Brutnell TP** (2010) The developmental dynamics of the maize leaf transcriptome. *Nat Genet* **42**: 1060-1067
- Liu HY, Dai JR, Feng DR, Liu B, Wang HB, Wang JF** (2010) Characterization of a novel plantain *Asr* gene, *MpAsr*, that is regulated in response to infection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* and abiotic stresses. *J Integr Plant Biol* **52**: 315-323
- Lu G-H, Tang J-H, Yan F-B, Ma X-Q, Li J-S, Chen S-J, Ma J-C, Liu Z-X, E L-Z, Zhang Y-R, Dai J-R** (2006) Quantitative trait loci mapping of maize yield and its components under different water treatments at flowering time. *J Integr Plant Biol* **48**: 1233-1243
- Majeran W, Cai Y, Sun Q, van Wijk KJ** (2005) Functional differentiation of bundle sheath and mesophyll maize chloroplasts determined by comparative proteomics. *Plant Cell* **17**: 3111-3140
- Majeran W, Friso G, Ponnala L, Connolly B, Huang M, Reidel EJ, Zhang C, Asakura Y, Bhuiyan NH, Sun Q, Turgeon R, van Wijk KJ** (2010) Structural and metabolic transitions of C<sub>4</sub> leaf development and differentiation defined by microscopy and quantitative proteomics in maize. *Plant Cell* **22**: 3509-3542
- Marino JH, Cook P, Miller KS** (2003) Accurate and statistically verified quantification of relative mRNA abundances using SYBR Green I and real-time RT-PCR. *J Immunol Methods* **283**: 291-306
- Marino R, Ponnaiah M, Krajewski P, Frova C, Gianfranceschi L, Pe ME, Sari-Gorla M** (2009) Addressing drought tolerance in maize by transcriptional profiling and mapping. *Mol Genet Genomics* **281**: 163-179
- Martin A, Lee J, Kichey T, Gerentes D, Zivy M, Tatout C, Dubois F, Balliau T, Valot B, Davanture M, Terce-Laforgue T, Quillere I, Coque M, Gallais A, Gonzalez-Moro MB, Bethencourt L, Habash DZ, Lea PJ, Charcosset A, Perez P, Murigneux A, Sakakibara H, Edwards KJ, Hirel B** (2006) Two cytosolic glutamine synthetase



- isoforms of maize are specifically involved in the control of grain production. *Plant Cell* **18**: 3252-3274
- Maskin L, Frankel N, Gudesblat G, Demergasso MJ, Pietrasanta LI, Iusem ND** (2007) Dimerization and DNA-binding of ASR1, a small hydrophilic protein abundant in plant tissues suffering from water loss. *Biochem Biophys Res Commun* **352**: 831-835
- Maskin L, Gudesblat G, Moreno J, Carrari F, Frankel N, Sambade A, Rossi M, Iusem ND** (2001) Differential expression of the members of the *Asr* gene family in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Sci* **161**: 739-746
- Massonneau A, Condamine P, Wisniewski JP, Zivy M, Rogowsky PM** (2005) Maize cystatins respond to developmental cues, cold stress and drought. *Biochim Biophys Acta* **1729**: 186-199
- McPherson HG, Boyer J** (1977) Regulation of grain yield by photosynthesis in maize subjected to water deficiency. *Agron J* **69**: 714-178
- Mechin V, Consoli L, Le Guilloux M, Damerval C** (2003) An efficient solubilization buffer for plant proteins focused in immobilized pH gradients. *Proteomics* **3**: 1299-1302
- Mechin V, Damerval C, Zivy M** (2007) Total protein extraction with TCA-acetone. *Methods Mol Biol* **355**: 1-8
- Meyer RC, Steinfath M, Lisek J, Becher M, Witucka-Wall H, Torjek O, Fiehn O, Eckardt A, Willmitzer L, Selbig J, Altmann T** (2007) The metabolic signature related to high plant growth rate in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 4759-4764
- Montrichard F, Alkhalfioui F, Yano H, Vensel WH, Hurkman WJ, Buchanan BB** (2009) Thioredoxin targets in plants: the first 30 years. *J Proteomics* **72**: 452-474
- Murat F, Xu JH, Tannier E, Abrouk M, Guilhot N, Pont C, Messing J, Salse J** (2010) Ancestral grass karyotype reconstruction unravels new mechanisms of genome shuffling as a source of plant evolution. *Genome Res* **20**: 1545-1557
- Nakashima K, Ito Y, Yamaguchi-Shinozaki K** (2009) Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in *Arabidopsis* and grasses. *Plant Physiol* **149**: 88-95
- Nelson DE, Repetti PP, Adams TR, Creelman RA, Wu J, Warner DC, Anstrom DC, Bensen RJ, Castiglioni PP, Donnarummo MG, Hinchey BS, Kumimoto RW, Maszle DR, Canales RD, Krolkowski KA, Dotson SB, Gutterson N, Ratcliffe OJ, Heard JE** (2007) Plant nuclear factor Y (NF-Y) B subunits confer drought tolerance and lead to improved corn yields on water-limited acres. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 16450-16455

- Nishizawa A, Yabuta Y, Shigeoka S** (2008) Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. *Plant Physiol* **147**: 1251-1263
- Noctor G, Bergot G, Thominet D, Mauve C, Lelarge-Trouverie C, Prioul JL** (2007) A comparative study of amino acid analysis in leaf extracts by gas chromatography-time of flight-mass spectrometry and high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Metabolomics* **3**: 161-174
- Padmanabhan V, Dias DM, Newton RJ** (1997) Expression analysis of a gene family in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) induced by water deficit stress. *Plant Mol Biol* **35**: 801-807
- Page D, Gouble B, Valot B, Bouchet JP, Callot C, Kretschmar A, Causse M, Renard CM, Faurobert M** (2010) Protective proteins are differentially expressed in tomato genotypes differing for their tolerance to low-temperature storage. *Planta* **232**: 483-500
- Pelleschi S, Leonardi A, Rocher J-P, Cornic G, de Vienne D, Thevenot C, Prioul JL** (2006) Analysis of the relationships between growth, photosynthesis and carbohydrate metabolism using quantitative trait loci (QTLs) in young maize plants subjected to water deprivation. *Mol Breeding* **17**: 21-39
- Philippe R, Courtois B, McNally KL, Mournet P, El-Malki R, Le Paslier MC, Fabre D, Billot C, Brunel D, Glaszmann JC, This D** (2010) Structure, allelic diversity and selection of *Asr* genes, candidate for drought tolerance, in *Oryza sativa* L. and wild relatives. *Theor Appl Genet* **121**: 769-787
- Qin L, Trouverie J, Chateau-Joubert S, Simond-Côte E, Thevenot C, Prioul JL** (2004) Involvement of the *Ivr2*-invertase in the perianth during maize kernel development under water stress. *Plant Sci* **166**: 371-379
- Quan R, Shang M, Zhang H, Zhao Y, Zhang J** (2004) Engineering of enhanced glycine betaine synthesis improves drought tolerance in maize. *Plant Biotechnol J* **2**: 477-486
- Rabbani MA, Maruyama K, Abe H, Khan MA, Katsura K, Ito Y, Yoshiwara K, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2003) Monitoring expression profiles of rice genes under cold, drought, and high-salinity stresses and abscisic acid application using cDNA microarray and RNA gel-blot analyses. *Plant Physiol* **133**: 1755-1767
- Riccardi F, Gazeau P, de Vienne D, Zivy M** (1998) Protein changes in response to progressive water deficit in maize. Quantitative variation and polypeptide identification. *Plant Physiol* **117**: 1253-1263

- Riccardi F, Gazeau P, Jacquemot MP, Vincent D, Zivy M** (2004) Deciphering genetic variations of proteome responses to water deficit in maize leaves. *Plant Physiol Biochem* **42**: 1003-1011
- Rolland F, Baena-Gonzalez E, Sheen J** (2006) Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annu Rev Plant Biol* **57**: 675-709
- Rom S, Gilad A, Kalifa Y, Konrad Z, Karpasas MM, Goldgur Y, Bar-Zvi D** (2006) Mapping the DNA- and zinc-binding domains of ASR1 (abscisic acid stress ripening), an abiotic-stress regulated plant specific protein. *Biochimie* **88**: 621-628
- Romero P, Obradovic Z, Li X, Garner EC, Brown CJ, Dunker AK** (2001) Sequence complexity of disordered protein. *Proteins* **42**: 38–48
- Rossi M, Carrari F, Cabrera-Ponce JL, Vazquez-Rovere C, Herrera-Estrella L, Gudesblat G, Iusem ND** (1998) Analysis of an abscisic acid (ABA)-responsive gene promoter belonging to the *Asr* gene family from tomato in homologous and heterologous systems. *Mol Gen Genet* **258**: 1-8
- Salekdeh GH, Reynolds M, Bennett J, Boyer J** (2009) Conceptual framework for drought phenotyping during molecular breeding. *Trends Plant Sci* **14**: 488-496
- Salse J, Bolot S, Throude M, Jouffe V, Piegu B, Quraishi UM, Calcagno T, Cooke R, Delseny M, Feuillet C** (2008) Identification and characterization of shared duplications between rice and wheat provide new insight into grass genome evolution. *Plant Cell* **20**: 11-24
- Saumonneau A, Agasse A, Bidoyen MT, Lallemand M, Cantereau A, Medici A, Laloi M, Atanassova R** (2008) Interaction of grape ASR proteins with a DREB transcription factor in the nucleus. *FEBS Lett* **582**: 3281-3287
- Scheffé H** (1999) *The analysis of variance*. Wiley, John & Sons, New-York
- Schnable PS, Ware D, Fulton RS, Stein JC, Wei F, Pasternak S, Liang C, Zhang J, Fulton L, Graves TA, Minx P, Reily AD, Courtney L, Kruchowski SS, Tomlinson C, Strong C, Delehaunty K, Fronick C, Courtney B, Rock SM, Belter E, Du F, Kim K, Abbott RM, Cotton M, Levy A, Marchetto P, Ochoa K, Jackson SM, Gillam B, Chen W, Yan L, Higginbotham J, Cardenas M, Waligorski J, Applebaum E, Phelps L, Falcone J, Kanchi K, Thane T, Scimone A, Thane N, Henke J, Wang T, Ruppert J, Shah N, Rotter K, Hodges J, Ingenthron E, Cordes M, Kohlberg S, Sgro J, Delgado B, Mead K, Chinwalla A, Leonard S, Crouse K, Collura K, Kudrna D, Currie J, He R, Angelova A, Rajasekar S, Mueller T, Lomeli R, Scara G, Ko A, Delaney K, Wissotski M, Lopez G, Campos D,**

- Braidotti M, Ashley E, Golser W, Kim H, Lee S, Lin J, Dujmic Z, Kim W, Talag J, Zuccolo A, Fan C, Sebastian A, Kramer M, Spiegel L, Nascimento L, Zutavern T, Miller B, Ambroise C, Muller S, Spooner W, Narechania A, Ren L, Wei S, Kumari S, Faga B, Levy MJ, McMahan L, Van Buren P, Vaughn MW, Ying K, Yeh CT, Emrich SJ, Jia Y, Kalyanaraman A, Hsia AP, Barbazuk WB, Baucom RS, Brutnell TP, Carpita NC, Chaparro C, Chia JM, Deragon JM, Estill JC, Fu Y, Jeddelloh JA, Han Y, Lee H, Li P, Lisch DR, Liu S, Liu Z, Nagel DH, McCann MC, SanMiguel P, Myers AM, Nettleton D, Nguyen J, Penning BW, Ponnala L, Schneider KL, Schwartz DC, Sharma A, Soderlund C, Springer NM, Sun Q, Wang H, Waterman M, Westerman R, Wolfgruber TK, Yang L, Yu Y, Zhang L, Zhou S, Zhu Q, Bennetzen JL, Dawe RK, Jiang J, Jiang N, Presting GG, Wessler SR, Aluru S, Martienssen RA, Clifton SW, McCombie WR, Wing RA, Wilson RK (2009) The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics. *Science* **326**: 1112-1115**
- Schneider A, Salamini F, Gebhardt C (1997) Expression patterns and promoter activity of the cold-regulated gene *ci21A* of potato. *Plant Physiol* **113**: 335-345**
- Seltman HJ (2010) Experimental design and analysis,**  
<http://www.stat.cmu.edu/~hseltman/309/Book/Book.pdf>
- Shkolnik D, Bar-Zvi D (2008) Tomato ASR1 abrogates the response to abscisic acid and glucose in Arabidopsis by competing with ABI4 for DNA binding. *Plant Biotechnol J* **6**: 368-378**
- Silhavy D, Hutvagner G, Barta E, Banfalvi Z (1995) Isolation and characterization of a water-stress-inducible cDNA clone from *Solanum chacoense*. *Plant Mol Biol* **27**: 587-595**
- Stone JM, Liang X, Neel ER, Stiers JJ (2005) Arabidopsis AtSPL14, a plant-specific SBP-domain transcription factor, participates in plant development and sensitivity to fumonisin B1. *Plant J* **41**: 744-754**
- Sugiharto B, Ermawati N, Mori H, Aoki K, Yonekura-Sakakibara K, Yamaya T, Sugiyama T, Sakakibara H (2002) Identification and characterization of a gene encoding drought-inducible protein localizing in the bundle sheath cell of sugarcane. *Plant Cell Physiol* **43**: 350-354**
- Sulpice R, Pyl ET, Ishihara H, Trenkamp S, Steinfath M, Witucka-Wall H, Gibon Y, Usadel B, Poree F, Piques MC, Von Korff M, Steinhauser MC, Keurentjes JJ, Guenther M, Hoehne M, Selbig J, Fernie AR, Altmann T, Stitt M (2009) Starch as**

- a major integrator in the regulation of plant growth. Proc Natl Acad Sci USA **106**: 10348-10353
- Szabados L, Savoure A** (2010) Proline: a multifunctional amino acid. Trends Plant Sci **15**: 89-97
- Taji T, Ohsumi C, Iuchi S, Seki M, Kasuga M, Kobayashi M, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (2002) Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. Plant J **29**: 417-426
- Takasaki H, Mahmood T, Matsuoka M, Matsumoto H, Komatsu S** (2008) Identification and characterization of a gibberellin-regulated protein, which is ASR5, in the basal region of rice leaf sheaths. Mol Genet Genomics **279**: 359-370
- Tardieu F, Reymond M, Hamard P, Granier C, Muller B** (2000) Spatial distributions of expansion rate, cell division rate and cell size in maize leaves: a synthesis of the effects of soil water status, evaporative demand and temperature. J Exp Bot **51**: 1505-1514
- Trouverie J, Chateau-Joubert S, Thevenot C, Jacquemot MP, Prioul JL** (2004) Regulation of vacuolar invertase by abscisic acid or glucose in leaves and roots from maize plantlets. Planta **219**: 894-905
- Tuberosa R, Salvi S** (2006) Genomics-based approaches to improve drought tolerance of crops. Trends Plant Sci **11**: 405-412
- Urano K, Maruyama K, Ogata Y, Morishita Y, Takeda M, Sakurai N, Suzuki H, Saito K, Shibata D, Kobayashi M, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (2009) Characterization of the ABA-regulated global responses to dehydration in *Arabidopsis* by metabolomics. Plant J **57**: 1065-1078
- Urtasun N, Correa Garcia S, Iusem ND, Bermudez Moretti M** (2010) Predominantly cytoplasmic localization in yeast of ASR1, a non-receptor transcription factor from plants. Open Biochem J **4**: 68-71
- Vaidyanathan R, Kuruvilla S, Thomas G** (1999) Characterization and expression pattern of an abscisic acid and osmotic stress responsive gene from rice. Plant Sci **140**: 21-30
- Verdaguer N, Sevilla N, Valero ML, Stuart D, Brocchi E, Andreu D, Giralt E, Domingo E, Mateu MG, Fita I** (1998) A similar pattern of interaction for different antibodies with a major antigenic site of foot-and-mouth disease virus: implications for intratypic antigenic variation. J Virol **72**: 739-748

- de Vienne D, Leonardi A, Damerval C, Zivy M** (1999) Genetics of proteome variation for QTL characterization: application to drought-stress response in maize. *J Exp Bot* **50**: 303-309
- Wang CS, Liao YE, Huang JC, Wu TD, Su CC, Lin CH** (1998) Characterization of a desiccation-related protein in lily pollen during development and stress. *Plant Cell Physiol* **39**: 1307-1314
- Wang HJ, Hsu CM, Jauh GY, Wang CS** (2005) A lily pollen ASR protein localizes to both cytoplasm and nuclei requiring a nuclear localization signal. *Physiol Plant* **123**: 314-320
- Westgate ME, Steudle E** (1985) Water transport in the midrib tissue of maize leaves: direct measurement of the propagation of changes in cell turgor across a plant tissue. *Plant Physiol* **78**: 183-191
- Yan JX, Wait R, Berkelman T, Harry RA, Westbrook JA, Wheeler CH, Dunn MJ** (2000) A modified silver staining protocol for visualization of proteins compatible with matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization-mass spectrometry. *Electrophoresis* **21**: 3666-3672
- Yang CY, Chen YC, Jauh GY, Wang CS** (2005) A lily ASR protein involves abscisic acid signaling and confers drought and salt resistance in Arabidopsis. *Plant Physiol* **139**: 836-846
- Yang CY, Wu CH, Jauh GY, Huang JC, Lin CC, Wang CS** (2008) The LLA23 protein translocates into nuclei shortly before desiccation in developing pollen grains and regulates gene expression in Arabidopsis. *Protoplasma* **233**: 241-254
- Zivy M** (2007) Quantitative analysis of 2D gels. *Methods Mol Biol* **355**: 175-194

## **SUPPLEMENTAL DATA**

**Figure S1.** Majority rule consensus tree obtained using Bayesian interference analysis of 100 *ASR* sequences.

**Figure S2.** Stress treatment and yield trial of *ZmASR1*-OE plants.

**Figure S3.** Relative expression profile of selected genes encoding *ZmASR1* targets and/or rate-limiting enzymes in leaves 11 of *ZmASR1*-OE and WT plants.

**Table S1.** *ZmASR* gene mapping.

**Table S2.** Sequence of the primers used for mapping and qRT-PCR analyses.

**Table S3.** Sequence identity between individual *ZmASR* genes.

**Table S4.** Summary of exon lengths of various *ASR* genes from Poaceae and properties of their deduced amino acid sequences.

**Table S5.** *ZmASR1*-OE plants maintain kernel yield under water-limiting conditions.

**Table S6.** Proteins that showed significant changes in *ZmASR1*-OE leaves compared to WT leaves, their annotated function, location and quantification.

**Table S7A.** Within-groups correlation matrix.

**Table S7B.** Number of individual significant correlations for the whole matrix and its submatrices.

**Table S7C.** Pair-wise correlations of *ZmASR1* targets against BCAA-related *ZmASR1* targets.

**Table S7D.** Pair-wise correlations of *ZmASR1* target transcripts against decreased and biomass-related metabolites.

**Table I.** Proteins that showed significant changes in *ZmASRI*-OE leaves compared to WT leaves.

Spot ID <sup>a</sup>	Trend in <i>ZmASRI</i> -OE	Ratio <i>ZmASRI</i> -OE / WT <sup>b</sup>		Analysis of variance table <sup>c</sup>			Maize gene model <sup>d</sup>	Annotation <sup>e</sup>	Class
		Control	Deficit	<i>ZmASRI</i> -OE	Deficit	Interaction			
s0732	Down	0.99	0.34	NR	NR	0.007	NI	ND	ND
s1021	Up	1.30	2.22	0.020	0.752	0.071	GRMZM2G019121	Class II Aspartyl-tRNA synthetase (AspRS)	Amino acid activation
s1202	Up	2.94	1.74	0.020	0.420	0.561	GRMZM2G008247 GRMZM2G034152	$\beta$ -D-glucosidase (GLU) Flavin containing amine oxidase	Carbohydrate metabolism
s1388	Down	0.50	0.55	0.006	0.304	0.578	GRMZM2G127393	Trigger factor-like protein	Protein folding
s1406	Down	0.13	0.73	NR	NR	0.027	GRMZM2G123204 GRMZM2G020446	Adenylosuccinate synthetase (AdSS) Diaminopimelate decarboxylase	Purine biosynthesis
s1422	Down	0.42	0.98	NR	NR	0.031	GRMZM2G123204	Adenylosuccinate synthetase (AdSS)	Purine biosynthesis
s1442	Down	0.26	0.56	0.015	0.491	0.118	NI	ND	ND
s1444	Down	0.66	0.74	0.005	0.289	0.686	GRMZM2G449496	Plastid transcriptionally active 16 (PTAC16)	RNA regulation
s1612	Down	0.37	0.86	NR	NR	0.001	GRMZM2G104613 GRMZM2G803490	3-isopropylmalate dehydrogenase 2 (IPMDH2) 3-isopropylmalate dehydrogenase 1 (IPMDH1)	Leu biosynthesis
s1641	Down	0.48	0.88	NR	NR	0.026	GRMZM2G803490	3-isopropylmalate dehydrogenase 1 (IPMDH1)	Leu biosynthesis
s1886	Down	0.68	0.65	0.019	0.248	0.953	GRMZM2G097226	Pyruvate dehydrogenase subunit E1 $\beta$ (PDH-E1 $\beta$ )	Glycolysis and TCA cycle
s1904	Down	0.70	0.63	0.007	0.017	0.859	AC147602.5_FGP004	Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase (SBPase)	Calvin cycle
s1913	Down	1.14	0.68	NR	NR	0.001	GRMZM2G102838	Photosystem II stability/assembly factor (HCF136)	Protein assembly
s2020	Down	0.99	0.50	NR	NR	0.010	AC210204.3_FGP002	C2 domain containing protein	Stress
s2141	Down	0.30	0.68	0.005	0.035	0.150	NI	ND	ND
s2210	Down	0.71	0.38	0.019	0.215	0.258	GRMZM2G018375	Thiazole biosynthetic enzyme 1-1 (THI1)	Thiamine biosynthesis
s2275	Up	1.82	1.23	0.050	0.013	0.055	GRMZM2G064163	Spermidine synthase 1	Polyamine biosynthesis
s2316	Up	1.56	1.29	0.011	0.028	0.133	GRMZM2G078566	Glucan endo-1,3- $\beta$ -glucosidase 5	Carbohydrate metabolism
s2322	Up	1.75	1.34	0.005	0.436	0.108	NI	ND	ND
s2460	Down	0.82	0.63	0.035	0.023	0.112	NI	ND	ND
s2528	Up	1.54	1.21	0.020	0.778	0.244	GRMZM2G068244	NAD-dependent epimerase/dehydratase	Coenzyme binding
s3353	Up	1.85	1.32	0.020	0.306	0.170	NI	ND	ND

<sup>a</sup>Identification number of the corresponding protein spot on the 2-D reference map.

<sup>b</sup>The expression values are reported relative to the WT samples in the same culture condition (n=2).

<sup>c</sup>Proteins were categorized as *ZmASRI*-OE (light-gray box), deficit (gray box) and interaction (dark-gray box) as follows. *ZmASRI*-OE: metabolites that showed significant ( $P < 0.05$ ) changes in *ZmASRI*-OE leaves compared to WT leaves when the additive model could be retained. Deficit: metabolites that showed significant ( $P < 0.05$ ) changes under water deficit conditions compared to well-watered conditions when the additive model could be retained. Interaction: metabolites that showed significant ( $P < 0.05$ ) changes in *ZmASRI*-OE leaves compared to WT leaves by the Bonferroni method when the additive model could not be retained. Experimental details are described in Methods.

<sup>d</sup>Maize genome release 5a.59 of November 2010 (<http://www.maizesequence.org>). "NI" stands for "not identified by LC-MS/MS".

<sup>e</sup>Manually improved annotation from SwissProt, GenBank, TrEMBL and InterPro databases. Annotations in gray were eliminated based on the absence of correspondence between the theoretical *Mr* and the observed *Mr* and/or the PAI (see Supplemental Table S6). "ND" stands for "not determined".



**Table II.** Metabolites that showed significant changes in *ZmASRI*-OE leaves compared to WT leaves.

Pathway	Metabolite	Trend in <i>ZmASRI</i> -OE	Ratio <i>ZmASRI</i> -OE / WT <sup>a</sup>		Analysis of variance table <sup>b</sup>		
			Control	Deficit	<i>ZmASRI</i> -OE	Deficit	Interaction
BCAAs	Ile	Down	-0.11	-0.15	0.010	0.014	0.573
	Leu	Down	-0.08	-0.14	0.007	0.002	0.284
	Val	Down	-0.09	-0.11	0.010	0.143	0.790
Aromatic amino acids	Phe	Down	-0.06	-0.12	0.011	0.001	0.189
	Trp	Down	-0.11	-0.16	0.016	0.014	0.583
Glutamate family	Asn	Down	-0.13	-0.20	0.044	0.170	0.624
	Gln	Down	-0.07	-0.12	0.037	0.006	0.550
	Pro	Down	-0.06	-0.08	0.032	0.003	0.783
RFO	Galactinol	Down	-0.13	-0.08	0.010	0.000	0.415
Saccharides	Glc	Down	-0.17	-0.08	0.004	0.000	0.221
	Suc	Down	-0.14	-0.08	0.037	0.277	0.505
GABA shunt	Ala	Down	-0.08	-0.09	0.024	0.012	0.856
Others	<i>trans</i> -Aconitate	Down	-0.22	-0.10	0.021	0.183	0.280
	Benzoate	Down	-0.09	-0.11	0.039	0.173	0.833
	<i>trans</i> -Caffeoylquininate	Down	-0.13	-0.16	0.033	0.078	0.781
	Citramalate	Down	-0.10	-0.19	0.040	0.005	0.434
	Gly	Down	-0.11	-0.11	0.005	0.005	0.968
	Lactate	Up	0.31	1.81	NR	NR	0.045
	Monomethylphosphate	Down	-0.16	-0.21	0.004	0.020	0.551
	Urea	Up	0.37	1.23	NR	NR	0.042

<sup>a</sup>The expression values are reported relative to the WT samples (n=2).

<sup>b</sup>Metabolites were categorized as *ZmASRI*-OE (light-gray box), deficit (gray box) and interaction (dark-gray box) as follows. *ZmASRI*-OE: metabolites that showed significant ( $P < 0.05$ ) changes in *ZmASRI*-OE leaves compared to WT leaves when the additive model could be retained. Deficit: metabolites that showed significant ( $P < 0.05$ ) changes under water deficit conditions compared to well-watered conditions when the additive model could be retained. Interaction: metabolites that showed significant ( $P < 0.05$ ) changes in *ZmASRI*-OE leaves compared to WT leaves under water deficit conditions by the Bonferroni method when the additive model could not be retained. Experimental details are described in Methods.

**Table III.** Pair-wise correlations of ZmASR1 target metabolites against decreased and biomass-related metabolites.

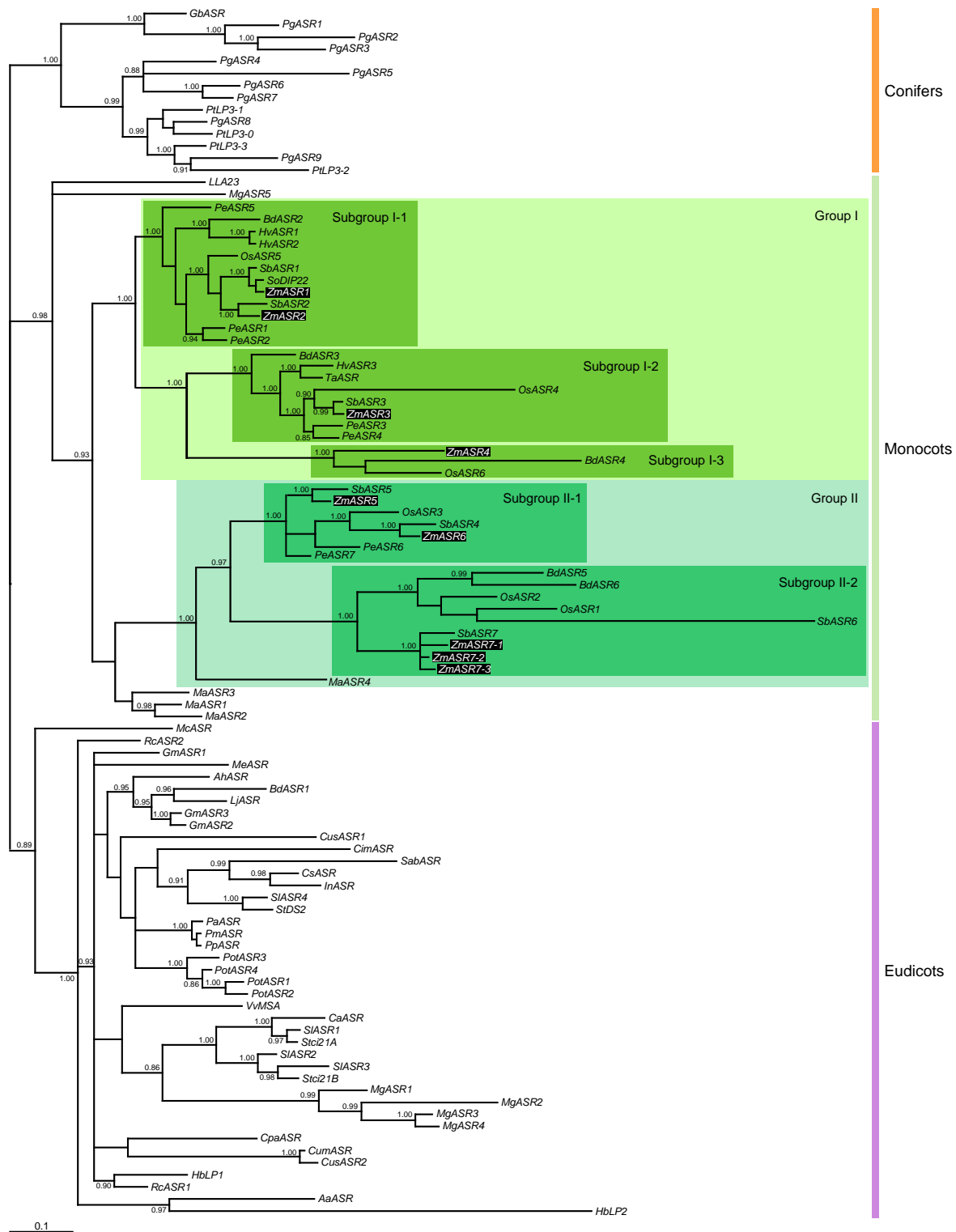
Pathway	Parameter x <sup>a</sup>	Trend in <i>ZmASR1</i> -OE	Parameter y <sup>b</sup>	corr(x,y) <sup>c</sup>
Glutamate family	Gln	Down	Leu	-0.8897
BCAAs	Leu	Down	Gln	-0.8897
	Ile	Down	Leu	0.9708
	Val	Down	Phe	0.9188
			Pro	0.9935
Aromatic amino acids	Phe	Down	Val	0.9188
			Pro	0.9319
Glutamate family	Pro	Down	Phe Val	0.9319 0.9935
RFO	Galactinol	Down	Benzoate	0.9598
			Citrate	0.9371
			Monomethylphosphate	0.8921
			Raffinose	0.8893
			Succinate	0.9280
			Threonate	0.9378
Saccharides	Glc	Down	<i>trans</i> -Aconitate	0.9409
			Ala	0.9330
			Ascorbate	0.8875
			<i>trans</i> -Caffeoylquininate	0.9264
			Citramalate	0.9457
			Malate	0.9564
			Suc	0.9006
	Suc	Down	Ascorbate	0.9692
			<i>trans</i> -Caffeoylquininate	0.9532
			Citrate	0.9587
			Ethanolamine	0.8896
			Glc	0.9006
			Malate	0.9466
			Orn	0.9113
GABA shunt	Ala	Down	<i>trans</i> -Aconitate	0.9643
			Citramalate	0.9656
			Glc	0.9330
			Malate	0.9579
Others	<i>trans</i> -Aconitate	Down	Ala	0.9643
			Citramalate	0.9669
			Glc	0.9409
			Malate	0.9118
			Raffinose	0.8973
	Benzoate	Down	Galactinol	0.9598
			Monomethylphosphate	0.8797
			Raffinose	0.8909
			Threonate	0.8848
	<i>trans</i> -Caffeoylquininate	Down	Ascorbate	0.9735
			Ethanolamine	0.9181
			Glc	0.9264
			Malate	0.8884
			Suc	0.9532

Citramalate	Down	<i>trans</i> -Aconitate	0.9669
		Ala	0.9656
		Glc	0.9457
		Malate	0.8958
Monomethylphosphate	Down	Benzoate	0.8797
		Galactinol	0.8921
		Raffinose	0.9420

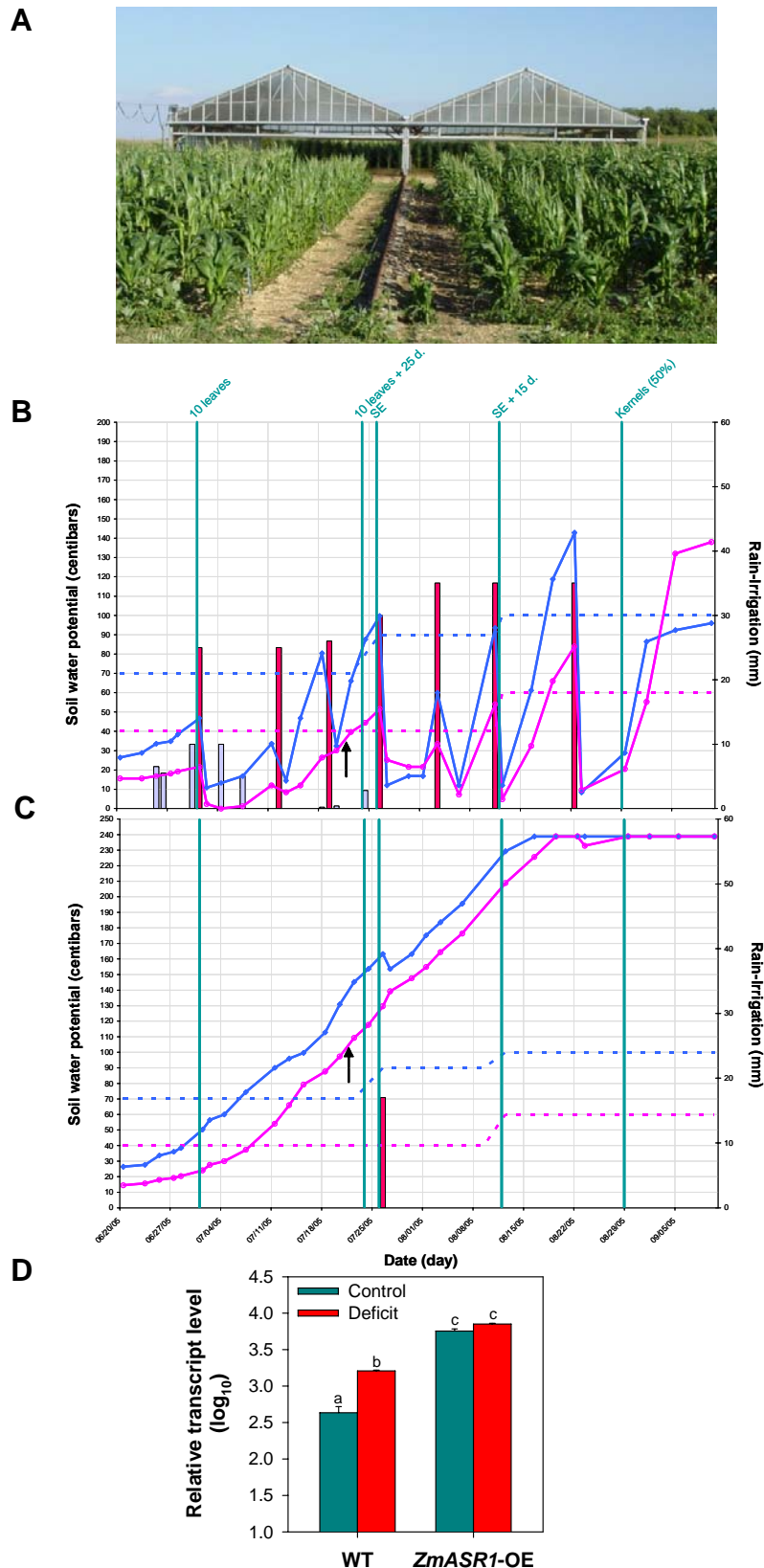
<sup>a</sup>Metabolites that showed significant changes in *ZmASR1*-OE leaves compared to WT leaves.

<sup>b</sup>Green and red distinguish metabolites negatively and positively correlated to biomass in *Arabidopsis* (Meyer et al., 2007; Sulpice et al., 2009).

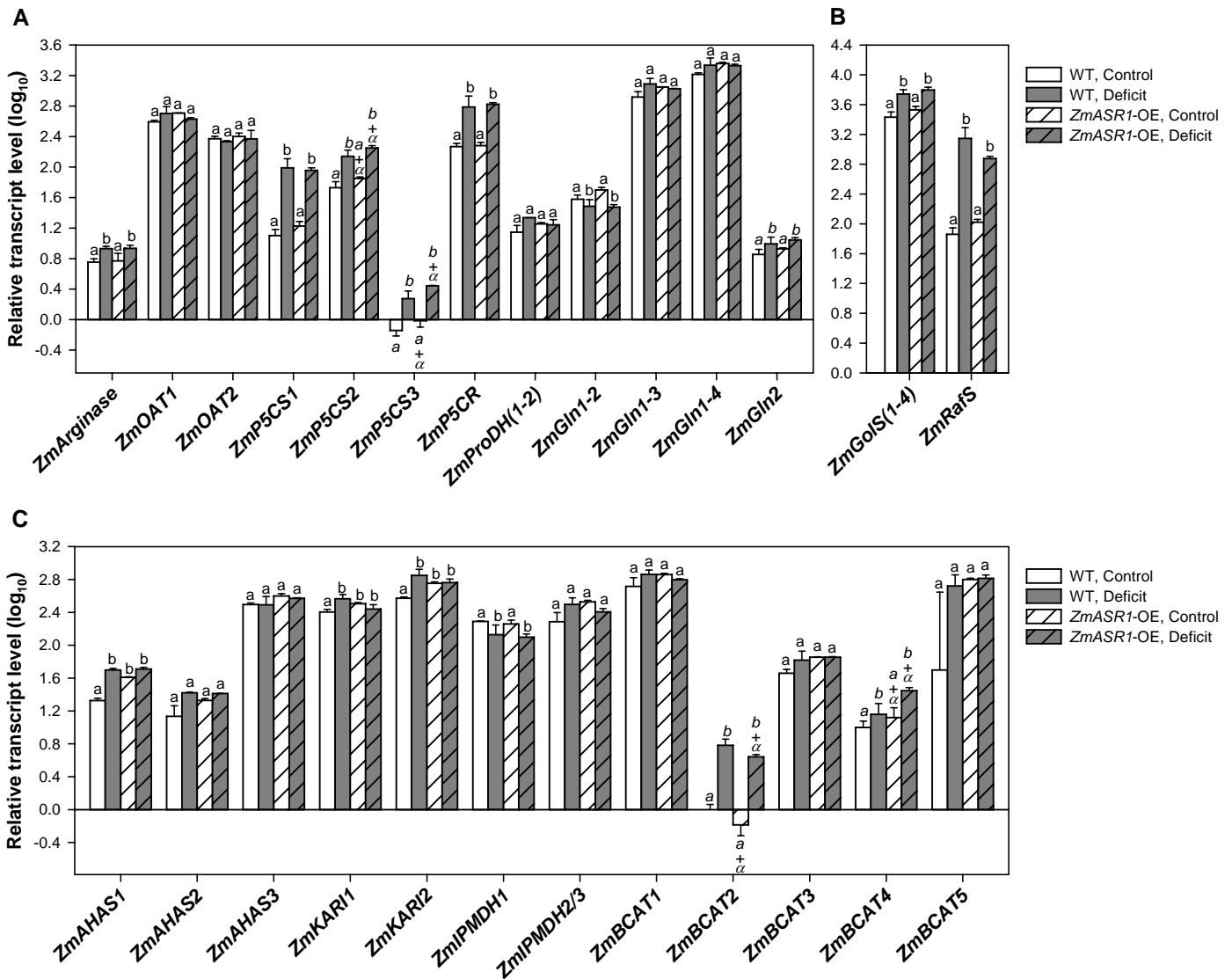
<sup>c</sup>Correlations were calculated from residual data. Green and red shading distinguish negative and positive correlations, respectively ( $P < 0.05$ ). The original data are in the Supplemental Table S7A.



**Figure S1. Majority rule consensus tree obtained using Bayesian inference analysis of 100 ASR sequences.** Analysis was performed on a 272-nucleotide matrix restricted to 4 conserved regions (posterior probabilities of nodes above 0.8 indicated; tree rooted with the conifer group). Maize accession numbers are indicated in Supplemental Table S1. Other accession numbers are as follows: for *Artemisia annua*, *AaASR* (EZ25607.1); for peanut, *AhASR* (EZ721040.1); for *Brachypodium distachyon*, *BdASR1* (Bradi5g10030.1), *BdASR2* (Bradi4g24650.1), *BdASR3* (Bradi5g10027.1), *BdASR4* (Bradi2g61590.1), *BdASR5* (Bradi2g61600.1), and *BdASR6* (Bradi2g61607.1); for cayenne pepper, *CaASR* (AY496130.1); for pomelo, *CimASR* (U18972.1); for papaya, *CpaASR* (TU.supercontig\_21.214); for *Calystegia soldanella*, *CsASR* (AB047594); for muskmelon, *CumASR* (AF426403.1); for cucumber, *CusASR1* (Cucsa.325760.1), and *CusASR2* (Cucsa.325770.1); for *Ginkgo biloba*, *GbASR* (AY461715.1); for soybean, *GmASR1* (AK285221.1), *GmASR2* (AK382827.1), and *GmASR3* (Glyma10g36890.1); for rubber tree, *HbLPI* (AY221984.1), and *HbLP2* (AY221987.1); for barley, *HvASR1* (AK252686.1), *HvASR2* (AK252200.1), and *HvASR3* (AK250239.1); for *Ipomea nil*, *InASR* (AB267819); for lotus, *LjASR* (AP004525); for lily, *LLA23* (AY101194.2) for banana, *MaASR1* (GU134749.1), *MaASR2* (GU134773.1), *MaASR3* (GU134777.1), and *MaASR4* (GU134737.1); for *Mesembryanthemum crystallinum*, *McASR* (AF054443); for cassava, *MeASR* (cassava19036); for *Mimulus guttatus*, *MgASR1* (mgf006859m), *MgASR2* (mgf007644m), *MgASR3* (mgf010714m), *MgASR4* (mgf021948m), and *MgASR5* (mgf016130m); for rice, *OsASR1* (AK063053.1), *OsASR2* (AK318549.1), *OsASR3* (AK064115.1), *OsASR4* (AK104594.1), *OsASR5* (AK119208.1), and *OsASR6* (AK060804.1); for apricot, *PaASR* (U93164.1); for bamboo moso, *PeASR1* (FP096381.1), *PeASR2* (FP097460.1), *PeASR3* (FP096151.1), *PeASR4* (FP092024.1), *PeASR5* (FP097457.1), *PeASR6* (FP097681.1), and *PeASR7* (FP093510.1); for japanese apricot, *PmASR* (AB434493.1); for white spruce, *PgASR1* (BT114797), *PgASR2* (BT102053.1), *PgASR3* (BT106573.1), *PgASR4* (BT101799.1), *PgASR5* (BT101584.1), *PgASR6* (BT087197.1), *PgASR7* (BT102413.1), *PgASR8* (BT101475.1), and *PgASR9* (BT117663.1); for poplar, *PotASR1* (XM\_002306668.1), *PotASR2* (XM\_002306669.1), *PotASR3* (XM\_002306670.1), and *PotASR4* (POPTR\_0005s21570.1); for peach, *PpASR* (AF317062); for loblolly pine, *PtLP3-0* (U67135), *PtLP3-1* (U52865), *PtLP3-2* (U59451), and *PtLP3-3* (U59424); for castor oil plant, *RcASR1* (XM\_002524251.1), and *RcASR2* (XM\_002524250.1); for *Salicornia brachiata*, *SabASR* (EU746399.1); for sorghum, *SbASR1* (Sb08g004190.1), *SbASR2* (Sb05g004100.1), *SbASR3* (Sb06g016540.1), *SbASR4* (Sb04g022220.1), *SbASR5* (Sb06g016530.1), *SbASR6* (Sb03g013810.1), and *SbASR7* (Sb03g013820.1); for tomato, *SIASR1* (DQ058745.1), *SIASR2* (AY217012.1), *SIASR3* (DQ058750.1), and *SIASR4* (DQ058762.1); for sugarcane, *SoDIP22* (AB071694.1); for potato, *Sti21A* (U76610.1), *Sti21B* (U76611.1), and *StDS2* (AJ320154); for *Triticum aestivum*, *TaASR* (AK333819.1); for grapevine, *VvMSA* (AF281656.1).



**Figure S2. Stress treatment and yield trial of *ZmASR1*-OE plants.** (A-C) The yield performance of 9 independently integrated T2 events was evaluated in the field at Magneraud, France, in May 2005, using two randomized block design. One block was maintained in a well-watered (control) condition (B) using rain and overhead irrigation, and the other one placed under limited water-supply (C) with mobile devices (A) preventing watering by rain (experimental details are described in Methods). Blue bar: rain; red bar: overhead irrigation; dashed blue line: threshold of depth (probe at 60 cm below the surface); dashed pink line: threshold of surface (probe at 30 cm below the surface); blue line: median of depth; pink line: median of surface; black arrow: harvest of leaves 11. (D) Quantitative RT-PCR experiments assessing *ZmASR1* relative expression in WT and *ZmASR1*-OE leaf samples at a developmental stage corresponding to 57 d after sowing (5 d before silk emergence) using gene-specific primers listed in Supplemental Table S2. Transcript levels were normalized against the stable endogenous *ZmGRP2* gene and shown relative to *ZmBCAT2* transcript levels in the 11th leaf in control conditions. Values represent the mean of biological duplicates  $\pm$  SE. When two samples show different letters above the bar, the difference between them is significant (normal letters:  $P < 0.05$ ).



**Figure S3. Relative expression profile of selected genes encoding *ZmASR1* targets and/or rate-limiting enzymes in leaves 11 of *ZmASR1*-OE and WT plants.** Quantitative RT-PCR experiments were carried out on cDNA prepared from WT and *ZmASR1*-OE leaf samples (pool of 3 events, 14 to 18 plants per event, 46 plants in total per sample) at a developmental stage corresponding to 57 d after sowing using gene-specific primers listed in Supplemental Table S2. Transcript levels were normalized with the values obtained for the *ZmGRP2* gene, which was used as an internal reference gene, and shown relative to *ZmBCAT2* transcript levels in leaf 11 in well-watered (control) conditions. Values represent the mean of biological duplicates  $\pm$  SE (normal letters:  $P < 0.05$ ; italic letters:  $P < 0.10$ ). AHAS, acetoxyacid synthase; BCAT, branched-chain aminotransferase; Gln1, cytosolic Gln synthetase; Gln2, plastidic Gln synthetase; GolS, galactinol synthase; IPMDH, isopropylmalate dehydrogenase; KARI, Ketolacid reductoisomerase; OAT, ornithine- $\delta$ -aminotransferase; P5CS,  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate (P5C) synthetase 1; P5CR, P5C reductase; ProDH, Pro dehydrogenase; RafS, raffinose synthase.

**Table S1.** *ZmASR* gene mapping.

Gene name	Maize gene model <sup>a</sup>	Map <sup>b</sup>	Bin	MM coord. <sup>c</sup>	Proj. coord. <sup>d</sup>	Flanking Markers <sup>e</sup>
<i>ZmASR1</i>	GRMZM2G136910	REFMAP050110	10.02-10.03	49.6	143.5	phi059-umc130
<i>ZmASR2</i>	GRMZM5G854138	Physical	2.05	354.5	354.5	csu850-csu850
<i>ZmASR3</i>	GRMZM2G044132	LHRF_Gnp2004	2.04	197.1	314.9	bnlg1175-umc255a
<i>ZmASR4</i>	GRMZM2G168552	LHRF_Gnp2004	8.05	201	404.2	umc1665-bnlg1782
<i>ZmASR5</i>	GRMZM2G052100	REFMAP050110	10.04-10.05	92	294.4	bnlg1526-umc259
<i>ZmASR6</i>	GRMZM2G057841	REFMAP050110	5.04-5.05	215.9	388.7	bnl5.71a-phi333597
<i>ZmASR7-1</i>	GRMZM2G014797	Physical	3.04	238.1	238.1	AY110403-AY110403
<i>ZmASR7-2</i>	GRMZM2G314075	Physical	3.04	238.1	238.1	AY110403-AY110403
<i>ZmASR7-3</i>	GRMZM2G383699	Physical	3.04	238.1	238.1	AY110403-AY110403

<sup>a</sup>Maize genome release 5.a.59 of November 2010 (<http://www.maizesequence.org>).

<sup>b</sup>Mapping was performed on the IBM population (REFMAP050110 map) derived from B73xMo17 crossing, except for *ZmASR3* and *ZmASR4* genes, which were mapped on the LHRF\_Gnp2004 population derived from F2xF252 crossing because of no polymorphism between B73 and Mo17, and *ZmASR7-1*, *ZmASR7-2* and *ZmASR7-3* genes, which were mapped by BLAST analysis on MaizeSequence.org because of no polymorphism between either B73 and Mo17, or F2 and F252.

<sup>c</sup>Map coordinate computed with MapMaker using “RI self Haldane” options or found on the HTGS database.

<sup>d</sup>Map coordinate on REFMAP050110 obtained by homothetic projection with BioMercator (Arcade et al. 2004).

<sup>e</sup>Proximal and distal markers.

**Table S2.** Sequence of the primers used for mapping and qRT-PCR analyses.

Gene name and/or oligo ID <sup>a</sup>	Maize gene model <sup>b</sup>	Annotation <sup>c</sup>	Class	Used for	Primer name	Amplicon size (bp)	Sequence (5'→3')
<i>ZmASR1</i> MZ00036717 MZ00042848 MZ00042852	GRMZM2G136910	ABA-, stress- and ripening induced protein 1	Transcription factor and/or chaperone-like activity	qRT-PCR	ZmASR1-F-q	95	GTCCCTCCCCGTGTGCTA
					ZmASR1-R-q		TGCATCACACGAGCGCATA
<i>ZmASR2</i>	GRMZM2G057410	ABA-, stress- and ripening induced protein 2	Transcription factor and/or chaperone-like activity	mapping	ZmASR1-F-m	179	TGTCGATCCAATTGTCACTT
					ZmASR1-R-m		CGTGTACTIONCGGCGGACTC
<i>ZmASR3</i>	GRMZM2G044132	ABA-, stress- and ripening induced protein 3	Transcription factor and/or chaperone-like activity	qRT-PCR	ZmASR7-F-q	84	CCTCTTCGGCTGACCGTAGT
					ZmASR7-R-q		AGAATTAACAGGTGTGTGGTTGTG
<i>ZmASR4</i>	GRMZM2G168552	ABA-, stress- and ripening induced protein 4	Transcription factor and/or chaperone-like activity	qRT-PCR	ZmASR5-F-q	152	ACCACCAACGACGACGAATA
					ZmASR5-R-q		CGGGAGGAGCCGTACTCT
<i>ZmASR5</i>	GRMZM2G052100	ABA-, stress- and ripening induced protein 5	Transcription factor and/or chaperone-like activity	mapping	ZmASR5-F-m	1033	CTGCAAAGCAGCAAGCTCTA
					ZmASR5-R-m		GATCAGCCGAAGAAGTGGTG
<i>ZmASR6</i>	GRMZM2G057841	ABA-, stress- and ripening induced protein 6	Transcription factor and/or chaperone-like activity	qRT-PCR	ZmASR2-F-q	109	CGGCAGGGCCATGTACTC
					ZmASR2-R-q		GTCGTCCACGTTGTGCTAGTACTC
<i>ZmASR7-1</i>	GRMZM2G014797	ABA-, stress- and ripening induced protein 7-1	Transcription factor and/or chaperone-like activity	mapping	ZmASR2-F-m	634	AGGGCCATGTACTCCAACAC
					ZmASR2-R-m		TGGGATGATCAGTCGTTTCA
<i>ZmSPL14</i> MZ00000739	GRMZM2G052100	ABA-, stress- and ripening induced protein 5	Transcription factor and/or chaperone-like activity	qRT-PCR	ZmASR3-F-q	77	CCAGTTCAGTTGTGCCATTG
					ZmASR3-R-q		GAAGAAACCGTGGTGCCTCAT
<i>ZmWD40.1</i> MZ00022082	GRMZM2G057841	ABA-, stress- and ripening induced protein 6	Transcription factor and/or chaperone-like activity	mapping	ZmASR3-F-m	292	GTAGCGACGCGTTCCTGT
					ZmASR3-R-m		GGCTCCTCCCTCAAATGCTTC
<i>ZmSPL14</i> MZ00000739	GRMZM2G169270	AtSPL14-like protein	Transcription factor	qRT-PCR	ZmASR4-F-m	400	ATGGCTGAGGAGAAGAAG
					ZmASR4-R-m		TTCTTCTGGTGGTGCTCGT
<i>ZmSPL14</i> MZ00000739	GRMZM2G014797	ABA-, stress- and ripening induced protein 7-1	Transcription factor and/or chaperone-like activity	qRT-PCR	ZmASR6-1-F-q	131	ACGAGCACCACCAGAAGAAAGA
					ZmASR6-1-R-q		GGTCGGTGCATATGTATGAACG
<i>ZmSPL14</i> MZ00000739	GRMZM2G169270	AtSPL14-like protein	Transcription factor	qRT-PCR	MZ00000739-F	84	GAGCAGAGTTGGAACATGTCATG
					MZ00000739-R		TCGACATTTTGTGCATTGCA
<i>ZmWD40.1</i> MZ00022082	GRMZM2G405690	WD40 repeat-like-containing domain protein	Unknown	qRT-PCR	MZ00022082-F	71	TTTATATCTCCAACAAGGCGTCTTT
					MZ00022082-R		TCAGCAGTTGCCAGGACAAG



<i>ZmUSPA.1</i> MZ00024643	GRMZM2G119258	USPA domain protein 1	Unknown	qRT-PCR	MZ00024643-F MZ00024643-R	64	TGAGCGAGTTCTGCGTTAAGC TCGGTAGCGTTCGGTTTTATG
<i>ZmAHAS1</i>	GRMZM2G143357	Acetohydroxyacid synthase 1	BCAA biosynthesis	qRT-PCR	ZmAHAS2-F ZmAHAS2-R	75	TTGGTATGCATGGCACAGTGTA ACCGCACACCAAATGCAA
<i>ZmAHAS2</i>	GRMZM2G007647	Acetohydroxyacid synthase 2	BCAA biosynthesis	qRT-PCR	ZmAHAS4-F ZmAHAS4-R	76	TGGTGCAACAGCCCGTTT CGGTTTTTTTTGGTAATGCCTCTA
<i>ZmAHAS3</i>	GRMZM2G077215	Acetohydroxyacid synthase 3	BCAA biosynthesis	qRT-PCR	ZmAHAS5-F ZmAHAS5-R	73	CAGACATTACACTGCGCGATTT AATGATTCCTCCAGCTCCATTC
<i>ZmKARI1</i>	GRMZM2G161868	Ketolacid reductoisomerase 1	BCAA biosynthesis	qRT-PCR	ZmKARI1-F ZmKARI1-R		TTTGTGCGACTGTTTGTAAGTCAAG CCGGGTCTCTGATAGAAGCT
<i>ZmKARI2</i>	GRMZM2G004382	Ketolacid reductoisomerase 2	BCAA biosynthesis	qRT-PCR	ZmKARI2-F ZmKARI2-R		CCGCTGATGCTGATTTTCGT CACTGCGGATCCATAACAAGCT
<i>ZmIPMDH1</i>	GRMZM2G803490	Isopropylmalate dehydrogenase 1	BCAA biosynthesis	qRT-PCR	ZmIPMDH1-F ZmIPMDH1-R	68	GCTCCGTGCCGGACTTG CATCTACCAACTGCGGCAATAC
<i>ZmIPMDH2/3</i>	GRMZM2G104613 GRMZM2G109935	Isopropylmalate dehydrogenase 2 and 3	BCAA biosynthesis	qRT-PCR	ZmIPMDH2/3-F ZmIPMDH2/3-R	68	GCAAAGTCCGGTTGGA TCTACAGTGTACAGTCTCGCAATCTG
<i>ZmBCAT1</i>	GRMZM2G071208	Branched-chain aminotransferase 1	BCAA biosynthesis	qRT-PCR	ZmBCAT1-F ZmBCAT1-R	77	TGTACACTTCACTGACGAGTCTTCAG CGGCCAACTAATTCAGTTGCA
<i>ZmBCAT2</i>	GRMZM2G153536	Branched-chain aminotransferase 2	BCAA biosynthesis	qRT-PCR	ZmBCAT2-F ZmBCAT2-R	87	CCCGAGTACACCTTCCTCATCT GTCATGCACCACCAGGTTGA
<i>ZmBCAT3</i>	GRMZM2G055899	Branched-chain aminotransferase 3	BCAA biosynthesis	qRT-PCR	ZmBCAT3-F ZmBCAT3-R	80	TCATTGAAGTTGCTCAGAGCAAA TTCATCAGCGTTAATCAACTCATCT
<i>ZmBCAT4</i>	GRMZM2G047347	Branched-chain aminotransferase 4	BCAA biosynthesis	qRT-PCR	ZmBCAT4-F ZmBCAT4-R	68	GGGTTCCGGAGCCAATGT ATAGGGTATGAGATAGGAGAGCTGCTA
<i>ZmBCAT5</i>	GRMZM2G128547	Branched-chain aminotransferase 5	BCAA biosynthesis	qRT-PCR	ZmBCAT5-F ZmBCAT5-R	83	GGAAGGTTTAGCACCAATAAATTTG TGGTCTTACACCCCCAGTAC
<i>ZmGolS(1-4)</i>	GRMZM2G120365 GRMZM2G165919 GRMZM2G131697 GRMZM2G141291	Galactinol synthase 1, 2, 3 and 4	RFO biosynthesis	qRT-PCR	ZmGolS1-4-F ZmGolS1-4-R	76	GAGGTTACGGGCAAGGA GTAGATGTCCCACCACTTGTTTAC
<i>ZmRafS</i> MZ00036333	GRMZM2G340656	Raffinose synthase	RFO biosynthesis	qRT-PCR	MZ00036333-F MZ00036333-R	86	AATTACCCTCACGCGAAGCA AAGAATCAAATCACCGACCAAGA
<i>ZmArginase</i>	GRMZM2G174671	Arginase	Pro metabolism	qRT-PCR	ZmArginase1-F ZmArginase1-R	76	CGGGACAGGGATGCTAAGC CACTGGGTACGCCCTTGGTA
<i>ZmOAT1</i>	GRMZM2G095221	Orn- $\delta$ -transferase 1	Pro metabolism	qRT-PCR	ZmOAT1-F ZmOAT1-R	75	TGGAAGTACATTCCGGTGGGAAT CCTTCGTCTCTGACCACTTTCA

<i>ZmOAT2</i>	GRMZM2G119583	Orn- $\delta$ -transferase 2	Pro metabolism	qRT-PCR	ZmOAT2-F ZmOAT2-R	65	CGCTCATCGTCTCGGAGAA CGCCGGTAGACAGTCCCTTA
<i>ZmP5CS1</i>	GRMZM2G061777	$\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase 1	Pro metabolism	qRT-PCR	ZmP5CS2-F ZmP5CS2-R	73	TTAGTGCATGTGAGATGGCTGTT CGCTCATCCGACGACAAATT
<i>ZmP5CS2</i>	GRMZM2G375504	$\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase 2	Pro metabolism	qRT-PCR	ZmP5CS1-F ZmP5CS1-R	76	CATTGAAGCCAGAAAAGATAGCAA TGGTTGATTGGGTCTTCCATATT
<i>ZmP5CS3</i>	GRMZM2G028535	$\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase 3	Pro metabolism	qRT-PCR	ZmP5CS3-F ZmP5CS3-R	73	GATCCTGCCCGTGCATTC ACAACGAGACAGGTAGGCCAAT
<i>ZmP5CR</i>	GRMZM2G068665	$\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate reductase	Pro metabolism	qRT-PCR	ZmP5CR-F ZmP5CR-R	67	CACGGCTGTCAGAAAAAAGC TCCTGCAAATCTTGCATCTTGA
<i>ZmProDH(1-2)</i>	GRMZM2G117956 GRMZM2G053720	Pro dehydrogenase 1 and 2	Pro metabolism	qRT-PCR	ZmProDH-F ZmProDH-R	92	CGAGCGTGTGCATCAAGATC CGACGGGTGCCTCTTCTG
<i>ZmGln1-2</i>	GRMZM2G024104	Cytosolic Glu synthetase 1-2	Gln biosynthesis	qRT-PCR	ZmGln1-2-F ZmGln1-2-R	65	ACCGAGAAGGAAGGCAAAGG ACGTACGGGTCCATGTTGGA
<i>ZmGln1-3</i>	GRMZM2G386046	Cytosolic Glu synthetase 1-3	Gln biosynthesis	qRT-PCR	ZmGln1-3-F ZmGln1-3-R	60	AGGGCAGTGGGAGTTCCAA CAGACCTGGTCGCCTGAAGA
<i>ZmGln1-4</i>	GRMZM2G036464	Cytosolic Glu synthetase 1-4	Gln biosynthesis	qRT-PCR	ZmGln1-4-F ZmGln1-4-R	75	TCGGACACCACAGAGAAGATCA GGCTTTGCTCCTGAGATCCAT
<i>ZmGln2</i>	GRMZM2G098290	Plastidic Glu synthetase 2	Gln biosynthesis	qRT-PCR	ZmGln2-F ZmGln2-R	73	CACTCCATTTGACCCTTGCTATT TGAAGGGCGATATGAGCAAAA
<i>ZmGRP2</i>	GRMZM2G080603	Glycine-rich RNA-binding protein 2	Nucleic acid binding	qRT-PCR	Endo1-F-ol 841 Endo1-R-ol 842	94	CACAACGCCTTCAGCACCTA AAGGTGACGAAGCCGAAGC

<sup>a</sup>Identification number of the corresponding oligonucleotide deposited on the micro-array.

<sup>b</sup>Maize genome release 5a.59 of November 2010 (<http://www.maizesequence.org>). When it was not possible to design gene-specific primers, primers commons to the genes indicated in parentheses and of sufficient quality for qRT-PCR were designed.

<sup>c</sup>Manually improved annotation from SwissProt, GenBank, TrEMBL and InterPro databases.

**Table S3.** Sequence identity between individual *ZmASR* genes.

	<i>ZmASR1</i>	<i>ZmASR2</i>	<i>ZmASR3</i>	<i>ZmASR4</i>	<i>ZmASR5</i>	<i>ZmASR6</i>	<i>ZmASR7-1</i>	<i>ZmASR7-2</i>	<i>ZmASR7-3</i>
<i>ZmASR1</i>		82 74/88	25 23/68	36 26/59	56 51/64	54 49/64	32	44	44
<i>ZmASR2</i>			25 24/31	37 28/59	56 53/61	55 54/61	33	48	47
<i>ZmASR3</i>				30 28/66	21 17/52	21 18/54	15	22	22
<i>ZmASR4</i>					32 30/46	33 28/50	23	35	35
<i>ZmASR5</i>						72 79/86	44	60	61
<i>ZmASR6</i>							41	58	57
<i>ZmASR7-1</i>								70	70
<i>ZmASR7-2</i>									97
<i>ZmASR7-3</i>									

Coding region %<sup>a</sup>Exon 1/exon 2 %<sup>b</sup><sup>a</sup>Values indicate the percentage of sequence identity at the nucleotide level in the whole coding regions of the genes.<sup>b</sup>Values indicate the percentage of sequence identity at the nucleotide level between individual exons.

**Table S4.** Summary of exon lengths of various *ASR* genes from Poaceae and properties of their deduced amino acid sequences.

Gene name	Exon 1 from ATG <sup>a</sup>	Exon 2 to STOP <sup>a</sup>	Disorder-promoting amino acids <sup>b</sup>	His-rich domain	NLS <sup>c</sup>	First Zn <sup>2+</sup> -binding site <sup>d</sup>	Zn <sup>2+</sup> -dependent DNA-binding site <sup>d</sup>	Sequence hindering DNA-binding <sup>d</sup>
<i>PeASR5</i>	NA	NA	70.3	Yes	Bipartite	59(59)	86(100)	90(100)
<i>BdASR2</i>	231	189	63.7	Yes	Bipartite	65(71)	71(100)	90(90)
<i>HvASR1</i>	129	81	59.4	Yes	Bipartite	76 (82)	ND (ND)	ND (ND)
<i>HvASR2</i>	231	186	58.7	Yes	Bipartite	76 (82)	71 (100)	90 (90)
<i>OsASR5</i>	231	186	46.8	Yes	Bipartite	76 (76)	71 (100)	90 (100)
<i>SbASR1</i>	252	186	50.7	Yes	Bipartite	82 (82)	81 (100)	90 (100)
<i>SoDIP22</i>	243	186	63.4	Yes	Bipartite	76 (76)	86 (100)	90 (100)
<i>ZmASR1</i>	231	186	62.3	Yes	Bipartite	82 (82)	86 (100)	90 (100)
<i>SbASR2</i>	216	189	49.6	Yes	Bipartite	65 (65)	86 (100)	90 (100)
<i>ZmASR2</i>	207	189	61.8	Yes	Bipartite	59 (65)	86 (100)	80 (90)
<i>PeASR1</i>	NA	NA	69.6	Yes	Bipartite	65(65)	71(100)	80(90)
<i>PeASR2</i>	NA	NA	69.3	Yes	Monopartite	53(65)	71(100)	80(90)
<i>BdASR3</i>	NA	NA	73.6	No	Bipartite	12(29)	71(100)	80(100)
<i>HvASR3</i>	609	210	65.1	No	Bipartite	5.5 (22)	71 (100)	70 (100)
<i>TaASR</i>	NA	NA	74.2	No	Bipartite	16(26)	71(100)	80(100)
<i>OsASR4</i>	459	231	47.2	No	Bipartite	11 (22)	57 (86)	80 (100)
<i>SbASR3</i>	603	207	42.4	No	Bipartite	11 (22)	71 (86)	80 (100)
<i>ZmASR3</i>	594	216	66.9	No	Bipartite	11 (22)	71 (86)	80 (100)
<i>PeASR3</i>	NA	NA	74.1	No	Bipartite	11(21)	57(86)	70(100)
<i>PeASR4</i>	NA	NA	73.0	No	Bipartite	16(26)	57(86)	70(100)
<i>ZmASR4</i>	202	206	64.4	No	No	5.8 (5.8)	28 (57)	70 (100)
<i>BdASR4</i>	414	192	65.7	No	No	11(26)	57(71)	70(100)
<i>OsASR6</i>	345	204	53.3	Yes	Monopartite	17 (17)	57 (71)	40 (50)
<i>SbASR5</i>	153	153	47.4	Yes	Monopartite	70 (82)	57 (71)	80 (90)
<i>ZmASR5</i>	162	153	61.5	Yes	Monopartite	70 (76)	57 (71)	80 (90)
<i>OsASR3</i>	159	159	51.5	Yes	Monopartite	67 (67)	57 (71)	80 (90)
<i>SbASR4</i>	171	153	52.5	Yes	Monopartite	50 (67)	71 (71)	80 (90)
<i>ZmASR6</i>	168	153	64.1	Yes	Monopartite	56 (56)	71 (86)	80 (90)
<i>PeASR6</i>	NA	NA	68.1	Yes	Monopartite	59(59)	71(86)	80(90)
<i>PeASR7</i>	NA	NA	67.0	Yes	Monopartite	59(65)	71(86)	80(90)
<i>BdASR5</i>	168	168	67.3	Yes	Monopartite	12(18)	71(71)	70(80)
<i>BdASR6</i>	NA	NA	69.8	No	Monopartite	6(12)	71(71)	50(60)
<i>OsASR2</i>	150	168	71.1	No	Monopartite	23 (35)	71 (71)	60 (70)
<i>OsASR1</i>	135	156	59.3	No	Monopartite	5.5 (5.5)	71 (71)	60 (70)
<i>SbASR6</i>	0	261	46.3	Yes	No	35 (47)	71 (71)	ND (ND)
<i>SbASR7</i>	0	306	59.4	Yes	Monopartite	23 (23)	86 (86)	70 (80)
<i>ZmASR7-1</i>	0	321	67.9	Yes	No	23 (29)	ND (ND)	ND (ND)
<i>ZmASR7-2</i>	0	309	55.9	Yes	Monopartite	23 (29)	86 (86)	70 (80)
<i>ZmASR7-3</i>	0	309	59.9	Yes	Monopartite	23 (29)	86 (86)	80 (90)

<sup>a</sup>Exon lengths (bp) of *ASR* genes from Poaceae. “NA” annotation stands for “non accessible”.

<sup>b</sup>Percentage of disorder-promoting amino acid residues according to Romero et al. (2001).

<sup>c</sup>Bipartite NLS lacking the last Lys of the A region from the LLA23 protein (Wang et al., 2005).

<sup>d</sup>Percentage of sequence identity (similarity) between various Poaceae *ASR* proteins and *SIASR1* protein (Rom et al., 2006). “ND” annotation stands for “non determined”.

**Table S5.** *ZmASR1*-OE plants maintain kernel yield under water-limited conditions.

	WT				<i>ZmASR1</i> -OE				Ratio <i>ZmASR1</i> -OE/WT		Analysis of variance table			<i>P</i> <sup>b</sup>			
	Control		Deficit		Control		Deficit		Control	Deficit			Analysis of Bonferroni method				
	Mean <sup>a</sup>	SE <sup>a</sup>	Mean <sup>a</sup>	SE <sup>a</sup>	Mean <sup>a</sup>	SE <sup>a</sup>	Mean <sup>a</sup>	SE <sup>a</sup>			<i>ZmASR1</i> -OE	Deficit	Interaction	Pair tested	Difference	Lower	Upper
Total chlorophyll content (mg g <sup>-1</sup> FW)	1,6	0,08	1,16	0,07	1,77	0,16	1,4	0	1,11	1,21	0,0634	0,0057	0,749	NR	NR	NR	NR
Dry leaf weight (g g <sup>-1</sup> FW)	0,2	0,01	0,19	0,01	0,23	0,03	0,24	0,01	1,15	1,26	0,058	0,8139	0,6197	NR	NR	NR	NR
Ear leaf area (cm <sup>2</sup> )	428,94	3,99	322,37	3,87	443,03	4,04	336,46	3,83	1,03	1,04	0,002	<2.2E-16	0,222	NR	NR	NR	NR
Shoot biomass (g plant <sup>-1</sup> )	85,68	2,31	51,66	2,24	95,77	2,31	52,05	2,2	1,12	1,01	NR	NR	0,0336	<i>ZmASR1</i> -OE.Deficit - <i>ZmASR1</i> -OE.Control	-43,72	-52,22	-35,22
														<i>ZmASR1</i> -OE.Deficit - WT.Control	-33,63	-42,13	-25,13
														<i>ZmASR1</i> -OE.Control - WT.Deficit	44,11	35,53	52,68
														<i>ZmASR1</i> -OE.Control - WT.Control	10,08	1,39	18,78
														WT.Deficit - WT.Control	-34,02	-42,60	-25,45
Shoot biomass yield (t/ha)	6,85	0,18	4,13	0,18	7,66	0,18	4,16	0,18	1,12	1,01	NR	NR	0,0336	<i>ZmASR1</i> -OE.Deficit - <i>ZmASR1</i> -OE.Control	-34,97	-41,77	-28,17
														<i>ZmASR1</i> -OE.Deficit - WT.Control	-26,91	-33,71	-20,11
														<i>ZmASR1</i> -OE.Control - WT.Deficit	35,28	28,42	42,14
														<i>ZmASR1</i> -OE.Control - WT.Control	8,07	1,11	15,02
														WT.Deficit - WT.Control	-27,22	-34,08	-20,36
Kernel weight (g plant <sup>-1</sup> )	85,9	1,43	37,09	1,39	92,13	1,42	43,32	1,378	1,07	1,17	0,0002	<2.2E-16	0,4648	NR	NR	NR	NR
Dry kernel yield (t ha <sup>-1</sup> )	5,85	0,1	2,54	0,1	6,28	0,1	2,97	0,1	1,07	1,17	0,0002	<2.2E-16	0,6435	NR	NR	NR	NR
Kernel number (plant <sup>-1</sup> )	292,28	5,56	173,09	5,45	321	5,56	201,81	5,39	1,10	1,17	9,80E-06	<2.2E-16	0,4993	NR	NR	NR	NR
Harvest index (%)	50,1	0,89	42,37	0,87	49,58	0,89	45,11	0,85	0,99	1,06	NR	NR	0,0649	<i>ZmASR1</i> -OE.Deficit - <i>ZmASR1</i> -OE.Control	-4,46	-7,76	-1,17
														<i>ZmASR1</i> -OE.Deficit - WT.Control	-4,99	-8,28	-1,69
														<i>ZmASR1</i> -OE.Control - WT.Deficit	7,21	3,88	10,53
														WT.Deficit - WT.Control	-7,73	-11,05	-4,40

<sup>a</sup>Mean and SE values of WT and *ZmASR1*-OE plants.

<sup>b</sup>Field physiology and yield performance measurements were categorized as *ZmASR1*-OE (light-gray box), deficit (gray box) and interaction (dark-gray box) as follows. *ZmASR1*-OE: measurements that showed significant ( $P < 0.05$ ) changes in *ZmASR1*-OE plants compared to WT plants when the additive model could be retained. Deficit: measurements that showed significant ( $P < 0.05$ ) changes under water deficit conditions compared to well-watered conditions when the additive model could be retained. Interaction: measurements that showed significant ( $P < 0.05$ ) changes in *ZmASR1*-OE plants compared to WT plants by the Bonferroni method when the additive model could not be retained. Experimental details are described in Methods. NR: not relevant.

**Table S6.** Proteins that showed significant changes in *ZmASR1*-OE leaves compared to WT leaves, their annotated function, location and quantification.

Spot ID <sup>a</sup>	Maize gene model <sup>b</sup>	Annotation <sup>c</sup>	Location <sup>d</sup>	<i>Mr</i> (10 <sup>3</sup> ) <sup>e</sup>	<i>pl</i> <sup>e</sup>	<i>Mr</i> (10 <sup>3</sup> ) <sup>f</sup>	<i>pl</i> <sup>f</sup>	Spectre match no.	Peptide match no.	PAI <sup>g</sup>	WT				<i>ZmASR1</i> -OE			
											Control		Deficit		Control		Deficit	
											Mean <sup>h</sup>	SE <sup>h</sup>	Mean <sup>h</sup>	SE <sup>h</sup>	Mean <sup>h</sup>	SE <sup>h</sup>	Mean <sup>h</sup>	SE <sup>h</sup>
s0732	NI	ND	ND	ND	ND	66.5	4.9	ND	ND	ND	204.06	1.81	527.55	ND	202.41	14.4	178.24	38.96
s1021	GRMZM2G019121	Class II Aspartyl-tRNA synthetase (AspRS)	Cytoplasm, plastid	58.7	6.8	60.0	6.4	7	6	0.27	104.24	7.555	78.12	0.335	135.03	25.34	173.63	0.96
s1202	GRMZM2G008247	$\beta$ -D-glucosidase (GLU)	Plastid	58.6	6.0	56.1	5.8	19	16	0.91	35.05	17.075	61.08	16.29	102.89	21.43	106.30	16.045
	GRMZM2G034152	Flavin containing amine oxidase		52.0	5.6	56.1	5.8	3	3	0.14								
s1388	GRMZM2G127393	Trigger factor-like protein	Plastid stroma	52.1	5.0	52.3	4.8	8	8	0.28	134.36	0.545	111.12	24.735	67.15	1.695	60.68	12.445
s1406	GRMZM2G123204	Adenylosuccinate synthetase (AdSS)	Plastid stroma	48.9	5.9	51.6	5.8	4	4	0.18	122.75	18.84	50.29	18.925	15.56	1.09	36.64	5.305
	GRMZM2G020446	Diaminopimelate decarboxylase		48.4	6.1	51.6	5.8	2	2	0.09								
s1422	GRMZM2G123204	Adenylosuccinate synthetase (AdSS)	Plastid stroma	48.9	5.9	51.3	6.1	8	7	0.36	311.28	35.235	131.56	33.695	131.28	0.615	129.24	24.585
s1442	NI	ND	ND	ND	ND	50.8	5.9	ND	ND	ND	66.79	11.69	44.62	7.335	17.19	1.465	25.17	6.105
s1444	GRMZM2G449496	Plastid transcriptionally active 16 (PTAC16)	Plastid nucleoid	49.5	5.1	50.7	5.9	16	15	0.73	292.34	8.19	305.67	12.74	194.21	18.995	225.32	32.905
s1612	GRMZM2G104613	3-isopropylmalate dehydrogenase 2 (IPMDH2)	Plastid stroma	39.3	5.0	47.2	4.9	5	5	0.31	81.35	1.765	57.95	2.735	30.36	4.285	50.07	0.325
	GRMZM2G803490	3-isopropylmalate dehydrogenase 1 (IPMDH1)		39.1	5.0	46.5	4.8	2	2	0.13								
s1641	GRMZM2G803490	3-isopropylmalate dehydrogenase 1 (IPMDH1)	Plastid stroma	39.1	5.0	46.5	4.8	3	3	0.20	187.14	17.83	101.93	8.55	90.32	11.95	89.56	7.73
s1886	GRMZM2G097226	Pyruvate dehydrogenase subunit E1 $\beta$ (PDH-E1 $\beta$ )	Mitochondria	37.3	5.1	40.6	5.0	7	5	0.70	144.21	19.12	125.94	21.39	98.18	5.06	81.78	5.285
s1904	AC147602.5_FGP004	Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase (SBPase)	Plastid stroma	37.7	5.5	40.2	4.7	19	15	0.95	996.16	86.8	752.43	33.985	693.40	109.79	477.21	18.56
s1913	GRMZM2G102838	Photosystem II stability/assembly factor, HCF136 type (HCF-136)	Thylakoid-peripheral-lumenal-side	40.2	6.0	40.0	5.3	21	17	1.05	663.49	11.265	813.33	39.005	754.16	6.42	552.43	1.985
s2020	AC210204.3_FGP002	C2 domain containing protein	ND	32.7	5.1	37.8	4.9	7	7	0.88	93.49	2.655	103.23	5.81	92.72	2.47	52.00	8.74
s2141	NI	ND	ND	ND	ND	35.0	4.8	ND	ND	ND	14.52	0.875	16.78	1.235	4.37	1.985	11.49	1.105
s2210	GRMZM2G018375	Thiazole biosynthetic enzyme 1-1 (THI1)	Plastid stroma	33.0	4.9	33.6	4.9	12	8	1.18	260.21	57.9	253.72	24.85	185.99	0.555	96.00	7.315
s2275	GRMZM2G064163	Spermidine synthase 1	ND	28.0	5.2	32.2	5.1	11	8	1.09	78.25	13.1	48.86	7.02	142.19	3.935	60.22	12.19
s2316	GRMZM2G078566	Glucan endo-1,3- $\beta$ -glucosidase 5	Plasma membrane	31.7	4.7	31.3	5.2	2	2	0.13	53.57	1.325	45.08	6.13	83.79	0.46	58.27	6.515
s2322	NI	ND	ND	ND	ND	31.3	5.1	2	2	0.67	30.89	0.65	33.69	4.005	54.14	3.65	45.08	1.775
s2460	NI	ND	ND	ND	ND	28.6	5.4	2	2	0.15	49.26	1.225	82.59	4.525	40.53	9.415	51.94	2.44
s2528	GRMZM2G068244	NAD-dependent epimerase/dehydratase	Plastid stroma	27.7	6.8	26.7	6.5	2	2	0.17	177.51	5.515	210.01	36.29	273.89	9.41	253.79	7.15
s3353	NI	ND	ND	ND	ND	13.6	5.4	ND	ND	ND	23.55	0.9	24.78	1.84	43.47	6.075	32.76	3.155

<sup>a</sup>Identification number of the corresponding protein spot on the 2-D reference map showing significant ( $P < 0.05$ ) changes in *ZmASR1*-OE leaves compared to WT leaves under both treatment conditions and manually evaluated from the 2-D reference map.

<sup>b</sup>Maize genome release 5a.59 of November 2010 (<http://www.maizesequence.org>). "NI" stands for "not identified by LC-MS/MS".

<sup>c</sup>Manually improved annotation from SwissProt, GenBank, TrEMBL and InterPro databases. Annotations in gray were eliminated based on the absence of correspondence between the theoretical *Mr* and the observed *Mr* and/or the PAI. "ND" stands for "not determined".

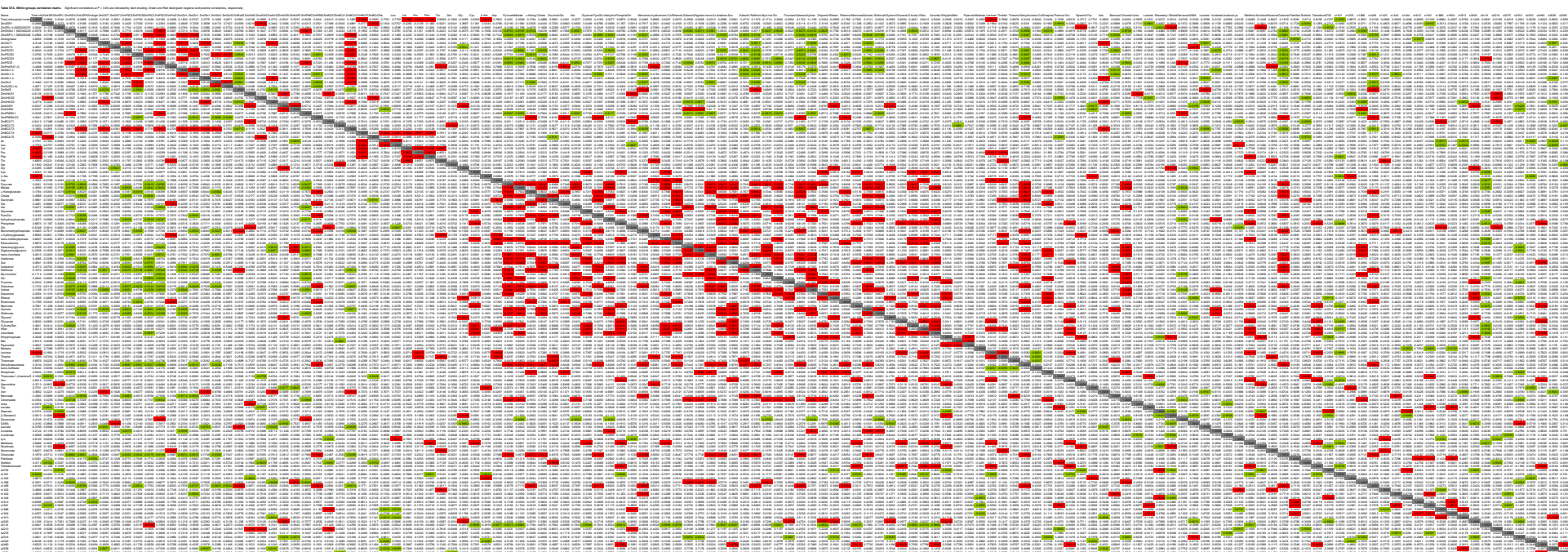
<sup>d</sup>Manually improved cellular locations from experimental data (Majeran et al. 2010).

<sup>e</sup>Observed *Mr* and *pl*.

<sup>f</sup>Theoretical *Mr* and *pl*.

<sup>g</sup>Protein Abundance Index.

<sup>h</sup>Mean and SE values of a biological duplicate.



**Table S7B.** Number of individual significant correlations for the whole matrix and its submatrices.

Matrix <sup>a</sup>	Significance level	Individual significant correlations			
		Obtained			Expected <sup>b</sup>
		Total	Positive	Negative	Total
Whole matrix	$P < 0.05$	726	448	278	465
	$P < 0.01$	158	96	62	93
	$P < 0.001$	23	14	9	9
Transcript-transcript	$P < 0.05$	53	42	11	22
	$P < 0.01$	16	13	3	5
	$P < 0.001$	2	2	0	0
Spot protein-spot protein	$P < 0.05$	14	7	7	12
	$P < 0.01$	2	1	1	3
	$P < 0.001$	0	0	0	0
Metabolite-metabolite	$P < 0.05$	323	300	23	175
	$P < 0.01$	67	63	4	35
	$P < 0.001$	10	9	1	4
Transcript-spot protein	$P < 0.05$	30	9	21	33
	$P < 0.01$	7	3	4	7
	$P < 0.001$	1	0	1	1
Transcript-metabolite	$P < 0.05$	194	40	154	126
	$P < 0.01$	41	5	36	26
	$P < 0.001$	5	0	5	2
Transcript-TCC	$P < 0.05$	1	1	0	2
	$P < 0.01$	0	0	0	0
	$P < 0.001$	0	0	0	0
Spot protein-metabolite	$P < 0.05$	105	44	61	92
	$P < 0.01$	24	10	14	18
	$P < 0.001$	5	3	2	2
Spot protein-TCC	$P < 0.05$	1	0	1	1
	$P < 0.01$	0	0	0	0
	$P < 0.001$	0	0	0	0
Metabolite-TCC	$P < 0.05$	5	5	0	4
	$P < 0.01$	1	1	0	1
	$P < 0.001$	0	0	0	0

<sup>a</sup>TCC: total chlorophyll content.

<sup>b</sup>Number of expected individual significant correlations under the null hypothesis, with the number of positive and negative individual significant correlations following a symmetric binomial distribution.



**Table S7C.** Pair-wise correlations of ZmASR1 targets against BCAA-related ZmASR1 targets.

Analyses	Parameter x <sup>a</sup>	Trend in <i>ZmASR1</i> -OE	Parameter y <sup>b</sup>	corr(x,y) <sup>c</sup>	
qRT-PCR	<i>ZmAHAS1</i>	Up	ZmKAR11	0.9257	
	<i>ZmBCAT4</i>	Up	Ile	0.9263	
			Leu	0.9451	
			Val	0.9584	
	<i>ZmKAR11</i>	Up	ZmAHAS1	0.9257	
	<i>ZmKAR12</i>	Up	ZmKAR12	0.9349	
			ZmKAR11	0.9349	
			Ile	-0.8835	
	Metabolomics	Trp	Down	ZmKAR11	-0.9177
		Ile	Down	ZmKAR12	-0.8847
<i>ZmBCAT4</i>				0.9263	
ZmKAR12				-0.8835	
Leu		Down	Leu	0.9708	
			ZmAHAS1	0.9024	
			Leu	-0.8897	
Gly		Down	ZmKAR11	0.8926	
Urea		Up	ZmAHAS1	0.9342	
Leu		Down	<i>ZmBCAT4</i>	0.9451	
			Ile	0.9708	
Phe		Down	<i>ZmBCAT4</i>	0.9085	
			Val	0.9188	
Pro		Down	<i>ZmBCAT4</i>	0.9371	
	Val		0.9935		
Val	Down	<i>ZmBCAT4</i>	0.9584		

<sup>a</sup>Transcripts or metabolites that showed significant changes in *ZmASR1*-OE leaves compared to WT leaves ( $P < 0.05$ , except transcripts in italic in which  $P < 0.10$ ).

<sup>b</sup>Transcripts or metabolites involved in the BCAA biosynthetic pathway and showing significant changes in *ZmASR1*-OE leaves compared to WT leaves ( $P < 0.05$ , except transcripts in italic in which  $P < 0.10$ ).

<sup>c</sup>Correlations were calculated from residual data. Green and red shading distinguish negative and positive correlations, respectively ( $P < 0.05$ ). The original data are in the Supplemental Table S7A.

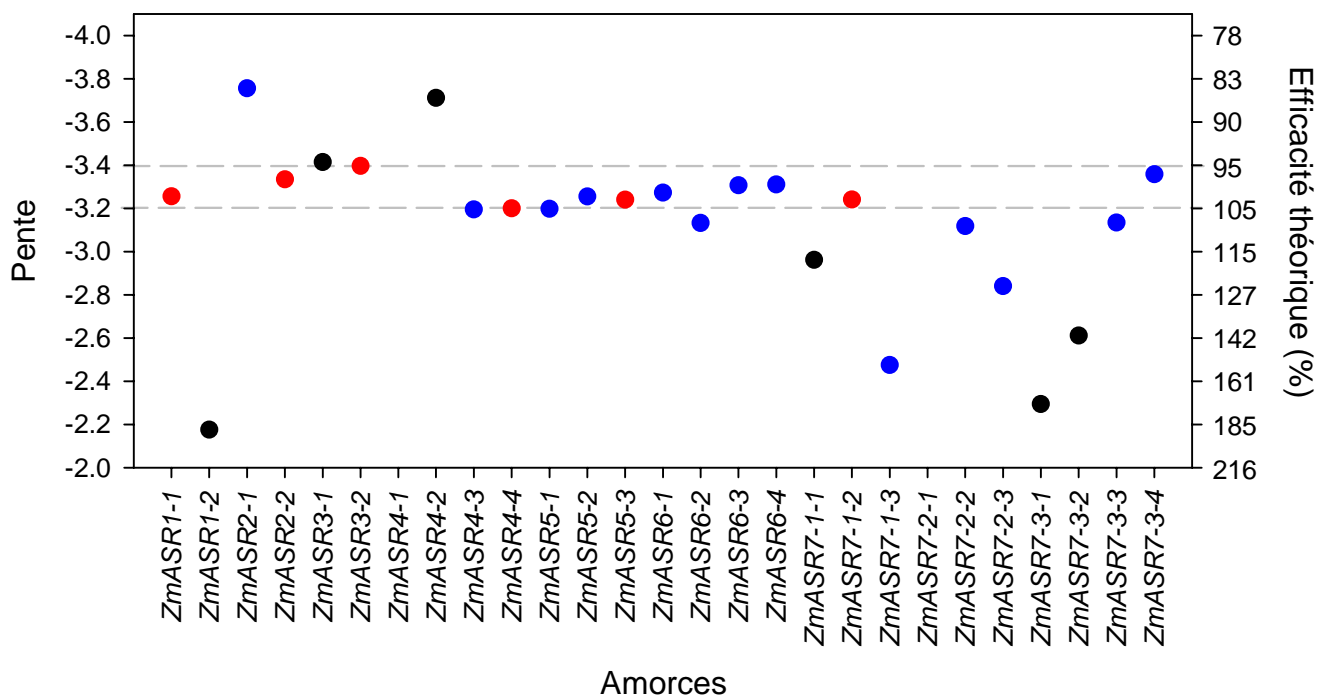
**Table S7D.** Pair-wise correlations of ZmASR1 target transcripts against decreased and biomass-related metabolites

Parameter x <sup>a</sup>	Trend in <i>ZmASR1</i> -OE	Parameter y <sup>b</sup>	corr(x,y) <sup>c</sup>
<i>ZmAHAS1</i>	Up	Gln	0.9024
		Urea	0.9342
<i>ZmBCAT4</i>	Up	Ile	0.9263
		Leu	0.9451
		Phe	0.9085
		Pro	0.9371
		Val	0.9584
<i>ZmKAR11</i>	Up	Gly	0.8926
		Trp	-0.9177
<i>ZmKAR12</i>	Up	Ile	-0.8835
		Trp	-0.8847
<i>ZmP5CS2</i>	Up	Monomethylphosphate	-0.9352
		Raffinose	-0.9108
<i>ZmP5CS3</i>	Up	Ascorbate	-0.8937
		Citrate	-0.9840
		Galactinol	-0.8950
		Glc	-0.8904
		Malate	-0.9642
		Raffinose	-0.9067
		Suc	-0.9731
<i>ZmSPL14</i> MZ00000739	Up	Nicotinate	0.9884
		Spermidine	0.9159
<i>ZmUSPA.1</i> MZ00024643	Up	Benzoate	-0.9536
		Citrate	-0.9608
		Galactinol	-0.9509
		Malate	-0.8919
		Monomethylphosphate	-0.9021
		Raffinose	-0.9734
<i>ZmWD40.1</i> MZ00022082	Down	<i>trans</i> -Aconitate	-0.9961
		Ala	-0.9587
		Citramalate	-0.9738
		Glc	-0.9639
		Malate	-0.9195

<sup>a</sup>Transcripts that showed significant changes in *ZmASR1*-OE leaves compared to WT leaves ( $P < 0.05$ , except transcripts in italic in which  $P < 0.10$ ).

<sup>b</sup>Green and red distinguish metabolites negatively and positively correlated to biomass in Arabidopsis (Meyer et al., 2007; Sulpice et al., 2009).

<sup>c</sup>Correlations were calculated from residual data. Green and red shading distinguish negative and positive correlations, respectively ( $P < 0.05$ ). The original data are in the Supplemental Table S7A.



**Figure 1. Détermination des caractéristiques de chaque couple d'amorces pour les différents gènes de la famille *ZmASR*.** Chaque couple d'amorces a été testé expérimentalement par qRT-PCR avec une gamme d'ADNc de la lignée B73 (dilution de 1 à 1/10000). La pente des  $C_t$  de la gamme-étalon a permis le calcul de l'efficacité de chaque couple d'amorces selon l'équation  $E=10^{-1/pente}-1$ . Les ronds rouges indiquent les couples d'amorces choisis ayant une bonne spécificité et une bonne efficacité. Les ronds bleus indiquent les couples d'amorces présentant un problème de spécificité ou formant des dimères, sur la base de la courbe de dissociation des produits de qRT-PCR. Les ronds noirs correspondent aux couples non retenus ayant une mauvaise efficacité.

## 2.2 Supplément méthodologique

### 2.2.1 Dessin et validation des primers qRT-PCR

Les amorces utilisées pour la qRT-PCR ont été dessinées avec les logiciels PRIMER EXPRESS 2.0 (Applied Biosystems) et PRIMER3 v0.4.0 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) sur la base de différents critères. En effet, les oligonucléotides doivent présenter une  $T_m$  de  $60 \pm 1^\circ\text{C}$ , générer un fragment de 50 à 200 pb et être spécifique du gène cible. La formation de structures secondaires et de dimères doit être limitée pour permettre d'éviter la perte de rendement lors de la PCR. La condition primordiale pour l'utilisation d'un couple d'amorces correspond à une efficacité de  $100 \pm 5\%$  de ce couple (Marino et al., 2003) lors de la qRT-PCR pour une estimation précise de la teneur en transcrite du gène cible. Les couples d'amorces ont donc tout d'abord été validés : (1) par BLAST sur une banque génomique pour vérifier leur spécificité ; (2) par PCR sur ADNg pour vérifier leur efficacité dans les conditions de la qRT-PCR ; et (3) par séquençage des produits PCR pour vérifier leur spécificité. L'efficacité de chaque couple d'amorces a été testée expérimentalement avec une gamme d'ADNc comprenant 8 points de dilution (1 à 1/10000). La pente des  $C_t$  obtenus en fonction du log des dilutions de cette gamme permet le calcul de l'efficacité du couple d'amorces selon l'équation  $E = 10^{-1/\text{pente}} - 1$ . Chaque couple d'amorces retenu a été choisi après plusieurs tests expérimentaux ayant permis d'éliminer les couples présentant (1) formant des dimères visualisés grâce à la courbe de dissociation obtenue après la PCR (2) ayant une efficacité trop faible (Fig. 1).

### 2.2.2. Choix des gènes contrôles

Les gènes contrôles permettent de s'assurer que la même quantité d'ADNc est présente dans les échantillons qu'on souhaite comparer. Ils doivent donc présenter une expression constitutive dans différents tissus ou types cellulaires, à différents stades de développement et en réponse à différents traitements. Nous avons testé cinq gènes contrôles à l'aide de six couples d'amorces qRT-PCR pour les quatre génotypes (B73, A188, F2 et MBS847) utilisés pour l'ensemble des analyses (Tableau 1). L'efficacité des couples d'amorces a tout d'abord été testée par PCR sur des extraits d'ADNg des quatre génotypes, selon les conditions suivantes : (1) étape de dénaturation à  $94^\circ\text{C}$  pendant 5 min, (2) 25 cycles d'amplification : 30 sec de dénaturation à  $94^\circ\text{C}$ , 30 sec d'incubation à  $60^\circ\text{C}$  et 30 sec d'élongation à  $72^\circ\text{C}$ , (3) étape d'élongation à  $72^\circ\text{C}$  pendant 5 min. Les produits PCR obtenus sont séparés sur gel d'agarose 1%. Les couples d'amorces permettant une amplification de l'ADNg des quatre génotypes ont été sélectionnés. L'efficacité des

**Tableau 1. Détermination des gènes contrôles utilisés en qRT-PCR par analyse des couples d'amorces.**

Gène	N° accession	Nom des amorces	Séquence des amorces (5' vers 3')	Spécificité			Référence
				PCR <sup>a</sup>	Courbe de dissociation <sup>b</sup>	Pente <sup>c</sup> Efficacité <sup>c</sup>	
ZmGRP2	GRMZM2G080603	ZmGRP2-F1 ZmGRP2-R1	CACAACGCCCTTCAGCACCTA AAGGTGACGAGCCCGAAGC	1 bande	1 pic de dissociation	-3.4 96.8	constitutive
α-Tubuline	GRMZM2G083243	ZmTubuline-F1 ZmTubuline-R1	TCCTGGACAACGAGGCTATCTAT TGTGAGATCAGCCTGTTCAAGTT	1 bande	1 pic de dissociation	-3.5 97.5	pas exprimé en condition irriguée et après traitement par l'ABA chez F2
Polyubiquitine	GRMZM2G419891	ZmPolyubiquitine-F1 ZmPolyubiquitine-R1	GGTCAGTAAGCCATGGTTTCATT CGACGACATCCATATAGAGGTACA	0 bande avec F2	ND	ND	Vandesompele et al., 2002
		ZmPolyubiquitine-F2 ZmPolyubiquitine-R2	GATGTTTATTAGACGAGCATCCA GCCATGGTTTCATTTAAGCTGC	0 bande avec F2	ND	ND	Biogemma
Actine	GRMZM2G126010	ZmActine-F1 ZmActine-R1	CGATTGAGCATGGCATTGTCA CCCCTAGCGTACAACGAA	1 bande	Dimères avec J1A	ND	Li et al., 2008
H <sup>+</sup> -ATPase	GRMZM2G006894	ZmATPase-F1 ZmATPase-R1	GGACTGCTCTGACGTACATTGAT CAGTGGCACAGGTCAAGAATCT	1 bande	Dimères avec J1A	ND	Vandesompele et al., 2002

<sup>a</sup>Nombre de bandes obtenues après PCR sur ADNg des lignées B73, A188, MBS847 et F2, dans les conditions décrites dans le chapitre 2 § 2.2.2.

<sup>b</sup>Analyse réalisée à l'aide d'ADNc foliaire des lignées B73, A188 et F2.

<sup>c</sup>Analyse réalisée à l'aide d'ADNc foliaire de la lignée B73.

<sup>d</sup>Analyse réalisée à l'aide d'ADNc foliaire des lignées B73, A188 et F2 en condition irriguée et de déficit hydrique, d'ADNc foliaire et racinaire de la lignée F2 après 12h et 24h de traitement à l'ABA et de l'ADNc de grains après 0 et 12 DAP.

couples d'amorces sélectionnés a ensuite été testée par qRT-PCR sur une gamme de dilution d'ADNc des quatre génotypes. Les couples d'amorces permettant d'obtenir un seul pic de dissociation et une efficacité proche de 100% ont été sélectionnés. La dernière étape a consisté à déterminer si les gènes ciblés étaient constitutifs dans l'ensemble des tissus et des traitements utilisés pour l'ensemble des analyses. Il s'est avéré que seul le gène *ZmGRP2* présentait une efficacité proche de 100% et une expression constitutive sur l'ensemble des tissus utilisés (Tableau 1). Ce gène a donc été choisi pour l'ensemble des travaux réalisés.

Tableau 2. Analyse de la composition en cystéine et recherche de ponts disulfure chez la protéine ZmSR1 et ses 26 cibles potentielles

Oligo ID / Spot ID / Nom de la protéine <sup>a</sup>	Accession <sup>b</sup>	Annotation <sup>c</sup>	Cys <sup>d</sup>	Prédiction de ponts disulfures <sup>e</sup>		Cible Trx <sup>g</sup>	Référence <sup>g</sup>
				Séquences <sup>f</sup>	Score		
ZmASR1	GRMZM2G136910	ABA-, stress- and ripening-induced protein 1	0	-	-		
MZ0000739 ZmSPL14	GRMZM2G169270	SQUAMOSA promoter binding protein (SBP)-box-like gene 14	24	ASYPMCQVDDC - QGIHDCRQSKT 0.01037 CQVDDCRADLT - YIRPGCLVLSM 0.99954 RRHKVCETHSK - QVGLTCWQSA 0.99226 QAQRFCQQCSR - RSCSOCAILES 0.99962 RFCQQCSRFP - QFVVLCLDNSK 0.8695 EGKRSCRRLA - QRASACTLSTR 0.99891 TSQAWCAPPLD - VCVVCVFMRA 0.86306 PGYQSCYVSTS - SKEVLCSAYPG 0.99767 YVSTSCSDHSP - AIAAVCVVCFM 0.86538 GTQIHCTSTGK - AAVCVVCFVM 0.97381 FILGRCFIEVE - LQIRSCQCAI 0.99974 ASSSVQCELRS - SERDWCSLTKT 0.8955			
MZ00022082 ZmWD40.1	GRMZM2G405690	Unknown protein; WD40 repeat-like-containing domain	27	AVLQLCRWTL - VFSFCCLYLL 0.9998 ALSDTCTQAVF - RASCSQWECL 0.7239 LAWGYCSDAFD - LSSSCYLIGL 0.91732 TVHAFCHSRKS - WRPTCSVLED 0.92076 PENWFCSFLT - NESVRCEAHP 0.99729 YWYSKCSLKT - DVISLCLPLT 0.99963 FLRASCSQWE - GVFSFCCLYLL 0.99191 SCQWECLKVLS - SVLQQRDTLE 0.99906 PSNAECILTV - SFSQCAIKF 0.9981 DVFLACLNTAG - IILPPCRSQD 0.99988 NQFADCFSIWE - RTNSCFRRRI 0.99703 GSLSFCANQSI - LADRLCWENG 0.99116 RRKYRCDENEV - GDSVVCSCQGY 0.99813 SVVCSQGYLY - AAGSTCNALNL 0.99893			
MZ00024643 ZmUSPA.1	GRMZM2G119258	Universal stress protein A domain protein 1	6	HPSISCRITAFD - QLGIKCEAWIR 0.01316 YFVNQCHQLGI - TVSEFCVKHAE 0.61819 PKEVICSEVKR - VKHAECPVITI 0.01051	oui	Montrichard et al., 2009	
ZmAHAS1	GRMZM2G143357	Acetohydroxyacid synthase 1	6	AAPIRCALSAR - SGEELCRFVEL 0.01065 EALERCVRDV - PHVICADVKL 0.62282 GRVGVCIATSG - YVGGGCAASGE 0.33476	oui	Montrichard et al., 2009	
ZmKARI1	GRMZM2G161868	Ketolacid reductoisomerase 1	8	ETPPSCPPLTV - FHALGCCWKL 0.99977 HALGCCWKLIN - DILYECYEDVA 0.01043 SVIVVCPKMG - DYSSLCPPLG 0.99719 ASFYPCMDILY - GAIEVCAELRP 0.01603	oui	Hägglund et al., 2008	
ZmKARI2	GRMZM2G004382	Ketolacid reductoisomerase 2	5	ATQHPCLVAAS - DILYECYEDVS 0.01037 SVIACPKMG - FMVDCSTTAR 0.06126 AAYPCMDILY - GAIEVCAQLRP 0.03221	oui	Hägglund et al., 2008	
ZmBCAT2	GRMZM2G153536	Branched-chain aminotransferase 2	7	PFAARCSQAGG - GGGGCSLLLP 0.01087 MYVTRCSPEDR - EEVSSCNVFW 0.95209 GAERMCOMPAPS - ADEVFCTGTAV 0.15026			
ZmBCAT4	GRMZM2G047347	Branched-chain aminotransferase 4	6	GYCTVCFTPSS - MYLMSCSSDGV 0.01043 FIVVCPVGHY - EEVSSCNFMV 0.99601			
ZmP5CS1	GRMZM2G375504	$\Delta$ -1-pyrroline-5-carboxylate synthetase 1	11	VGRGLCEQV - LDGKACAQV 0.01044 RLGCLCEQVE - DYPAACNAMET 0.01222 FRERLCTVES - VAARECSRRLQ 0.0138 HADGICHVYID - SAHTDCIITD 0.99744 AHEVLCIPKAD - YSSMACTIEFV 0.604			
ZmP5CS3	GRMZM2G028535	$\Delta$ -1-pyrroline-5-carboxylate synthetase 3	11	RLGSLCEQVK - ANLWACSEKAT 0.98234 FDGKACAQV - YSSMACTIEFV 0.01241 FEKAYCPLGVL - LLTTRCILRGS 0.99682 HADGICHVYID - ASTRFCDGTRF 0.30823 DYPAACNAMET - SAHTDCIITD 0.15636			
s1021	GRMZM2G019121	Class II Aspartyl-tRNA synthetase	10	MSTVQCVLVA - THRLHCEVGL 0.98392 VRKIYCNRAI - FYTIPCYDNP 0.01566 IFRIQCQVENK - VVMLFCALNNI 0.01038 NGQPAQLAGSP - HLSNCKKELE 0.99967 HYFEVCDIIG - KRATECGIDVS 0.9973	oui	Montrichard et al., 2009	
s1202	GRMZM2G008247	$\beta$ -D-Glucosidase	4	NWDHFCHNPE - SPGLDCAIPTG 0.06483 NFAKVCDFNFG - FAPGRCSPLD 0.01746	oui	Montrichard et al., 2009	
s1388	GRMZM2G127393	Trigger factor-like protein	5	SIIECYQSTL - RILKRCKEVEK 0.01052 QFTVCKELFY - KLLPGCTTIDE 0.9974			
s1406 s1422	GRMZM2G123204	Adenylosuccinate synthetase	5	PAPRLCRSLRA - SAGGICTGLGI 0.01258 DVVARCQGGAN - SNGICEGRLL 0.99648 NENTQCIVGNG - ALKYCCQINGF 0.98785 GRPRRCGWLDI - VALKYCCQING 0.04737	oui	Montrichard et al., 2009 Balmer et al., 2006	
s1444	GRMZM2G449496	NAD(P) binding protein	1	-			
s1612	GRMZM2G104613	3-isopropylmalate dehydrogenase 2	2	RRGLCSVDKA-TTLVGCCKRME 0.01047	oui	He et al., 2009	
ZmIPMDH2	GRMZM2G145805	3-isopropylmalate dehydrogenase 1	2	RRGLCSVDKA-QTLVGCCKRME 0.01039	oui	He et al., 2009	
ZmIPMDH1 s1886	GRMZM2G097226	Pyruvate dehydrogenase subunit E1 $\beta$ ; transketolase domain	5	AQHSQCYAAWF - AAKRACYRAVP 0.99582 LDSSFCLPIGK - IGAEICMSVVE 0.01041	oui	Montrichard et al., 2009 Balmer et al., 2004	
s1904	AC147602_5_FGP004	Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase	6	CGGTACVNSFG - EYSHVCKYACS 0.09329 ALSARCEIGDS - IRLLCMGEM 0.99728 VRTASCGGTAC - VCKYACSEEV 0.01085	oui	Schurmann and Buchanan, 2008 Dunford et al., 1998	
s1913	GRMZM2G102838	Photosystem II stability/assembly factor, HCF 136 type	0	-			
s2020	AC210204_3_FGP003	C2 domain containing protein	1	-			
s2210	GRMZM2G018375	Thiazole biosynthetic enzyme 1-1	2	SAGLSCAYELS - HDTQSCMDPNV 0.14456 VVSSCGHDGP - MSKIVCWLQ 0.99968	oui	Balmer et al., 2003	
s2275	GRMZM2G064163	Spermidine synthase 1	7	TERDECAYQEM - PGGVVCQAES 0.01045 THLPLCSIKDP - DIVNCRQVFK 0.0106 EQIDICEIDKM - HTASFCLPSFA 0.99734	oui	Hägglund et al., 2008	
s2316	GRMZM2G078566	Glucan endo-1,3- $\beta$ -glucosidase 5	6	LPRQWCVNPN - PSTDACNFTIQ 0.01145 SVTYACTFSDC - QVEGSCYFOGL 0.09318 CTFSDCTSLGY - GYGSSCNGLDA 0.01109			
s2528	GRMZM2G068244	NAD-dependent epimerase/dehydratase	1	-			

<sup>a</sup>Numéro d'identification de l'oligonucléotide déposé sur la puce, numéro d'identification du spot protéique sur le gel de référence ou nom de la protéine.

<sup>b</sup>Numéro d'accèsion de la base génomique 5a.59 de novembre 2010 (<http://www.maizesequence.org>)

<sup>c</sup>Annotations manuelles à partir des bases SwissProt, GenBank, TrEMBL et InterPro.

<sup>d</sup>Nombre de cystéines identifiées dans la séquence protéique d'intérêt mature (sans peptide d'adressage).

<sup>e</sup>Prédiction de ponts disulfures à l'aide du site DIANNA 1.1 (<http://clavius.bc.edu/~clotelab/DIANNA/>). Les scores en rouge correspondent aux scores supérieurs à 0.6 et le plus élevé identifié pour chaque protéine

<sup>f</sup>Les cystéine en bleu correspondent aux cystéines conservées identifiées comme cibles de régulation redox dans la littérature.

<sup>g</sup>Protéines identifiées comme une cible Trx potentielle ou avérée dans la littérature.

### 3. Résultats supplémentaires

#### 3.1. Etude de l'impact de la sur-expression du gène *ZmASR1* sur la régulation redox des protéines IPMDH chez le maïs

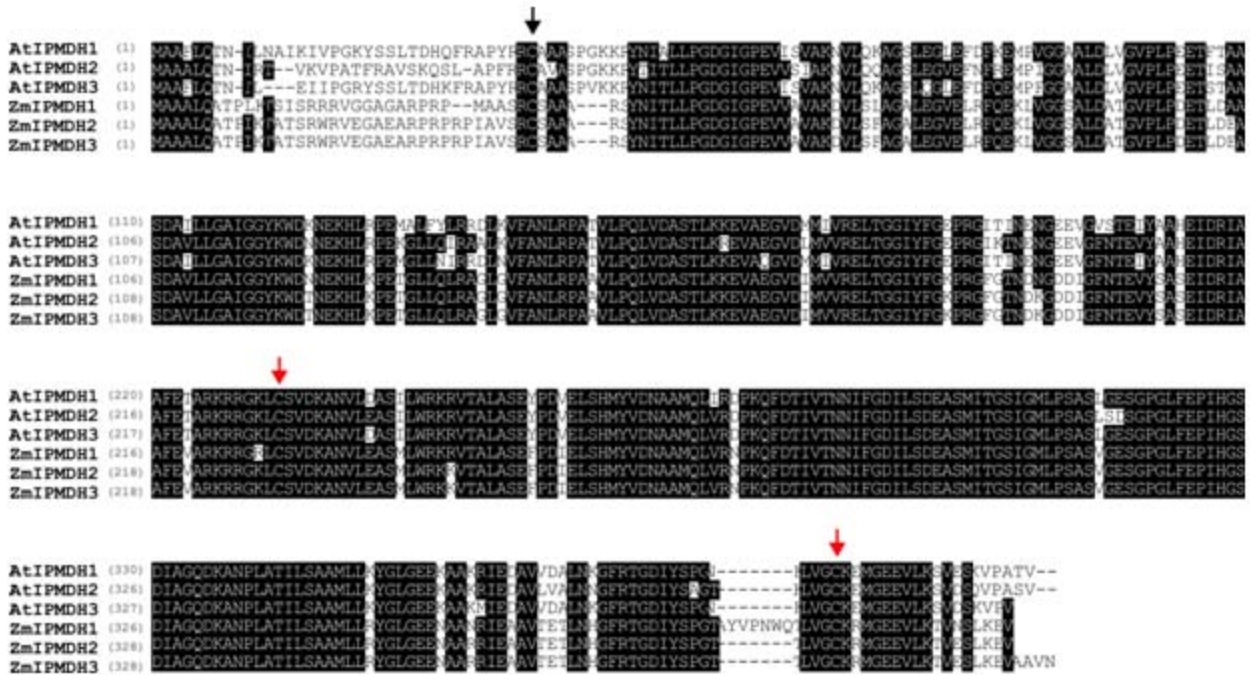
##### 3.1.1. Introduction

La régulation redox correspond à la modification du statut oxydatif des groupements thiol (R-S-H) des résidus Cys, ce qui conduit à la formation d'un pont disulfure (R-S-S-R) entre deux Cys et à une altération de la structure de la protéine. Cette altération s'accompagne le plus généralement d'une perte ou d'un gain de fonction ou d'une augmentation de la dégradation de la protéine ciblée. Chez les végétaux, il est connu que de nombreux métabolismes sont régulés de manière redox, tels que l'assimilation du carbone par le cycle Calvin-Benson, la germination des graines, la transcription, la traduction, la division cellulaire, la signalisation redox, l'élimination de radicaux et la détoxification (Montrichard et al., 2009). Les échanges thiol/disulfure protéiques sont effectués par des protéines spécifiques, les thioredoxines (Trx) et les glutaredoxine (Grx) qui possèdent un dithiol très réactif dans leur site actif et servent également de substrat à des enzymes réducteurs. Contrairement aux organismes non photosynthétiques, les végétaux ont de multiples isoformes de Trx présentes dans le cytosol (Trx-h), la mitochondrie (Trx-h et Trx-o) ou les plastes (Trx-f, Trx-m, Trx-x et Trx-y) (Lemaire et al., 2007).

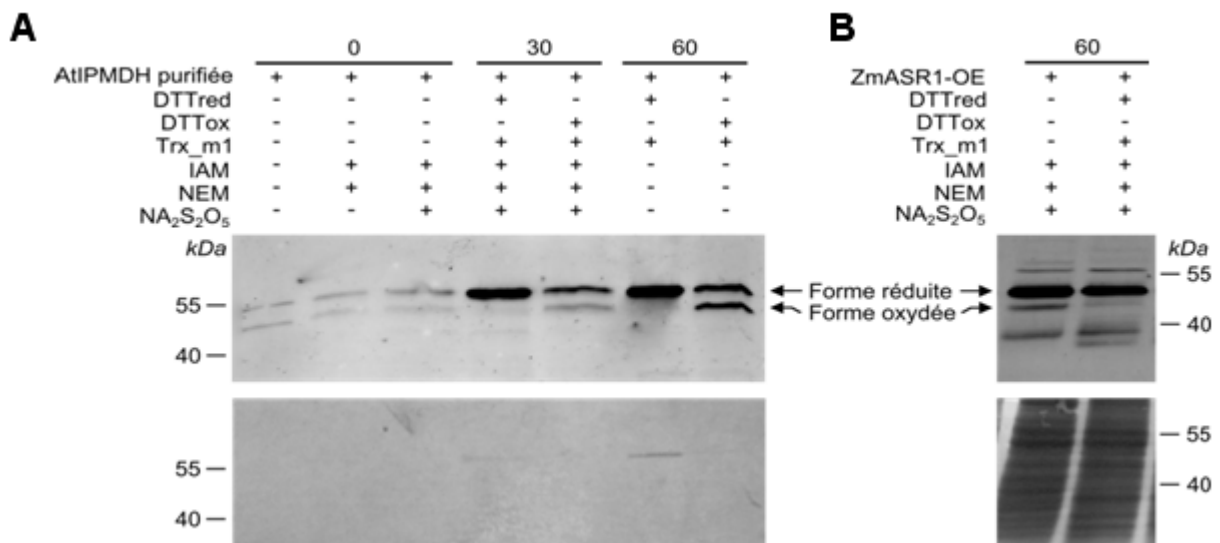
L'ensemble des analyses transcriptomique et protéomique réalisées sur les extraits foliaires des plantes cultivées au Magneraud, a permis d'identifier 25 gènes dont l'expression est affectée par la sur-expression du gène *ZmASR1* (Virilouvet et al., en préparation ; voir Résultats §2.2). Sur les 25 gènes identifiés, 13 (quatre transcrits et neuf protéines) codent des cibles potentielles ou avérées des thioredoxines (Trx) selon Montrichard et al. (2009 ; Tableau 2). L'analyse de la présence potentielle de ponts disulfures prédits par le logiciel DiANNA chez l'ensemble des 25 protéines identifiées montre : (1) qu'un score supérieure à 61% a été obtenu au moins une fois pour neuf des 13 gènes cibles avérées ou potentielles des Trx ; (2) qu'un score supérieure à 95% a été obtenu au moins une fois pour sept autres cibles de la protéine *ZmASR1* (Tableau 2). Ces résultats suggèrent donc que sur les 25 gènes affectés par la sur-expression du gène *ZmASR1*, 20 pourraient être des cibles des Trx.

Parmi les protéines dont l'abondance est affectée par la sur-expression du gène *ZmASR1* et connues pour être régulées de manière redox, nous pouvons noter la présence de la sédoheptulose-1,7-bisphosphatase (s1904 ; SBPase), une enzyme chloroplastique





**Figure 1. Comparaison des séquences protéiques déduites des gènes *IPMDH* d'*A. thaliana* et de maïs.** Les acides aminés identiques sont indiqués en blanc sur fond noir. La flèche noire indique le premier acide aminé prédit de la protéine mature obtenue après clivage du peptide d'adressage chloroplastique situé en amont chez *A. thaliana*. Les deux flèches rouges indiquent les deux Cys conservées essentielles pour la régulation redox de la protéine AtIPMDH1 chez *A. thaliana* (He *et al.*, 2009).



**Figure 2. Régulation redox de la protéine recombinante AtIPMDH1 et des protéines IPMDH foliaires de maïs.** (A) La protéine AtIPMDH1 purifiée (200 ng) a été incubée en présence ou pas de différents produits : (1) les agents alkylants IAM (100mM), NEM (50 mM) et/ou sodium disulfite (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>; 2%, p/v); (2) une Trx plastidiale (Trx\_m1 10 μM) avec un agent réducteur (DTTred, 10mM) ou un agent oxydant (DTTox, 10 mM) à 30°C pendant 30 ou 60 min, suivi de l'ajout ou pas des trois agents alkylants. (B) Les extraits protéiques solubles de feuilles 11 de plantes de maïs sauvages cultivées en condition irriguée, ont été incubés pendant 60 min en présence d'agents alkylants supplémentés ou pas en DTTred (10 mM). L'ensemble des protéines a été analysée par SDS-PAGE (12%, p/v) non-réductrice suivie d'une immunodétection à l'aide de l'anticorps anti-AtIPMDH1 (1/5000). Les protéines immunodéetectées ont été visualisées à l'aide d'un anticorps secondaire immunofluorescent révélé par scan infrarouge (panel supérieur). L'ensemble des protéines présentes sur les membranes a ensuite été révélées par coloration au nitrate d'argent (panel inférieur).

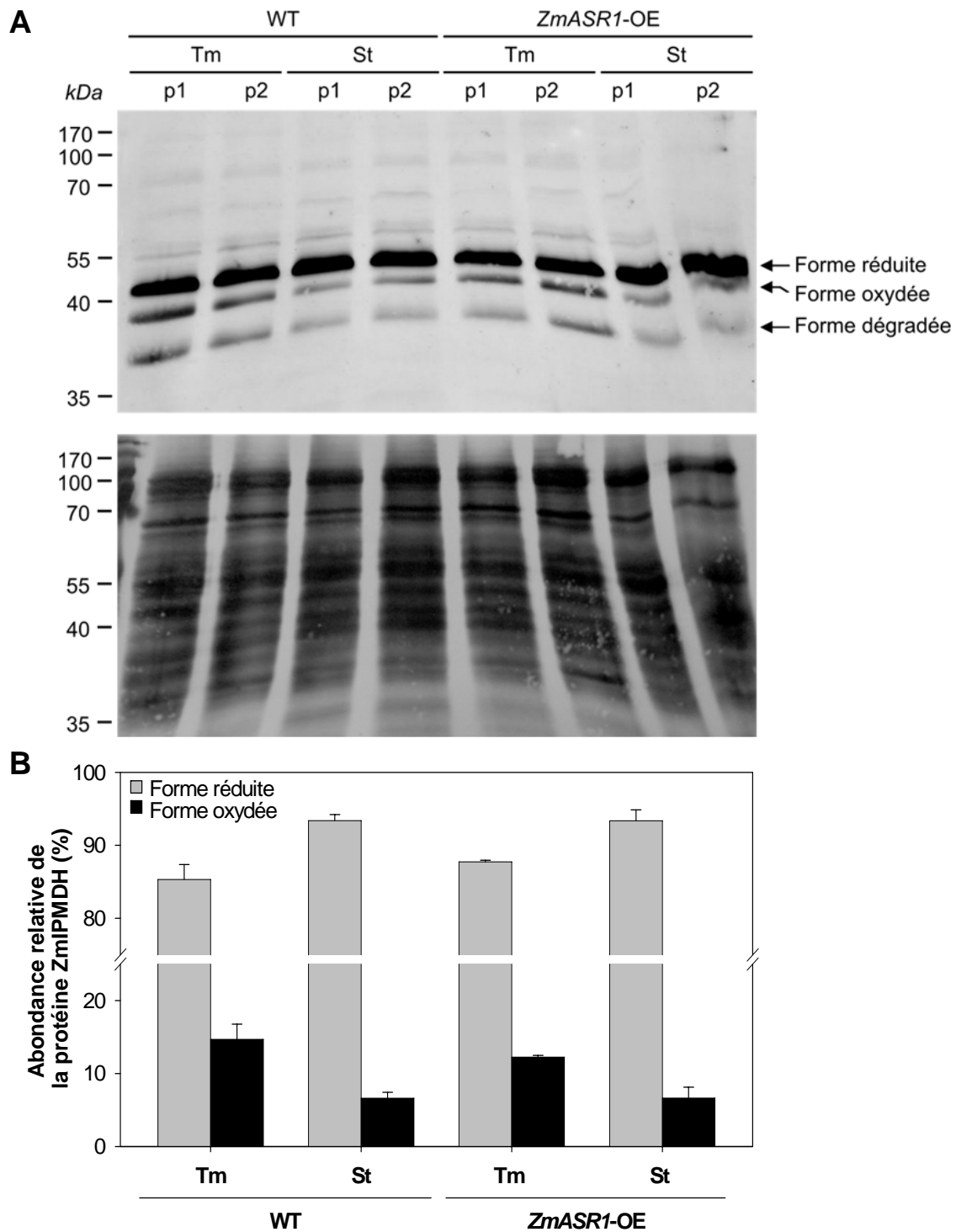
impliquée dans le cycle de Calvin-Benson (Tableau 2). Les SBPase de différentes espèces végétales contiennent un nombre variable de Cys dont deux paires conservées en N-terminale : ces deux paires sont également présentes chez la SBPase de maïs (Tableau 2 ; Dunford et al., 1998 ; Schurmann and Buchanan, 2008). Deux autres cibles plastidiales de la protéine ZmASR1, les isopropylmalate deshydrogénase (IPMDH) 1 et 2 de maïs (ZmIPMDH1 et ZmIPMDH2), impliquées dans biosynthèse de la Leu, contiennent également les deux Cys conservées impliquées dans la régulation rédox dépendante des Trx de la protéine AtIPMDH1 chez *A. thaliana* (Fig. 1 ; Tableau 2 ; He et al., 2009). Bien que n'ayant pas été identifié comme une cible de la protéine ZmASR1, il est intéressant de noter que la protéine ZmIPMDH3 contient également ces deux Cys conservés (Fig. 1).

L'ensemble de ces résultats tend à impliquer un mécanisme rédox dans la réponse au stress hydrique médiée par la protéine ZmASR1. Nous avons donc pris contact avec S. Chen (University of florida, USA), afin de pouvoir disposer d'outils susceptibles d'étudier cette hypothèse. Celle-ci a eu l'amabilité de mettre à notre disposition des échantillons de protéine AtIPMDH1 recombinante et d'anticorps anti-AtIPMDH1 (He et al., 2009). Ce matériel nous a tout d'abord permis de mettre au point les conditions expérimentales permettant de visualiser les protéines IPMDH sous leurs formes réduites et oxydées, puis d'étudier l'influence de la protéine ZmASR1 sur la régulation redox des protéines IPMDH chez le maïs (coll. E. Issakidis-Bourguet, UMR 8618 CNRS, Orsay).

### *3.1.2. Mise au point de conditions expérimentales permettant de visualiser les protéines IPMDH sous leurs formes réduites et oxydées*

La protéine AtIPMDH1 existe sous deux formes après séparation par SDS-PAGE non réductrice et immunodétection à l'aide de l'anticorps anti-AtIPMDH1 (« redox Western ») : la première, de plus haut poids moléculaire, correspond à la forme réduite plus active, alors que la seconde, de plus faible poids moléculaire correspond à la forme oxydée moins active (He et al., 2009).

Un premier essai basé sur le protocole décrit par S. Chen avec la protéine AtIPMDH1 n'ayant pas permis de retrouver ces résultats, nous avons tout d'abord cherché à optimiser les conditions expérimentales avec la protéine AtIPMDH1. Différents conditions ont été testées : (i) les conditions d'immunodétection avec l'anticorps anti-AtIPMDH1 ; (ii) la présence ou non d'agents alkylants, tels que l'iodoacétamide (IAM), le N-ethylmaleimide (NEM) qui permettent le blocage des groupes thiols des Cys et préservent ainsi la conformation réduite de la protéine, et le sodium disulfite ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ) qui permet la solubilisation des protéines en préservant leur état rédox ; (iii) la durée de la



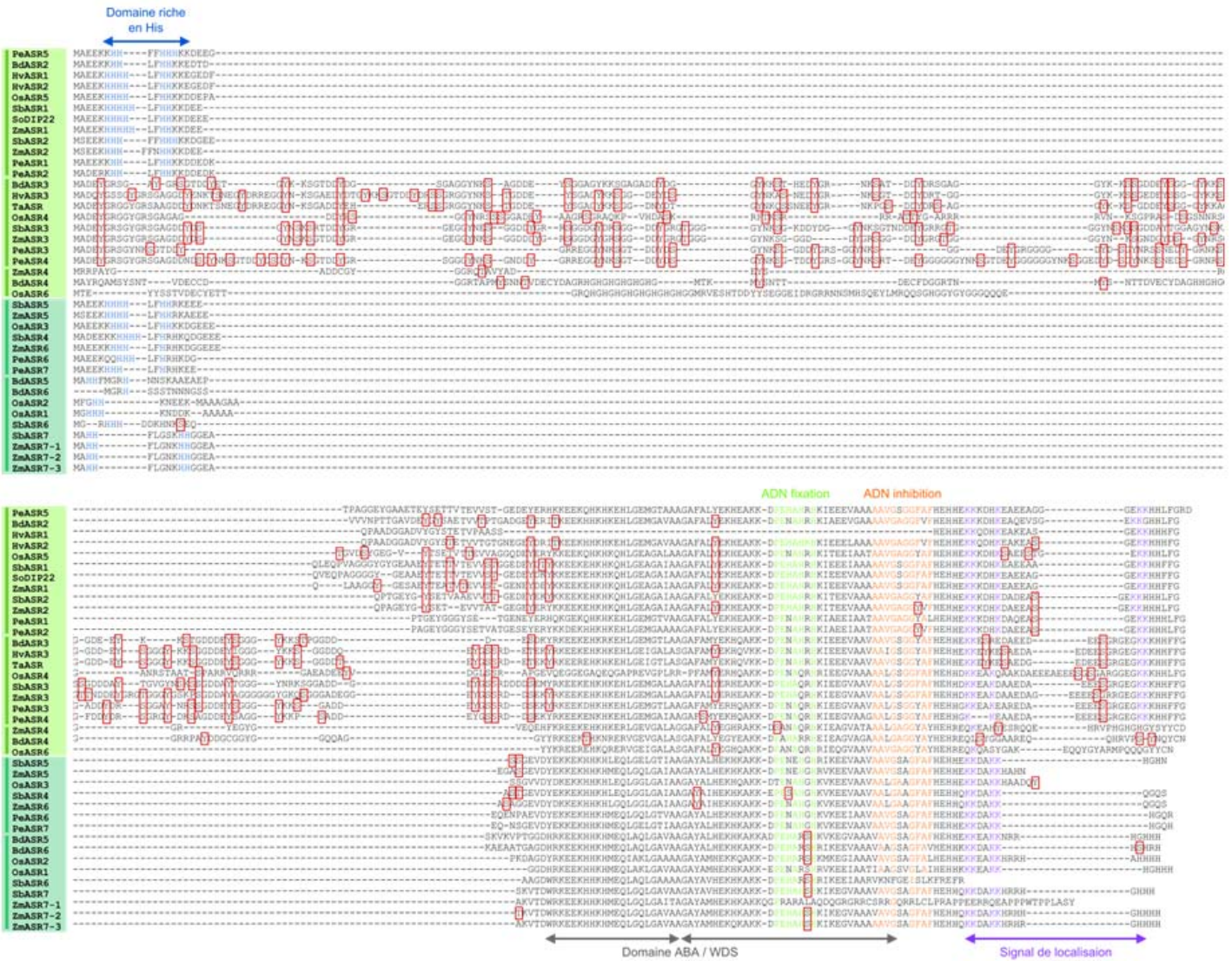
**Figure 3. Influence de la sur-expression du gène *ZmASR1* sur la régulation redox des protéines IPMDH foliaires chez le maïs.** Les protéines solubles (10 µg) de feuilles 11 des ségréants négatifs (WT) et des plantes sur-exprimant le gène *ZmASR1* (*ZmASR1*-OE) cultivés en champs en condition irriguée (Tm) ou de déficit hydrique (St), ont été séparées sur gel SDS-PAGE (12%, p/v) non-réducteur puis analysées par Western blot à l'aide de l'anticorps anti-AtIPMDH1 (1/5000). Les protéines immunodétectées ont été visualisées à l'aide d'un anticorps secondaire immunofluorescent révélé par scan infrarouge (A, panel supérieur). Les protéines présentes sur les membranes ont ensuite été révélées par coloration au nitrate d'argent (A, panel inférieur). Les bandes immunodétectées ont ensuite été quantifiées à l'aide du logiciel ImageQuant (B). Le volume des bandes correspond au pourcentage par rapport à la somme des deux bandes réduite et oxydée.

réduction ou de l'oxydation avec du dithiothréitol (DTT) sous ses deux formes (DTT<sub>red</sub> pour réduite, DTT<sub>ox</sub> pour oxydée) en présence ou non d'une Trx plastidiale, la protéine Trx-m purifiée d'*A. thaliana*. Les résultats obtenus ont montré que l'addition de Tween (0.05%) dans la solution de blocage et une dilution de l'anticorps anti-AtIPMDH1 de moitié amélioreraient les conditions d'immunodétection (résultat non montré). Par ailleurs, l'IAM, le NEM et le sodium disulfite augmentaient légèrement la bande de plus haut poids moléculaire correspondant à la forme réduite de la protéine AtIPMDH1 (Fig. 2A, page 146). En présence de la Trx-m qui accroît le pouvoir réducteur ou oxydant du DTT, les résultats obtenus ont montré que l'addition de DTT<sub>red</sub> permettait la réduction presque totale de la protéine AtIPMDH1, alors que l'ajout de DTT<sub>ox</sub> entraînait légèrement son oxydation (Fig. 2A). Ces résultats ont montré que la protéine AtIPMDH1 existait sous deux formes redox et que ce changement d'état était dépendant des Trx. Ces données corroboraient donc les résultats de He et al. (2009) et validaient le test expérimental mis au point au laboratoire.

Dans ce contexte, nous avons dans un deuxième temps déterminé si l'anticorps anti-AtIPMDH1 pouvait reconnaître les protéines IPMDH de maïs. Les données obtenues par « redox Western » ont montré que les protéines IPMDH de maïs ont un comportement électrophorétique différent sur gel monodimensionnel dénaturant non réducteur, suggérant qu'elles sont, comme la protéine AtIPMDH1, potentiellement soumises à une régulation redox (Fig. 2B). Néanmoins, compte tenu des bandes multiples obtenues, plus ou moins reproductibles, il apparaît nécessaire de développer un anticorps spécifique pour les protéines ZmIPMDH1 et ZmIPMDH2 de maïs pour optimiser ces expériences.

### *3.1.3. Influence de la protéine ZmASR1 sur la régulation redox des protéines IPMDH chez le maïs*

La production d'anticorps dirigés spécifiquement contre les protéines ZmIPMDH1 et ZmIPMDH2 étant un processus long et coûteux, nous avons réalisé des « redox Western » préliminaires avec l'anticorps anti-AtIPMDH1 et des extraits protéiques foliaires de plantes de maïs sur-exprimant le gène *ZmASR1* et de plantes sauvages (ségréants négatifs) cultivées au Magneraud en condition irriguée ou de déficit hydrique. L'anticorps anti-AtIPMDH1 a permis de détecter trois bandes majoritaires pouvant correspondre, d'après leur poids moléculaire apparent, du haut vers le bas à une protéine IPMDH réduite, une protéine IPMDH oxydée et une protéine IPMDH dégradée (Fig. 3A). L'abondance relative des formes réduite et oxydée a été mesurée par analyse d'images. Les résultats obtenus ont montré que la forme réduite était augmentée en réponse au déficit



**Figure 4. Prédiction des sites de phosphorylation pour les protéines ASR des clades I et II de Poacées.** Le domaine riche en His et le domaine ABA/WDS caractéristiques des protéines ASR sont indiqués respectivement par des flèches bleues et grises. Les acides aminés en vert sont identiques aux acides aminés du motif nécessaire à la fixation à l'ADN dépendante du  $Zn^{2+}$  de la protéine SlASR1, alors que ceux en orange correspondent à la séquence empêchant sa fixation (Rom et al. 2006). Les acides aminés en violet sont identiques aux acides aminés du signal de localisation nucléaire identifié chez la protéine LLA23 (Wang et al., 2006). Les clades I et II sont indiqués respectivement par des carrés vert clair et vert foncé. Les rectangles rouges correspondent aux résidus prédits comme phosphorylés par le logiciel NetPhos.

hydrique chez les plantes sauvages et les plantes sur-exprimant le gène *ZmASR1*, alors que la forme oxydée était diminuée chez ces mêmes plantes en réponse au déficit hydrique (Fig. 3B). Ces résultats suggèrent donc que la forme réduite des protéines IPMDH, qui correspond à la forme la plus active chez *A. thaliana* (He et al., 2009), est augmentée en condition de déficit hydrique. Ils sont en accord avec les données métaboliques obtenues avec ces mêmes extraits et qui indiquent une augmentation de la teneur en Leu en condition de déficit hydrique (Virlovet et al., en préparation ; Fig. 6, page 90). Néanmoins, quelque soit la condition de culture ou la forme (réduite/oxydée) considérée, aucune différence n'a été observée entre les plantes sur-exprimant le gène *ZmASR1* et les plantes sauvages (Fig. 3B).

#### *3.1.4. Conclusion*

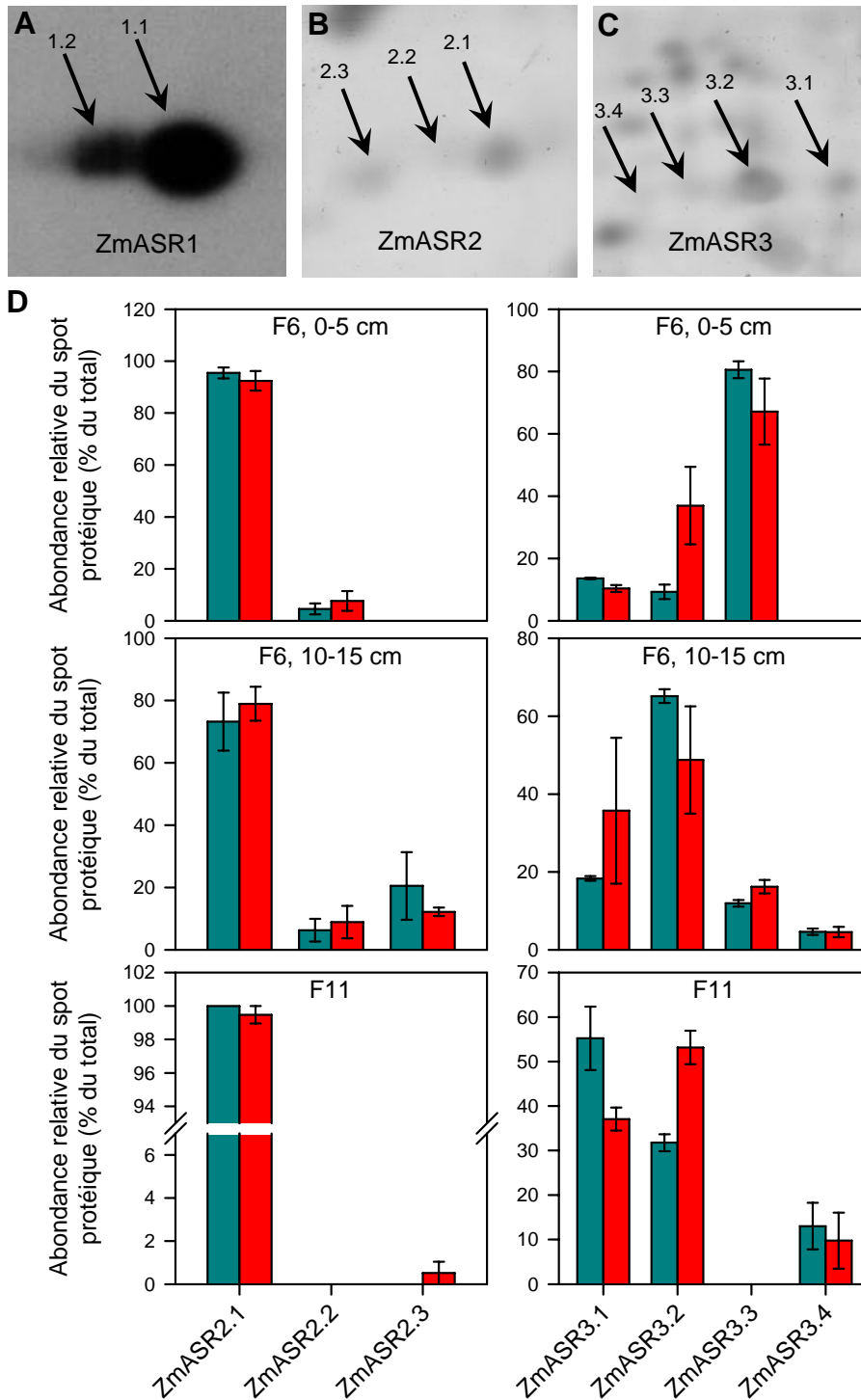
Les résultats préliminaires obtenus avec l'anticorps anti-AtIPMDH1 ont permis de montrer qu'il existait un impact du déficit hydrique sur l'état redox des protéines ZmIPMDH. Néanmoins, ils ne nous permettent pas à l'heure actuelle de conclure quant à l'implication d'un mécanisme redox dans la réponse au stress hydrique médié par la protéine ZmASR1.

### ***3.2. Mise en évidence de modifications post-traductionnelles par phosphorylation chez les protéines ZmASR***

#### *3.2.1. Introduction*

La phosphorylation est une modification post-traductionnelle (MPT) covalente et réversible qui a lieu en faible stoechiométrie sur les chaînes latérales des acides aminés ayant un groupement hydroxyle (Ser, Thr et Tyr), ainsi que sur celles des acides aminés chargés (His et Asp). Catalysée par des protéines kinases, elle est connue avec son corollaire, la déphosphorylation catalysée par des protéines phosphatases, pour être impliquées dans l'activation et l'inactivation des activités enzymatiques, ainsi que dans la modulation des interactions protéine-protéine dans le cadre des réseaux de signalisation (Schulze, 2010).

Diverses données tendent à montrer que les protéines ASR sont soumises à des phosphorylations en réponse à des stress abiotiques, tels que le stress salin et le déficit hydrique. Ainsi, l'analyse protéomique d'extraits racinaires de riz, soumis ou non à un stress salin, a montré que la protéine OsASR5 (RS5) qui appartient au même sous-groupe I-1 que la protéine ZmASR1 (Fig. 4), était présente sur gel 2D sous la forme d'un train de



**Figure 5. Mise en évidence de modifications post-traductionnelles pour les protéines ZmASR1, ZmASR2 et ZmASR3.** (A) Identification de la protéine ZmASR1 sous la forme d'un train de spots par Western 2D à l'aide d'un anticorps polyclonal anti-ZmASR1 et d'extraits protéiques de feuilles 6 en croissance (150 µg) de plantes de la lignée MBS847 cultivées en condition de déficit hydrique. (B-C) Identification des protéines ZmASR2 (B) et ZmASR3 (C) sous la forme d'un train de spots sur gels 2D obtenus à partir d'extraits protéiques (50 µg) de feuilles 6 en croissance de plantes de la lignée A188 cultivées en condition de déficit hydrique et colorés au nitrate d'argent. (D) Abondance relative des spots ZmASR2 et ZmASR3 dans différentes portions foliaires (zone d'élongation : F6, 0-5 cm ; zone différenciée : F6, 15-20 cm ; zone mature : F11) en condition irriguée (bleu) et de déficit hydrique (rouge). Les valeurs correspondent à la moyenne ± SE rapportée au total du train (n = 4 pour F6 ; n = 2 pour F11).

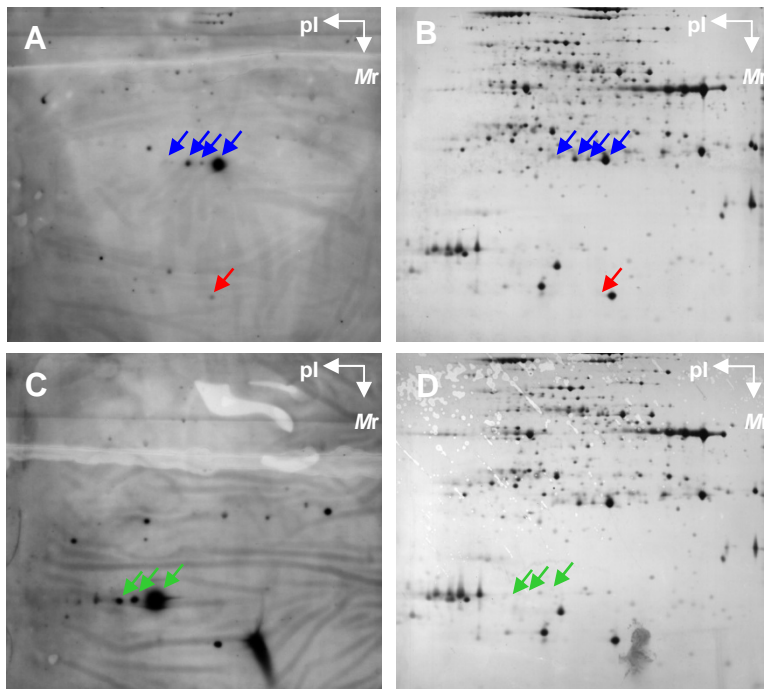
spots protéiques, ce qui suggère qu'elle est soumise à des phosphorylations (Salekdeh et al., 2002). De plus, il a récemment été montré que cette protéine était immunodétectée, après séparation sur gel 2D (Western 2D) d'extraits protéiques foliaires de plantes soumises à un déficit hydrique, par un anticorps dirigé contre les Ser phosphorylées, ce qui suggère qu'elle possède au moins un résidu Ser phosphorylé (Salekdeh et al., 2002 ; Ke et al., 2009). De manière concordante, de nombreux sites de phosphorylation, en particulier des Ser et des Tyr, sont prédits chez l'ensemble des protéines ASR de Poacées (Fig. 4). Au laboratoire, l'analyse de gels 2D et des Western 2D réalisés à l'aide d'extraits protéiques foliaires de maïs et d'un échantillon d'anticorps polyclonal dirigé contre la protéine ZmASR1 (don de M. Höefer et P. Westhoff, Düsseldorf, Allemagne), ont montré que les isoformes ZmASR1, ZmASR2 et ZmASR3 sont présentes sous la forme de trains de spots d'isoformes, ce qui suggère que ces trois protéines sont également soumises à des phosphorylations (Fig. 5A, B, C). De manière intéressante, l'analyse quantitative des trains de spots a montré que l'abondance relative de certaines isoformes des protéines ZmASR2 et ZmASR3, était régulée au cours du développement de la feuille en réponse au déficit hydrique (Fig. 5D).

Dans ce contexte, nous avons recherché si les protéines ZmASR pouvaient être soumises à des phosphorylations en réponse à la sécheresse à l'aide d'approches *in vitro* et *in vivo*. Dans ce but, deux types d'outils ont été produits : (1) les protéines recombinantes GST-ZmASR1 et ZmASR1 pour analyser par MS les sites phosphorylés chez ces protéines après leur phosphorylation *in vitro* à l'aide de différentes protéines kinases ; (2) deux sérums purifiés dirigés contre des peptides communs à l'ensemble des membres de la famille ZmASR et un sérum purifié dirigé contre un peptide spécifique de la protéine ZmASR1 pour, d'une part, déterminer par Western 2D, après enrichissement d'extraits foliaires en phosphoprotéines, l'état de phosphorylation des protéines ZmASR, et d'autre part, les purifier en quantité suffisante pour déterminer par MS les sites de phosphorylation *in vivo*. Pour identifier les sites de phosphorylation *in vivo*, une alternative a consisté à analyser par MS des extraits protéiques de feuilles de maïs enrichis en phosphopeptides. L'ensemble de ce travail, réalisé au cours de ma thèse, a fait l'objet du stage de M1 de T. Vain (février-juillet 2010) et d'une collaboration étroite avec PAPPSO.

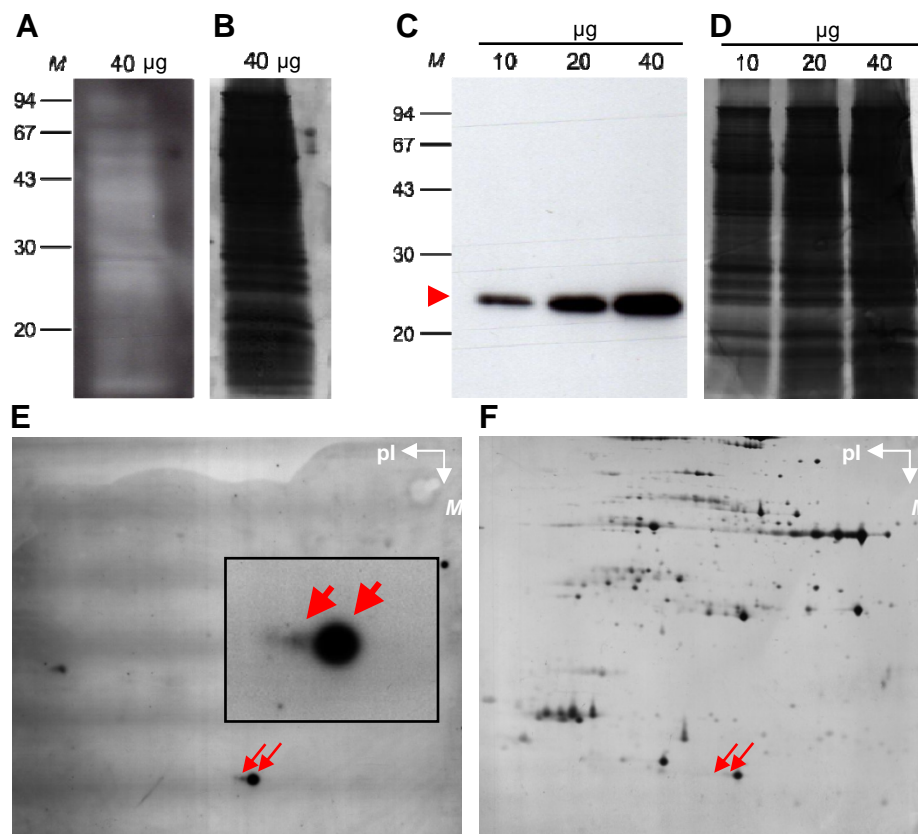
### 3.2.2. Développement d'outils biochimiques pour étudier les MPT des protéines ZmASR

#### 3.2.2.1. Caractérisation des anticorps anti-famille ZmASR et anti-ZmASR1





**Figure 6. Détermination de la spécificité de l'anticorps anti-famille ZmASR à l'aide d'extraits protéiques foliaires de maïs.** Les protéines solubles (150  $\mu$ g) de la feuille de l'épi de la lignée MBS847 ont été séparées sur gels 2D puis analysées par Western blot à l'aide des anticorps anti-famille ZmASR EP37 (A-B, 1/5000), anti-famille ZmASR EP38 (C-D, 1/10000) purifiés. Le temps d'exposition des films ECL+ (A-C) est de 30 min. L'ensemble des protéines présentes sur les membranes ont été révélées par une coloration à l'argent colloïdal (B-D). Une analyse MS des spots protéiques piqués sur des gels colorés au bleu de coomassie a permis de montrer que la flèche rouge correspondait à la protéine ZmASR1, alors que les flèches bleues et vertes ne correspondaient pas à des protéines ZmASR.

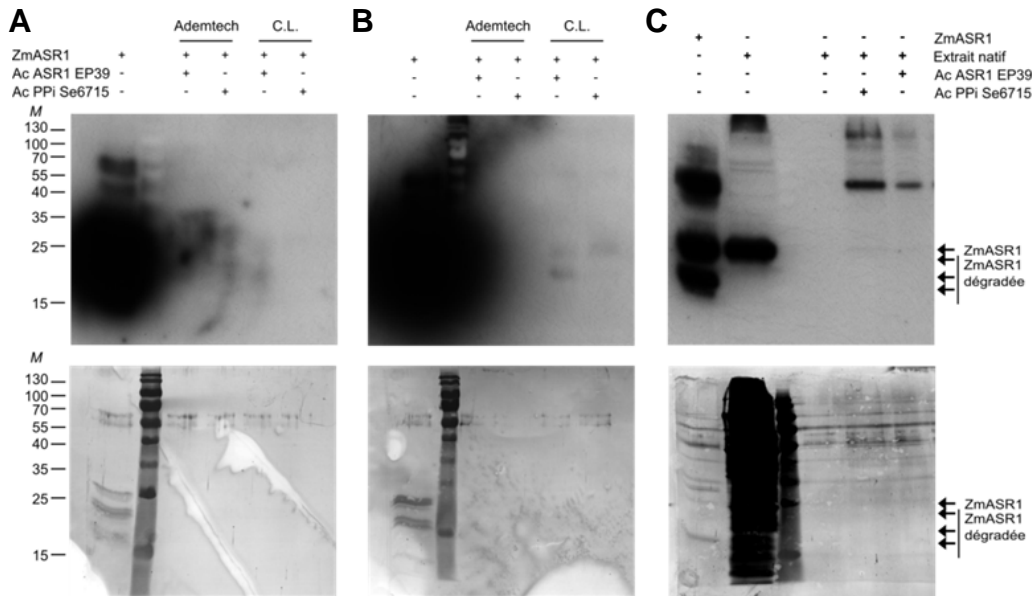


**Figure 7. Détermination de la spécificité de l'anticorps anti-ZmASR1 à l'aide d'extraits protéiques foliaires de maïs.** (A-D) Les protéines solubles (10, 20, 40 $\mu$ g) de la feuille 5 des lignées B73 et F2 en mélange stoechiométrique ont été séparées par gels SDS-PAGE puis analysées par Western blot à l'aide du sérum PPI Se6715 (1/20000, A-B) et de l'anticorps anti-ZmASR1 EP39 (1/20000, C-D). Les films ont été révélés pendant 30 secondes (A-C) et les membranes colorées à l'argent colloïdal (B-D). La pointe de flèche rouge indique la protéine ZmASR1. (E-F) Les protéines solubles (150  $\mu$ g) de la feuille de l'épi de la lignée MBS847 ont été séparées sur gels 2D puis analysées par Western blot à l'aide l'anticorps anti-ZmASR1 EP39 (1/20000). Le film ECL+ (E) a été exposé 30 min et les membranes ont été révélées par une coloration à l'argent colloïdal (F). Le carré dans le panel E correspondant à un agrandissement de la portion du gel où la protéine ZmASR1 a été immunodétectée. Une analyse MS des spots protéiques piqués sur des gels colorés au bleu de coomassie a permis de montrer que la flèche rouge correspondait à la protéine ZmASR1. *M* : marqueur de poids moléculaire (kDa).

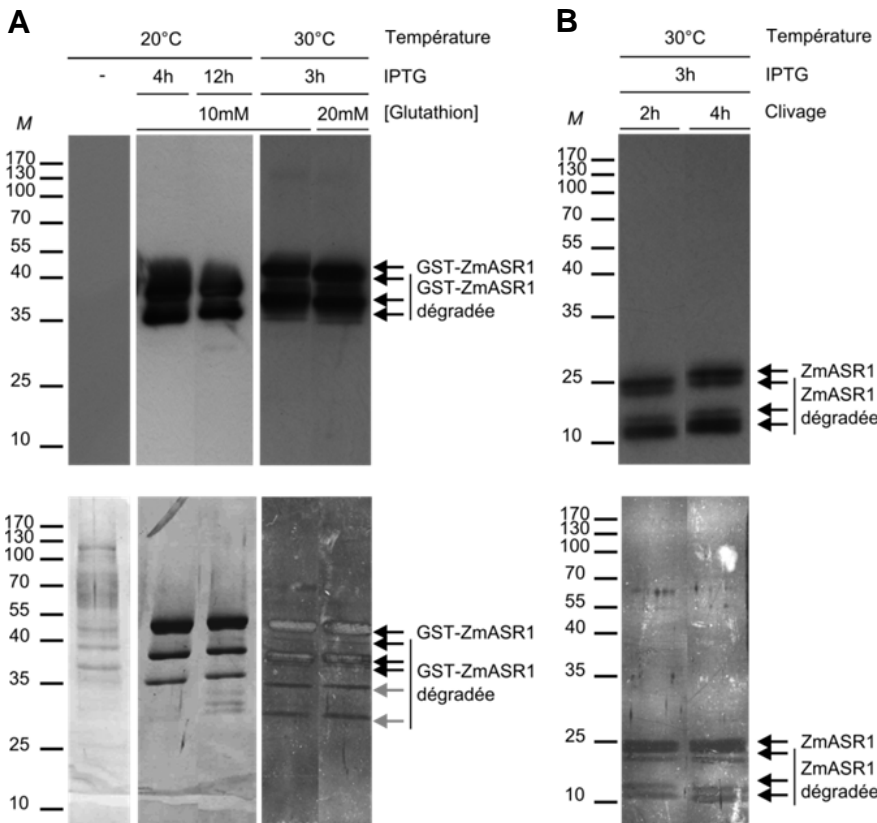
Deux types d'anticorps ont été produits par la société Eurogentec : (1) des anticorps anti-famille ZmASR suite à l'injection dans des lapins des peptides EP37 et EP38 communs à l'ensemble des séquences protéiques ZmASR ; (2) un anticorps anti-ZmASR1 suite à l'injection dans des lapins du peptide EP39, dont la séquence est spécifique de la protéine ZmASR1 (voir Matériels & Méthodes, Fig. 14, page 146 et Tableau 4, page 147). Au cours de la synthèse des anticorps, nous avons caractérisé trois types de sérums à l'aide d'extraits protéiques totaux de feuilles de l'épi de la lignée de maïs MBS847 : (1) les sérums pré-immuns (PPi) prélevés avant injection du(des) peptide(s) d'intérêt ; (2) les sérums GP prélevés après injection du(des) peptides d'intérêt ; (3) les sérums purifiés à l'aide d'une colonne d'affinité sur laquelle a été fixé le peptide d'intérêt (voir Matériels & Méthodes, Fig. 14, page 146 et Tableau 4, page 147).

La caractérisation des sérums PPi et GP obtenus pour l'ensemble des membres de la famille ZmASR, nous a permis de sélectionner un lapin présentant un spectre d'action assez large pour la famille ZmASR (voir Matériels & Méthodes, Tableau 4, page 147). Le sérum GP obtenu a été purifié à 97,3% et 98,8% avec une colonne d'affinité sur laquelle a été fixé respectivement le peptide EP37 et le peptide EP38 (données Eurogentec). De manière inattendue, les résultats obtenus par Western 2D ont montré que chaque sérum révélait un seul train de spots spécifique (Fig. 6A-D). Les analyses d'identification par LC-MS/MS ont montré que ces spots ne correspondaient pas à des protéines ZmASR (données non montrées). Aucune étude ultérieure n'a donc été menée avec les anticorps anti-famille ZmASR produits.

La caractérisation des sérums PPi et GP obtenus pour la protéine ZmASR1, nous a tout d'abord permis de sélectionner un autre lapin reconnaissant majoritairement la protéine ZmASR1 (voir Matériels & Méthodes, Tableau 4, page 147). Le sérum GP obtenu a ensuite été purifié à 96,8% avec le peptide spécifique EP39 (donnée Eurogentec). Les analyses par Western blot après séparation par SDS-PAGE, ont montré que l'anticorps anti-ZmASR1 purifié reconnaissait une bande protéique, dont le poids moléculaire correspondait à celui de la protéine ZmASR1, alors que le sérum PPi ne la reconnaissait pas (Fig. 7A-D). L'anticorps anti-ZmASR1 purifié était donc spécifique de la protéine ZmASR1. Des analyses par Western 2D ont ensuite montré que la protéine ZmASR1 était présente sous la forme d'un train de spots non détectable sur les gels 2D et les membranes colorées par les méthodes non spécifiques (nitrate d'argent, argent colloïdal, et bleu de coomassie), ce qui a permis de confirmer les résultats préliminaires obtenus au laboratoire avec l'échantillon d'anticorps polyclonal anti-ZmASR1 (Fig. 7E-F).



**Figure 8. Détermination du caractère immunoprécipitant de l'anticorps anti-ZmASR1 à l'aide de la protéine ZmASR1 et d'extraits protéiques foliaires totaux de maïs.** (A-B) Mise en place du protocole à l'aide de la protéine recombinante ZmASR1 (200 ng), de l'anticorps anti-ZmASR1 EP39 purifié (2 µg) et du sérum pré-immun Se6715-Ppi (10 µl) selon les protocoles d'Ademtech ou de C. Lachaud (UMR 5546 CNRS, Toulouse). Après une liaison avec des billes magnétique, l'anticorps ou le sérum a été incubé avec la protéine recombinante pendant 1 h à température ambiante (A) ou la nuit à 4°C (B). Le contrôle positif correspond à 200ng de la protéine recombinante ZmASR1 seule et sans traitement. (C) Immunoprécipitation d'un extrait protéique natif de la feuille 5 de la lignée MBS847 (300 µg) avec l'anticorps anti-ZmASR1 EP39 purifié (2 µg) et le sérum Se6715-Ppi (10 µl) selon le protocole de C. Lachaud avec une incubation d'une nuit à 4°C. Les contrôles positifs correspondent à 20ng de la protéine recombinante ZmASR1 et 50µg d'extrait protéique seul et sans traitement. Après élimination de l'anticorps grâce aux billes magnétiques, les protéines purifiées ont été séparées sur gels SDS-PAGE (12%, p/v) puis analysées par Western blot avec l'anticorps anti-ZmASR1 purifié (1/20000, panel supérieur). L'ensemble des protéines purifiées a ensuite été révélée par coloration des membranes à l'argent colloïdal (panel inférieur). Les signes + et – correspondent à la présence ou absence des composés lors des essais. *M* : marqueur de poids moléculaire (kDa).



**Figure 9. Détermination des conditions optimales de production des protéines GST-ZmASR1 et ZmASR1.** La protéine recombinante ZmASR1 avec une étiquette GST en amont a été produite par induction avec addition d'IPTG (1 mM) durant la phase exponentielle de croissance de la culture bactérienne à une température de 20°C ou de 30°C. Les extraits protéiques bruts ont été purifiés en condition native à l'aide une colonne d'affinité, avec une élution soit par compétition avec une solution de glutathion réduit pour l'obtention de la protéine GST-ZmASR1 (A), soit par clivage enzymatique de l'étiquette GST sur colonne pour l'obtention de la protéine ZmASR1 (B). Les protéines recombinante (1 µg) ont été séparées par SDS-PAGE (12%, p/v) et révélées par Western blot à l'aide de l'anticorps anti-ZmASR1 purifié (1/20000). La révélation a été faite par contact du film sur la membrane (panel supérieur). L'ensemble des protéines présentes sur la membrane a été révélé par une coloration à l'argent colloïdal (panel inférieur). *M* : marqueur de poids moléculaire (kDa).

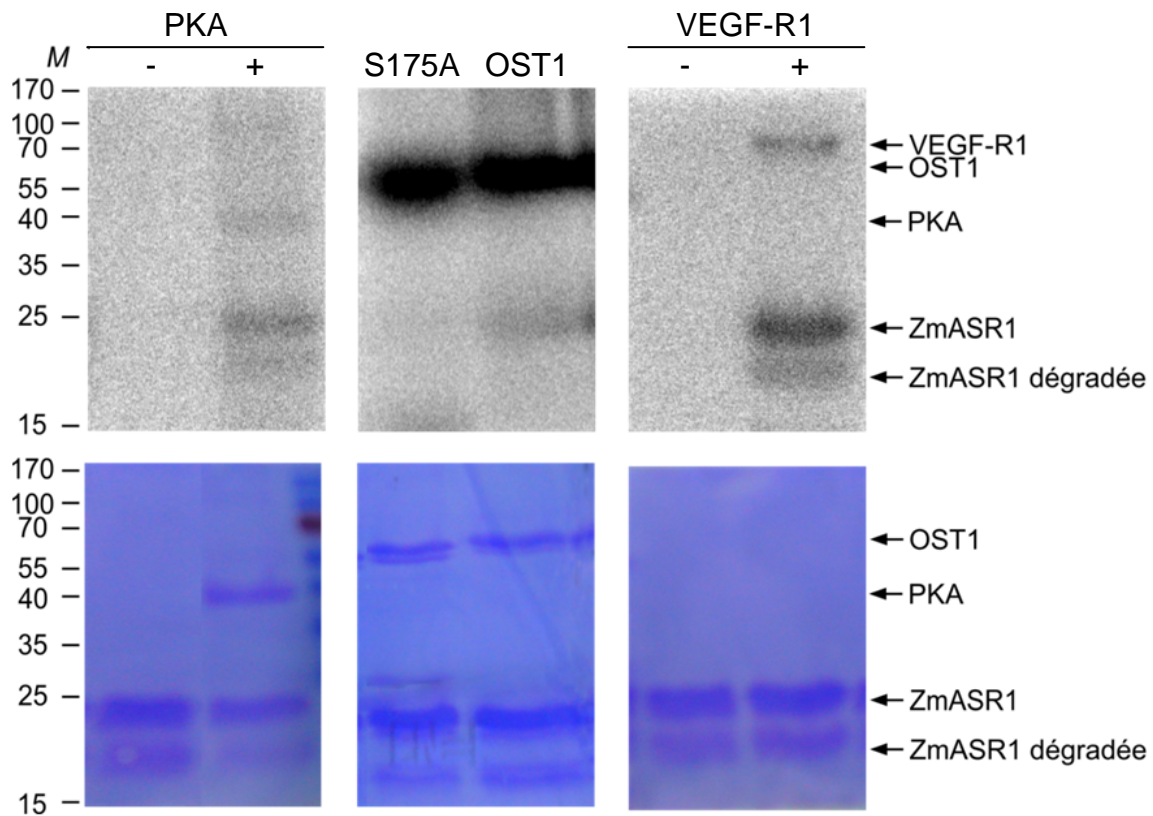
L'étape suivante a consisté à déterminer si l'anticorps anti-ZmASR1 était immunoprécipitant. Des essais réalisés avec la protéine A-sepharose n'ayant pas été concluants (données non montrés), deux protocoles (Ademtech et C. Lachaud, UMR 5546 CNRS, Toulouse) basés sur l'utilisation de billes magnétiques couplées à un mélange de protéines A et G, ont été testés à l'aide de la protéine recombinante ZmASR1 (voir §3.2.2.2 suivant). L'analyse des protéines immunoprécipitées par Western blot avec l'anticorps anti-ZmASR1 purifié, a tout d'abord montré que seul le protocole de C. Lachaud et une incubation d'une nuit à 4°C, permettaient de détecter des bandes très faibles spécifiques de la protéine ZmASR1 (Fig. 8A vs Fig. 8B). Dans ces conditions, nous avons ensuite tenté d'immunoprécipiter la protéine ZmASR1 présente dans des extraits protéiques foliaires de la lignée MBS847. Les résultats obtenus après Western blot ont montré que le signal correspondant à la protéine ZmASR1 était très faible par comparaison avec le signal obtenu avec la protéine recombinante ZmASR1 ou l'extrait protéique foliaire non immunoprécipités (Fig. 8C). L'anticorps anti-ZmASR1 purifié n'a donc pas permis d'entreprendre une purification de la protéine ZmASR1 par immunoprécipitation.

#### 3.2.2.2. Caractérisation des protéines GST-ZmASR1 et ZmASR1

La société Protéogenix a réalisé le clonage de l'ADNc du gène *ZmASR1* de la lignée parentale de maïs MBS847 dans un vecteur d'expression inductible par l'isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG 1 mM) et la production des protéines recombinantes GST-ZmASR1 et ZmASR1 chez *E. coli*. Pour optimiser la production et la purification de ces protéines, nous avons réalisé, en concertation avec Protéogenix, des Western blot à l'aide de l'anticorps anti-ZmASR1 purifié et des analyses LC-MS/MS des bandes visibles sur gel SDS-PAGE et immunodétectées par cet anticorps.

La protéine GST-ZmASR1 a été produite après induction par l'IPTG, pendant un temps et à une température variables, puis purifiée, à l'aide d'une colonne d'affinité pour l'étiquette GST, avec des concentrations de glutathion réduit variables. Les analyses ont montré qu'en absence d'IPTG, aucune protéine n'était détectée par l'anticorps anti-ZmASR1 (Fig. 9A). En revanche, en présence d'IPTG, plusieurs bandes protéiques ont été immunodétectées, la bande majoritaire correspondant à la protéine GST-ZmASR1 intacte et les autres bandes, moins nombreuses après 3 h d'induction à 30°C qu'après 4 et 12 h à 20°C, à des produits de dégradation (Fig. 9A).

La protéine ZmASR1 a été obtenue par clivage enzymatique de l'étiquette GST après fixation de la protéine GST-ZmASR1 sur colonne. Après clivage, la protéine ZmASR1 recombinante contenait toutefois encore cinq acides aminés de l'étiquette GST

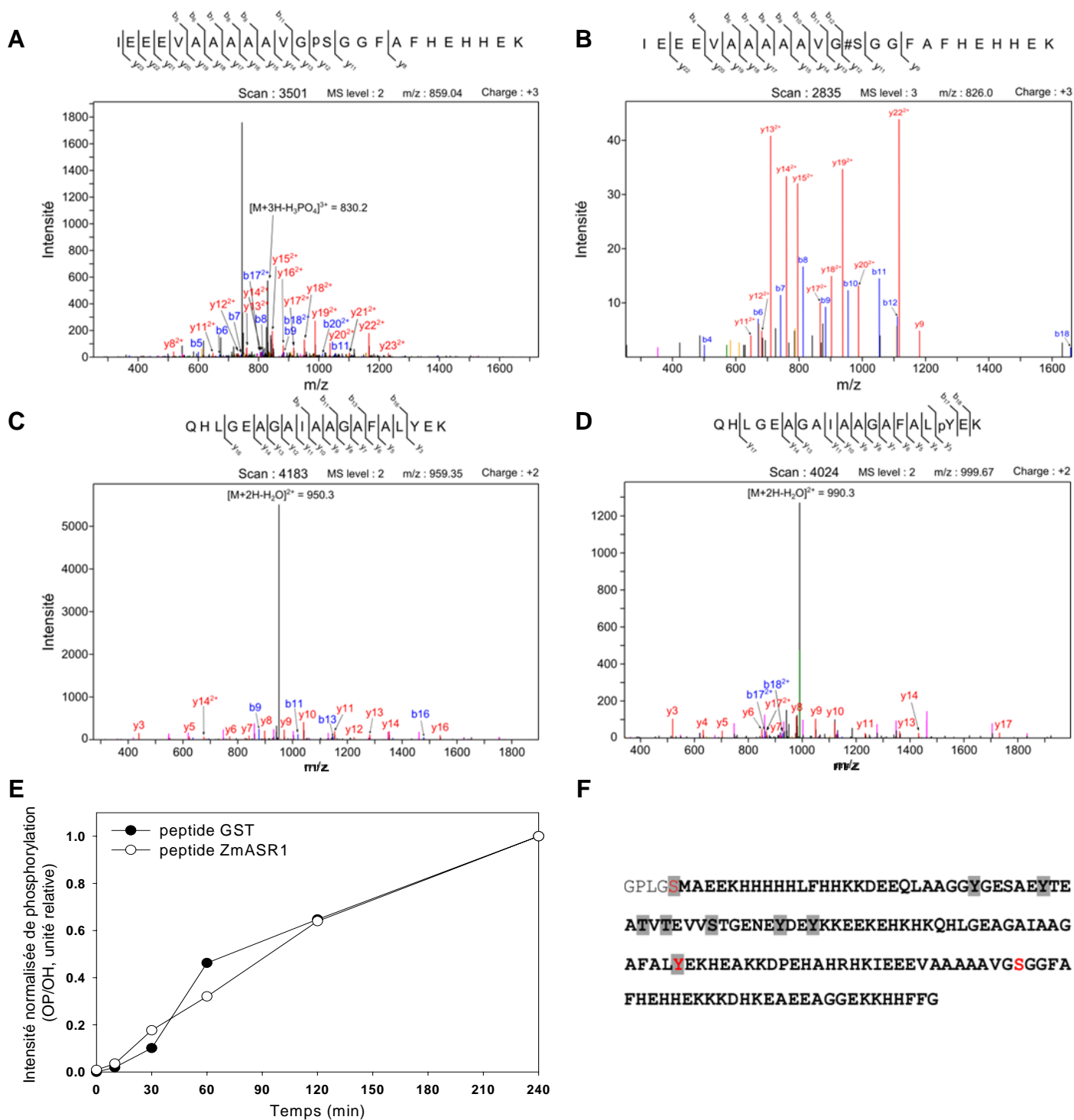


**Figure 10. Mise en évidence d'une phosphorylation *in vitro* chez la protéine ZmASR1.** La protéine recombinante ZmASR1 (5 à 10 $\mu$ g) a été incubée à 30°C dans un milieu reconstitué de phosphorylation à l'aide de [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP en présence ou en absence des protéines kinases PKA (5 U), OST1 active (OST1 ; 2.5 $\mu$ g), OST1 inactive (S175A ; 2.5  $\mu$ g) ou VEGF-R1 (200 ng), pendant 60 min (PKA) ou 240 min (OST1 et VEGF-R1). Les protéines ont été séparées par SDS-PAGE (12%, p/v), visualisées par PhosphoImager (protéines phosphorylées, panel supérieur), puis révélées par coloration au bleu de coomassie (protéines totales, panel inférieure). Les signes + et - correspondent à la présence ou l'absence des protéines kinases lors des essais. *M* : marqueur de poids moléculaire (kDa).

en amont de sa séquence N-terminale. Quelque soit la durée du clivage, quatre bandes protéiques ont été immunodétectées par l'anticorps anti-ZmASR1, la bande majoritaire correspondant à la protéine ZmASR1 et les autres bandes à des produits de dégradation de la protéine ZmASR1 (Fig. 9B). Après 2h de clivage, deux bandes supplémentaires avoisinant les 35-40 kDa, ont été détectées après un temps plus long d'exposition (résultat non montré). Il s'agissait très vraisemblablement de la bande GST-ZmASR1 non digérée et co-éluée. Ces bandes disparaissaient après 4 h de clivage. Par ailleurs, l'analyse par MS a montré la présence significative de l'étiquette GST dans toutes les bandes protéiques analysées. Les peptides obtenus étant des peptides centraux de la protéine GST, il était difficile d'interpréter leurs présences compte tenu de la taille des bandes protéiques analysées. Il y a probablement eu des phénomènes de diffusion lors de la séparation par SDS-PAGE ou du piquage du gel, les extraits protéiques purifiés de protéine ZmASR1 étant proche et analysés en même temps que les extraits protéiques purifiés de protéine GST-ZmASR1.

### 3.2.3. Identification de sites de phosphorylation *in vitro* chez la protéine ZmASR1

Une fois ces outils biochimiques produits, nous avons dans un premier temps étudié si la protéine ZmASR1 purifiée pouvait être soumise à une phosphorylation *in vitro*. Des essais de phosphorylation « chaud » ont été réalisés avec la protéine ZmASR1 purifiée, un mélange d'ATP marqué ( $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ ) et non marqué et des protéines kinases recombinantes. Compte tenu des sites de phosphorylation prédits chez la protéine ZmASR1 (Fig. 4), cinq protéines kinases ont été testés : (1) la protéine Tyr kinase VEGF-R1 (« vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor-receptor 1 ») humaine (Calbiochem) ; (2) la protéine Ser/Thr kinase A (PKA) de bœuf (Sigma) ; (3) la protéine Ser/Thr kinase AtSnRK1.1 correspondant à la sous-unité catalytique de la protéine AtSnRK1 (don de M. Thomas, UMR 8618 CNRS, Orsay ; Crozet et al., 2010) ; (4) la protéine Ser/Thr kinase AtOST1 (SRK2E/SnRK2.6) d'*A. thaliana* (don de C. Laurière, UPR2355 CNRS, Gif-sur-Yvette ; Boudsocq et al., 2004) ; (5) la protéine S175A correspondant à la forme inactive de la protéine AtOST1 suite au remplacement de la Ser située en position 175 par une Ala (don de C. Laurière, UPR2355 CNRS, Gif-sur-Yvette ; Boudsocq et al., 2007). Les résultats obtenus ont montré que la protéine ZmASR1 n'était pas phosphorylée par les protéines AtSnRK1.1 (résultat non montré) et S175A (Fig. 10). En revanche, un signal a été observé à la suite de la phosphorylation par les kinases PKA, AtOST1 et VEGF-R1 (Fig. 10).



**Figure 11. Identification par LC-MS/MS des sites phosphorylés *in vitro* chez la protéine ZmASR1.** La protéine ZmASR1 a été incubée pendant 240 min (A-D) ou un temps variable (E) à 30°C dans un milieu reconstitué de phosphorylation en présence de la protéine OST1 active (A-B, E) ou de la protéine VEGF-R1 (C-D). Les protéines ont été séparées par SDS-PAGE (12%, p/v), révélées par coloration au bleu de coomassie puis analysée par LC-MS/MS. (A) Spectre MS2 montrant la perte de l'acide phosphorique après fragmentation pour le peptide chargé IEEEVAAA AVGPPSGGGF A F H E H H E K phosphorylé. (B) Spectre MS3 confirmant le site phosphorylé. (C) Spectre MS2 pour le peptide QHLGGEAGAI AAGAFALY EK non phosphorylé. (D) Spectre MS2 pour le peptide QHLGGEAGAI AAGAFALpY EK présentant un delta de masse de +80 (HPO<sub>3</sub>) avec le peptide non phosphorylé. Pour l'ensemble des spectres, les couleurs correspondent aux types d'ions : b en bleu, y en rouge, une perte de -18 (H<sub>2</sub>O) ou de -17 (NH<sub>3</sub>) en rose pour les ions b et en orange pour les ions y. (E) Cinétique du rapport des peptides phosphorylés sur les peptides non-phosphorylés (OP/OH) pour les deux sites de phosphorylation identifiés sur la protéine recombinante ZmASR1 par la protéine OST1 après normalisation avec la valeur maximale obtenue après 4 h d'incubation. (F) Les sites de phosphorylation identifiés sur la protéine ZmASR1 recombinante comprenant les résidus GST (en gris) restant après clivage enzymatique, sont représentés en rouge. Les sites prédits de phosphorylation sont représentés par des rectangles gris.

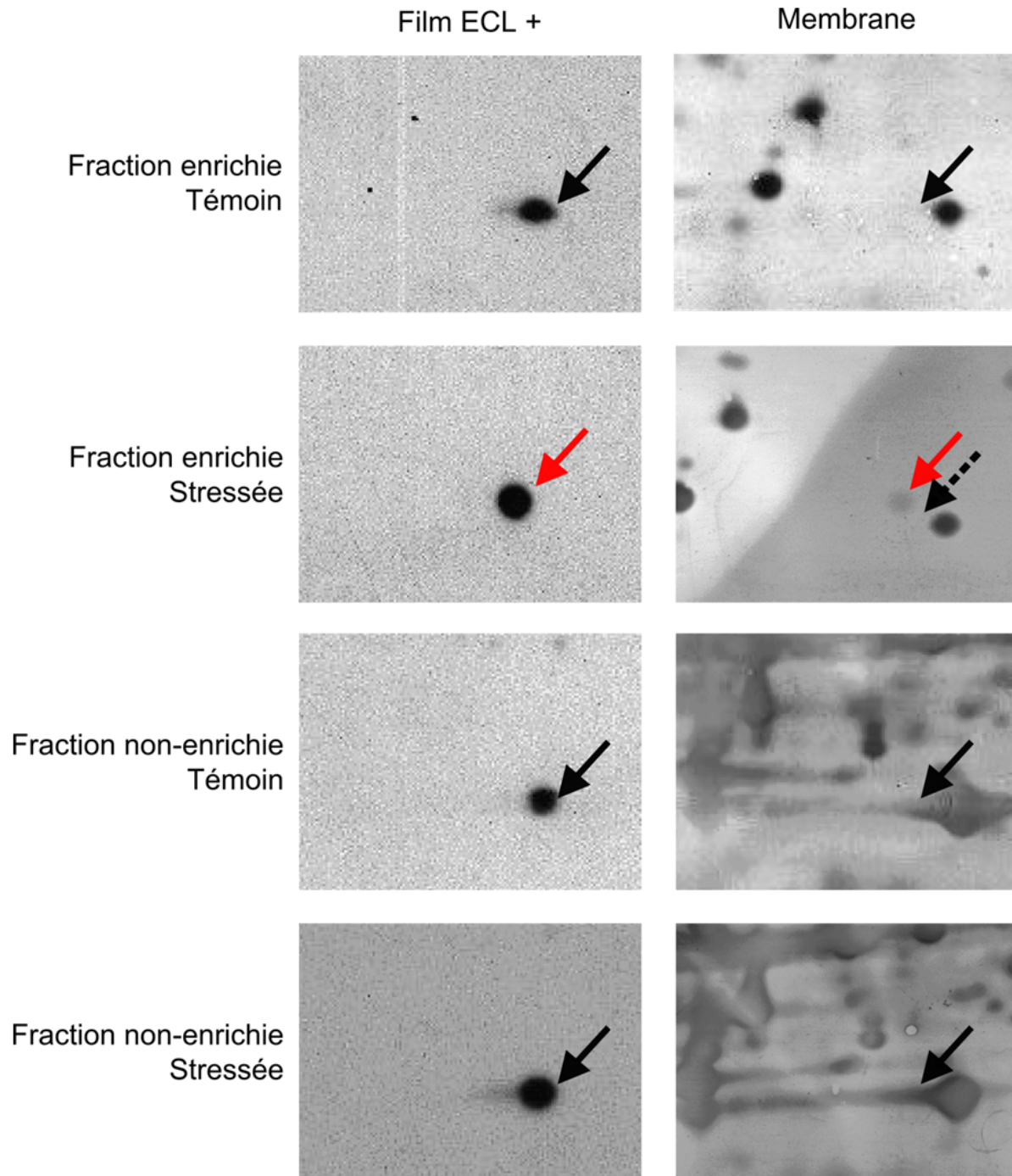
Dans un deuxième temps, nous avons cherché à identifier les sites de la protéine ZmASR1 phosphorylés *in vitro* par ces trois protéines kinases recombinantes. Des phosphorylations « froides » ont été réalisées avec la protéine ZmASR1 purifiée et de l'ATP non marqué. L'analyse par MS des bandes protéiques correspondant à la protéine ZmASR1, a permis d'identifier trois sites de phosphorylation : (1) le premier, prédit et obtenu avec les trois protéines kinases, correspondait à la Ser (S5) de l'étiquette GST restant après clivage enzymatique (Fig.11F) ; (2) le second, non prédit et obtenu avec la protéine AtOST1, correspondait à une Ser (S107) située au niveau de la séquence présentant de forte similitude avec le domaine de la protéine SIASR1 inhibant la fixation à l'ADN (Fig. 11A-B) ; (3) le troisième, prédit et obtenu avec la protéine VEGF-R1, correspondait à une Tyr (Y78) située en amont de la séquence présentant de forte similitude avec le domaine de la protéine SIASR1 impliqué dans la fixation à l'ADN (Fig 8C-D). La cinétique de phosphorylation réalisée ensuite « à froid » avec la protéine AtOST1 a montré que la phosphorylation des résidus S5 et S107 augmentait de manière linéaire avec le temps, suggérant qu'elle n'était pas un artefact (Fig. 11E). Une expérience similaire avec la protéine VEGF-R1 n'a pu être réalisée car le résidu Y78 phosphorylé était très peu abondant, son identification ayant, en effet, nécessité un enrichissement en phosphopeptides.

Dans un troisième temps, nous avons voulu déterminer si la phosphorylation de la protéine ZmASR1 pouvait varier en réponse au déficit hydrique. Des essais de phosphorylation « chaud » ont été réalisés avec un extrait protéique natif de feuilles matures de maïs soumis ou non à un déficit hydrique et un mélange d'ATP marqué ( $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ ) et non marqué. Afin de pouvoir distinguer la phosphorylation de la protéine ZmASR1 de celle des autres protéines de même poids moléculaire présentes dans l'extrait natif, nous avons utilisé la protéine GST-ZmASR1 purifiée, couplée au préalable à une résine de glutathion-sepharose pour permettre sa purification par centrifugation après la réaction de phosphorylation. Aucune incorporation d'ATP « chaud » n'a pu être détectée (donnée non montrée). La coloration du gel SDS-PAGE obtenu au bleu de coomassie ayant montré que la protéine GST-ZmASR1 n'avait pas été ou presque purifiée, des mises au point sont donc nécessaires avant de pouvoir conclure.

### 3.2.4. Mise en évidence de phosphorylations *in vivo* chez les protéines ZmASR

#### 3.2.4.1. Analyse de fractions foliaires enrichies en phosphoprotéines à l'aide de l'anticorps anti-ZmASR1





**Figure 12. Mise en évidence de la protéine ZmASR1 dans des extraits foliaires de maïs enrichis en phosphoprotéines.** Les protéines solubles (4 mg) de la feuille 4 de la lignée MBS847 cultivée en condition irriguée (témoin) et de déficit hydrique (stressé) ont été enrichies en phosphoprotéines à l'aide d'une colonne d'affinité Pro-Q Diamond. La fraction enrichie (100 µg) et la fraction non-retenue (non-enrichie) sur la colonne (300 µg) ont été séparées par gels 2D et analysées par Western blot à l'aide de l'anticorps anti-ZmASR1 EP39 purifié (1/20000). Le temps d'exposition des films ECL+ est de 10min. Les protéines présentes sur les membranes ont ensuite été révélées par coloration à l'or colloïdal. La protéine ZmASR1 (flèches) présente un décalage au niveau du pI entre la fraction enrichie-St (flèche rouge) et les autres fractions enrichie-témoin et non-enrichies (flèche noire).

Pour confirmer les résultats obtenus *in vitro*, nous avons cherché à savoir si la protéine ZmASR1 pouvait être soumise à une phosphorylation *in vivo*. Des Western 2D ont tout d'abord été réalisés avec l'anticorps anti-ZmASR1 et un extrait protéique de feuilles matures de maïs cultivés en condition irriguée (témoin) ou de déficit hydrique (stressée), et enrichis ou pas en phosphoprotéines à l'aide d'une colonne d'affinité Pro-Q Diamond. Un seul spot protéique a été immunodéecté par l'anticorps anti-ZmASR1 quelque soit la condition de culture et la fraction considérées (Fig. 12). Comme attendu, son intensité était plus forte dans les extraits de plantes stressées par comparaison aux extraits de plantes témoins quelque soit la fraction considérée (Fig. 12). De plus, il était détectable après coloration à l'or colloïdal sur la membrane de la fraction enrichie stressée, alors qu'il ne l'était pas sur celle de la fraction enrichie témoin comme sur celle des deux fractions non-enrichies (Fig. 12). Nous avons comparé sa position sur chacun des films en superposant chaque film avec sa membrane respective à l'aide de repères communs, tels que les extrémités des supports et les artefacts décelables sur les films. Les spots protéiques immunodéectés des fractions non-enrichie étaient co-localisés (Fig. 12). En revanche, le spot protéique immunodéecté dans la fraction enrichie stressée, était légèrement plus acide que le spot protéique immunodéecté dans la fraction enrichie témoin, ce qui suggère que la protéine ZmASR1 est soumise à une phosphorylation en condition de déficit hydrique (Fig. 12). Pour le confirmer, il aurait fallu réaliser une co-migration avec des extraits enrichis en phosphoprotéines témoin et stressés ; malheureusement, il ne nous restait plus d'extrait enrichi stressé. Nous avons donc juste pu réaliser une co-migration sur gel 2D avec les extraits protéiques enrichis de plantes témoins et les extraits non-enrichis de plantes témoins et stressées qui restaient de l'expérience précédente. Les résultats obtenus ont montré que le spot immunodéecté dans la fraction enrichie témoin co-localisait avec celui des fractions non-enrichies (donnée non montrée). Ce résultat suggère donc que la protéine ZmASR1 est phosphorylée en condition témoin ou que des protéines non phosphorylées sont retenues par la colonne d'affinité. Dans ce cas, il apparaît surprenant de n'avoir détecté qu'un seul spot dans la fraction enrichie stressée.

Nous avons ensuite réalisé des Western 2D à l'aide d'anticorps ciblant des Ser et des Tyr phosphorylées. Un premier essai basé sur le protocole décrit par Ke et al. (2009) n'ayant pas été concluant, nous avons tout d'abord optimisé les conditions expérimentales à l'aide d'extraits protéiques foliaires de riz (données non montrées). Nous avons ensuite appliqué le protocole optimisé à des extraits protéiques de feuilles matures de maïs témoins et stressés enrichis en phosphoprotéines. Aucun spot protéique susceptible de correspondre

Protéine <sup>a</sup>		Nombre de				Peptide <sup>c</sup>				
Nom	Description	E value	PM	spectres	peptides	PAI <sup>b</sup>	Position	Sequence	Numéro du scan	E-value
ZmASR2	GRMZM2G057410_P01	-3.9	14.9	1	1	1	Y26 - T29	DEEQPAGEYGYSETEVVTATGEGEYER	2795 / -	1.3E-04 / -
ZmASR3	GRMZM2G044132_P01	-7.1	27.7	3	2	0.2	S13	SGAGDDYDSGYNSK	1646 / 1647	7.4E-08 / 3.8E-03
							S25	SGAGDDYDSGYNSK	1557 / -	1.0E-05 / -
		-5.6	27.7	4	2	0.3	S109	SGNDGYDSGYNR	1476 / 1477	6.3E-04 / 1.2E-05
		-4.6	27.7	6	2	0.4	T116	SGTTNDDEYGR	1181 / 1182	8.1E-04 / 2.8E-05

<sup>a</sup>Valeur de probabilité de l'identification protéique en log<sub>10</sub>.

<sup>b</sup>Protein Abundance index<sup>2</sup>(PAI) : nombre de peptides détectés par rapport au nombre de peptides théoriques.

<sup>c</sup>Séquence peptidique identifiée avec le site phosphorylé en gras, le numéro du scan et la valeur de probabilité du site phosphorylé en MS2/MS3

<sup>d</sup>Numéro du scan en MS2 / MS3

<sup>e</sup>E-value du site phosphorylé en MS2 / MS3

**Tableau 3. Identification de résidus phosphorylés *in vivo* chez les protéines ZmASR2 et ZmASR3 par LC-MS/MS.**



**Figure 13. Identification de sites de phosphorylation chez les protéines ZmASR1, ZmASR2 et ZmASR3.** Le domaine riche en His et le domaine ABA/WDS caractéristiques des protéines ASR sont indiqués respectivement par des flèches bleues et grises. Les acides aminés en vert sont identiques aux acides aminés du motif nécessaire à la fixation à l'ADN dépendante du Zn<sup>2+</sup> de la protéine SIASR1, alors que ceux en orange correspondent à la séquence empêchant sa fixation (Rom et al. 2006). Les acides aminés en violet sont identiques aux acides aminés du signal de localisation nucléaire identifié chez la protéine LLA23 (Wang et al., 2006). Les rectangles gris correspondent aux résidus prédits phosphorylés par le logiciel NetPhos. Les acides aminés en rouge correspondent aux sites phosphorylés identifiés par LC-MS/MS à la suite d'une analyse *in vitro* (ZmASR1) et *in vivo* (ZmASR2 et ZmASR3).

à la protéine ZmASR1 n'a pu être détecté quelque soit la condition de culture considérée (donnée non montrée).

#### 3.2.4.2. Identification de sites de phosphorylation *in vivo* chez les protéines ZmASR2 et ZmASR3

Afin d'identifier les sites phosphorylés *in vivo* chez l'ensemble des protéines ZmASR, une alternative a consisté à enrichir les extraits protéiques en phosphopeptides. La méthode qui a été suivie a fait l'objet de développements réalisés par L. Bonhomme, stagiaire post-doctoral au laboratoire. Elle comprend quatre étapes : (1) une digestion trypsique en solution de l'extrait protéique soluble ; (2) un fractionnement par chromatographie liquide à haute pression sur une colonne échangeuse de cations (SCX-HPLC) pour séparer les peptides en fonction de leur charge ; (3) un enrichissement en phosphopeptides par chromatographie d'affinité sur résine Fe<sup>3+</sup>-IMAC des dix fractions peptidiques obtenues ; (4) une analyse par LC-MS/MS des fractions enrichies en phosphopeptides.

Les expériences ont été conduites à partir d'extraits protéiques de feuilles matures (feuilles 4 et 5) de plantes stressées, ainsi que de duplex d'extraits protéiques de feuilles 5 témoins et stressées présentant un marquage isotopique différent (CD<sub>2</sub>O pour les extraits témoins et CH<sub>2</sub>O pour les extraits stressés). L'analyse des différents spectres de masse a permis d'identifier dans les extraits non marqués de feuilles 4 stressées quatre sites phosphorylés chez la protéine ZmASR3. Ces sites étaient situés dans deux régions différentes : (1) deux Ser (S13 et S25), dont une non prédite (S13), en N-terminal ; (2) une Ser (S109) et une Thr (T116), toutes les deux prédites, dans la région non conservée chez les protéines ASR située entre l'extrémité N-terminale et les domaines ABA/WDS (Fig. 13 ; Tableau 3 ; Annexe 3).

Par ailleurs, les données obtenues par L. Bonhomme avec des extraits foliaires issus de la zone d'élongation et enrichis en phosphopeptides, ont permis d'identifier deux sites de phosphorylation chez la protéine ZmASR2 : une Tyr prédite (Y26) et une Thr non prédite (T29) située dans la région non conservée (Fig. 13 ; Tableau 3 ; Annexe 3).

#### *3.2.5. Conclusion*

Les expériences de Western 2D réalisées avec l'anticorps anti-ZmASR1 purifié et les extraits foliaires témoins ou stressés enrichis en phosphoprotéines, n'ont malheureusement pas permis d'établir avec certitude que la protéine ZmASR1 était phosphorylée *in vivo*.

Cependant, l'enrichissement en phosphopeptides d'extraits protéiques foliaires de feuilles matures stressées, a permis d'identifier plusieurs sites de phosphorylation *in vivo* chez les protéines ZmASR2 et ZmASR3. Ces sites présentent la particularité d'être situés en N-terminal dans des régions peu conservées chez les protéines ASR, alors que les deux sites identifiés *in vitro* sur la protéine ZmASR1 purifiée sont situés en C-terminal dans des régions très conservées chez les protéines ASR (Fig. 13).

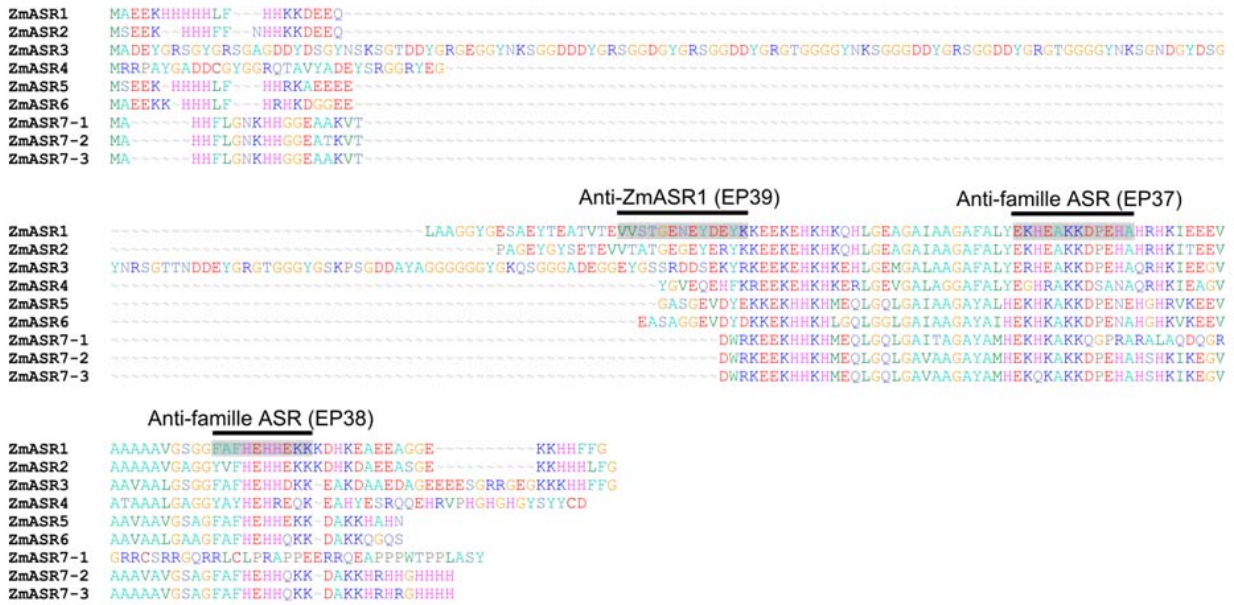
### **3.3. Matériel et méthodes**

#### **3.3.1. Matériel végétal et conditions de cultures**

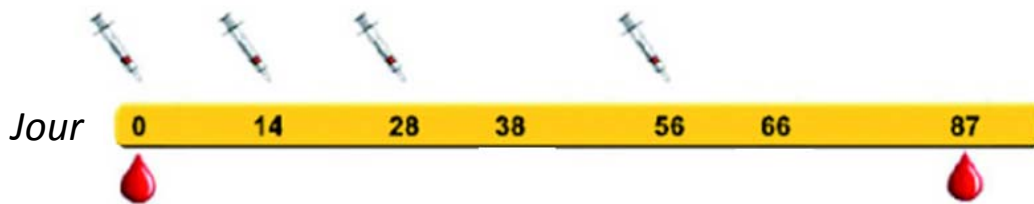
Des graines de la lignée parentale de maïs MBS847 ont été imbibées dans l'eau pendant 48 h à 4°C et à l'obscurité, puis mises à germer en chambre de culture dans un mélange terre du champ:terreau (2:3, v/v) additionné de Floradur B fin (mélange de tourbe blonde et noire de sphaigne, de carbonate de calcium, d'un mouillant et d'un engrais complet composé de tous les éléments majeurs et oligo-éléments indispensables) avec une photopériode de 16 h de jour ( $350 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 25°C, hygrométrie 50%) et 8 h de nuit (18°C, hygrométrie 50%). Durant la première heure de jour, la masse des pots, le nombre et la longueur des feuilles, ont été quotidiennement mesurés. L'humidité relative du pot (initialement à 58%) a été maintenue quotidiennement à 60% par addition d'eau après pesée du pot. Deux types de conditions de culture (quatre répétitions biologiques par condition) ont été appliquées lorsque la longueur de la feuille 5 a été supérieure à 30 cm : (i) condition irriguée (Tm) avec une humidité relative du pot maintenue à 60% ; (ii) condition de déficit hydrique (St) pour lequel il y a eu arrêt de l'arrosage. Les prélèvements ont été effectués, après 1h15 et avant 2h15 de jour, lorsque la croissance de la feuille 6 était stabilisée (obtention de trois valeurs d'élongation identiques) pour les plantes Tm, et à l'arrêt de la croissance de la feuille 6 (valeur d'élongation de la feuille 6 inférieure ou égale 0,5 cm par jour) pour les plantes St. Trois types de feuilles ont été stockées : (i) la feuille 4 dans sa totalité sous la forme de deux fragments dépourvus de nervure ; (ii) la zone médiane (30 cm) de la feuilles 5 sans nervure ; (iii) la feuille 6 par fragments de 4 cm (nervure comprise) à partir de la ligule. Les échantillons ont été congelés dans l'azote liquide puis conservés à -80°C.

#### **3.3.2. Protéines recombinantes et anticorps**

**A**



**B**



**C**

Anticorps	Peptide	Lapin	Sérum
anti-famille ASR	EP37 C+EKHEAKKDPEHA	Se6712	PPi
	EP38 C+FAFHEHHEKK		GP
anti-ZmASR1	EP39 C+VVSTGENEYDEYK	Se6714	PPi
			GP
		Se6715	PPi
			GP
			EP39 purifié

**Figure 14. Obtention d'anticorps anti-ZmASR1 et anti-famille ZmASR.** (A) Alignement des séquences protéiques ZmASR. Les séquences des peptides utilisés pour la création des anticorps sont surlignées en gris. (B) Programme d'immunisation des lapins. Les seringues indiquent les injections d'antigène, alors que les gouttes indiquent les prélèvements de sang. (C) Liste des différents sérum obtenus et caractérisés. PPi : prélèvement préimmun ; GP : grand prélèvement ; EPxx purifié : grand prélèvement purifié.

La protéine recombinante AtIPMDH1 et l'anticorps anti-AtIPMDH1. Un échantillon de la protéine recombinante AtIPMDH1 et de l'anticorps anti-AtIPMDH1, nous, a été fourni par S.Chen (University of Florida, USA).

Les protéines recombinantes GST-ZmSR1 et ZmASR1. Elles ont été produites par la société Protéogenix. Brièvement, des bactéries d'*E. coli* ont été transformées par le vecteur d'expression pGEX-6P-2 inductible par l'isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) et contenant l'ADNc du gène *ZmASR1* de la lignée MBS847 avec une étiquette GST placée en amont. La production de la protéine recombinante GST-ZmASR1 a été induite par addition d'IPTG (1 mM) durant la phase exponentielle de croissance de la culture bactérienne. Les bactéries induites ont été récoltées par centrifugation, soumises à une pré-lyse par congélation puis lysées avec un tampon natif (PBS) par sonication. Après centrifugation, les protéines présentes dans le surnageant (fraction native) et celles présentes dans le culot repris en tampon dénaturant (PBS/Urée) soniqué puis clarifié (fraction dénaturante), ont été analysées par SDS-PAGE. L'extrait brut natif contenant l'essentiel de la protéine GST-ZmASR1 produite, a été clarifié [centrifugation suivie d'une filtration (0,22  $\mu$ m)] puis purifié par fixation sur une colonne de sépharose avec du glutathion. L'élution a été ensuite réalisée, soit par compétition avec du glutathion réduit (protéine GST-ZmASR1), soit par clivage enzymatique de la presque totalité de l'étiquette GST (protéine ZmASR1 ayant cinq acides aminés résiduels de l'étiquette GST : Gly-Pro-Leu-Gly-Ser).

Les anticorps anti-famille ZmASR et anti-ZmASR1. Ils ont été produits par la société Eurogentec (Fig. 14). Les anticorps anti-famille ZmASR ont été obtenus suite à l'injection, chez un lapin, de deux peptides communs à l'ensemble des protéines ZmASR : C+EKHEAKKDPEHA (noté EP37) et C+FAFHEHHEKK (noté EP38 ; Fig. 14A). L'anticorps anti-ZmASR1 a, été obtenu par injection d'un peptide spécifique de la protéine ZmASR1 : C+VVSTGENEYDEYK (noté EP39; Fig. 14A). Pour les trois peptides, une Cys (C<sup>+</sup>) a été rajoutée pour des besoins de ciblage du site de couplage à la protéine porteuse KLH. LE protocole d'immunisation des lapins a compris quatre injections réalisées à 0, 14, 28 et 56 jours après la 1<sup>ère</sup> injection (Fig. 14B). Quatre prélèvements ont été réalisés à 0 (prélèvement préimmun, PPI) et 87 (grand prélèvement, GP) jours après la 1<sup>ère</sup> injection (Fig. 14B). Les anticorps ont été purifiés à partir du GP à l'aide d'une colonne d'affinité sur laquelle était fixée le peptide utilisé. Au final, deux anticorps anti-famille purifiés (EP37 et EP38) et un anticorps anti-ZmASR1 purifié (EP39) ont été

**Tableau 4. Spécificité des anticorps à différentes étapes de leur production.** En gras, les éléments et conditions choisies pour chacun des anticorps. Les annotations ND correspondent à de données manquantes

Anticorps	Code	Séquence <sup>a</sup>	Lapin	Sérum <sup>b</sup>	Gel <sup>c</sup>	Tampon <sup>d</sup>	Saturation <sup>d</sup>	Quantité de protéines	Dilution du sérum	Temps de révélation	Signal obtenu après révélation et nature des protéines identifiées
anti-famille ZmASR	EP37	C+EKHEAKKDPEHA	<b>Se6712</b>	PPi	2D	TBS	Caséine	ND	1/5000	ND	Aucun
	EP38	C+FAFHEHHEKK		GP	2D	TBS	Caséine	ND	1/5000	ND	ZmASR1, ZmASR2, ZmASR3, autre train de spots
	EP37 purifié			1D	TBS	Caséine	40 µg	1/5000		30 sec	Faible pour ZmASR1 et bandes aspécifiques présentes avec le PPI
						Lait					Très faible avec ZmASR3
						PBS	Caséine				Faible pour ZmASR1 et bandes aspécifiques présentes avec le PPI
						Lait					Très faible avec ZmASR3
						<b>TBS</b>	<b>Lait</b>	10 µg	<b>1/5000</b>	Contact 2 min	Aucun Faible
										15 min	Correct
							20 µg			Contact	Aucun
										2 min	Faible
										15 min	Correct
							<b>40 µg</b>			Contact	Aucun
										2 min	Faible
										<b>15 min</b>	Très bon
	EP38 purifié			1D	TBS	Caséine	40 µg	1/5000		30 sec	Famille ZmASR et bandes aspécifiques présentes avec le PPI
						Lait					Famille ZmASR
						PBS	Caséine				Famille ZmASR et bandes aspécifiques présentes avec le PPI
						Lait					Famille ZmASR
						<b>TBS</b>	<b>Lait</b>	10 µg	<b>1/10000</b>	Contact 2 min	Aucun Faible
										15 min	Correct
							20 µg			Contact	Aucun
										2 min	Faible
										15 min	Correct
							40 µg			Contact	Aucun
										2 min	Faible
										15 min	Très bon
			Se6713	PPi	2D	TBS	Caséine	ND	1/5000	ND	Aucun
				GP	2D	TBS	Caséine	ND	1/5000	ND	ZmASR1, faible signal pour ZmASR3
anti-ZmASR1	EP39	C+VVSTGENEYDEYK	Se6714	PPi	2D	TBS	Caséine	ND	1/5000	ND	Aucun
				GP	2D	TBS	Caséine	ND	1/5000	ND	ZmASR1 et un train de spots protéiques supplémentaire avec un poids moléculaire éloigné des ASR
			<b>Se6715</b>	PPi	2D	TBS	Caséine	ND	1/5000	ND	Aucun
				GP	2D	TBS	Caséine	ND	1/5000	ND	ZmASR1
	EP39 purifié			1D	TBS	Caséine	40 µg	1/5000		Contact	ZmASR1 majoritaire
						Lait					ZmASR1
						BSA					plusieurs bandes aspécifiques présentes avec le PPI
						PBS	Caséine				ZmASR1 majoritaire
						Lait					ZmASR1
						BSA					plusieurs bandes aspécifiques
						<b>TBS</b>	<b>Lait</b>	10 µg	<b>1/20000</b>	Contact 2 min	Faible Correct
										15 min	Augmentation du bruit de fond
							<b>20 µg</b>			Contact	Faible
										<b>2 min</b>	Très bon
										15 min	Augmentation du bruit de fond
							40 µg			Contact	Faible
										2 min	Correct
										15 min	Augmentation du bruit de fond

<sup>a</sup>Séquence du peptide utilisée avec une cys (C+) supplémentaire pour permettre le cloupage à la protéine porteuse

<sup>b</sup>PPi : sérum préimmun ; GP : grand prélèvement ; EPx purifié : GP purifié par colonne d'affinité avec le peptide d'intérêt

<sup>c</sup>1D : gel d'électrophorèse monodimensionnel SDS-PAGE ; 2D : gel bidimensionnel

<sup>d</sup>Les tampons sont décrits dans le Matériel et Méthodes§ 3.3.5. L'agent utilisé pour le blocage est la caséine, le lait écrémé ou l'albumine de sérum bovin (bovin serum albumin, BSA) sans acide gras



produits. Les différents sérum ont été caractérisés pour déterminer leur spectre d'action et définir leurs conditions expérimentales d'utilisation (Tableau 4).

Les anticorps anti-résidus phosphorylés. Les anticorps dirigés contre les résidus Ser ou Tyr phosphorylés sont les anticorps commerciaux Rabbit anti-phosphoserine 618100, et Rabbit anti-phosphotyrosine 683994A (Invitrogen).

### 3.3.3. *Extraction et dosage des protéines en condition native*

Les poudres foliaires obtenues, par broyage mécanique ou manuel, ont été broyées, dans un mortier refroidi dans la glace, dans une solution d'extraction contenant du TrisHCl 100 $\mu$ M, MgCl<sub>2</sub> 2mM, NaCl 100nM, EDTA 1mM, antiprotéase 1X, et trypsin inhibitor 10 $\mu$ g/mL, PMSF 1mM. L'extrait a été centrifugé à 12000g, pendant 10 minutes, à 4°C. Le surnageant a été récupéré puis la teneur en protéines des extraits a été déterminée selon le protocole de Bradford. L'albumine de sérum bovin a été utilisée pour préparer la gamme d'étalonnage.

### 3.3.4. *Analyse par électrophorèse monodimensionnelle*

Pour des conditions dénaturantes (SDS-PAGE), les échantillons ont été dilués dans le tampon décrit par Laemmli (1970) [Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, Laurylsulfate de sodium (SDS) 3% (v/v),  $\beta$ -mercaptoéthanol 4% (v/v), glycérol 10% (v/v), bleu de bromophénol 0,01% (p/v)]. Avant dépôt, les protéines ont été dénaturées pendant deux minutes à cent degrés. Pour des conditions non-dénaturantes, les échantillons ont été dilués dans le tampon décrit par Laemmli (1970) sans  $\beta$ -mercaptoéthanol.

Dans les deux conditions, le gel était constitué de deux parties qui différaient par leur concentration en acrylamide et leur pH : (i) un gel de concentration (« stacking gel ») à 4% [Tris-HCl 125 mM pH 6,8, SDS 0,1% (v/v), acrylamide/bis acrylamides (37,5/1) 4,24% (v/v), ammonium persulfate (APS) 0,1% (v/v), tétraméthyléthylènediamine (TEMED) 0,01% (v/v)] ; (ii) un gel de séparation (« running gel ») à 12% [Tris-HCl 375 mM pH 8,8, SDS 0,1% (v/v), Acrylamide/bis acrylamides (37,5/1) 12,8% (v/v), APS 0,05% (v/v), TEMED 0,0005% (v/v)]. Les extraits protéiques ont migré avec un ampérage limitant (stacking 10 mA par gel et running 20 mA par gel), à 450V en présence d'un tampon de migration dénaturant contenant du Tris-Base 25 mM, de la Glycine 192 mM, et du SDS 0,1% (v/v).

Les gels ont été colorés dans une solution contenant du bleu de Coomassie (R250) 0,25% (p/v) dissous dans un mélange éthanol (EtOH) 45% (v/v) et acide acétique (HAc)

**Tableau 5.** Conditions d'immunodétection utilisées avec les différents anticorps utilisés.

Étapes <sup>a</sup>	Anti-A $\alpha$ IPMDH1		Anti-ZmASR1 (EP39)		Anti-résidus phosphorylés	
	Condition <sup>b</sup>	Temps - Température	Condition <sup>c</sup>	Temps - Température	Condition <sup>c</sup>	Temps - Température
Rinçages	TBST 0,05%	15 min - T°C ambiante	TBST 0,1%	15 min - T°C ambiante	TBST 0,1%	2 x10 min - T°C ambiante
Saturation	Régilait écrémé 5% (p/v) dans TBST 0,05%	1 h - T°C ambiante	Régilait écrémé 5% (p/v) dans TBST 0,01%	1 h - T°C ambiante	BSA 5% (p/v) dans TBST 0,01%	1 h - T°C ambiante
Rinçages	TBST 0,05%	3 x 5 min - T°C ambiante	NA	NA	TBST 0,1%	3 x10 min - T°C ambiante
Anticorps I	Dilution 1/2000 dans TBST 0,05%	2 h - T°C ambiante	Dilution 1/20000 dans TBST 0,1%	2 h - T°C ambiante	Dilution 1/500 dans TBST 0,1%	nuit - 4 °C
Rinçages	TBST 0,05%	5 x5 min - T°C ambiante	TBST 0,1%	5 x 5 min - T°C ambiante	TBST 0,1%	3 x 10 min - T°C ambiante
Anticorps II	Anti-IgG couplé à IRDye800, dilution 1/10000 dans TBST 0,05%	1 h - T°C ambiante	Anti-IgG couplé à une peroxydase, dilution 1/10000 dans TBST 0,1%	1 h - T°C ambiante	Anti-IgG couplé à une peroxydase, dilution 1/10000 dans régilait écrémé 10% (p/v), TBST 0,1%	1 h - T°C ambiante
Rinçages	TBST 0,05%	2 x 5 min - T°C ambiante	TBST 0,1%	5 x 5 min - T°C ambiante	TBST 0,1%	4 x 10 min - T°C ambiante

<sup>a</sup>Anticorps I : anticorps primaire de lapin dirigé contre des protéines ou des résidus ciblés ; Anticorps II : anticorps secondaire de lapin couplé à une molécule fluorescente (IRDye800) ou à une peroxydase.  
<sup>b</sup>TBST 0,05% : Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, Tween20 0,05% (v/v), pH7,5.  
<sup>c</sup>TBST 0,1% : Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, Tween20 0,1% (v/v), pH7,5. NA : étape pas réalisée.

10% (v/v) pendant une heure et demie à température ambiante sous agitation. Il a ensuite été décoloré dans un mélange identique au précédent mais dépourvu de bleu de Coomassie à température ambiante sous agitation jusqu'à l'observation des bandes. Le gel a été conservé dans de l'HAc 10% (v/v) à 4°C et scanné après une nuit.

### 3.3.5. Western blot

Les membranes ont été hydratées une minute dans du méthanol puis rincées à deux reprises pendant 10 minutes dans du tampon de transfert contenant du Tris-Base 25 mM, et glycine 192 mM. Dans le cas des Western blot 1D, le transfert a été réalisé à 100 V et 350 mA pendant une heure à température ambiante. Dans le cas des Western blot 2D, la partie inférieure du gel a été découpée et le transfert a été réalisé à 100V et 2,0A pour deux cassettes pendant 45 minutes à 20°C sous agitation. Les membranes ont été stockées à 4°C dans du tampon TBS [Tris-HCl 10mM, NaCl 150 mM, pH 7,5]. Les différentes conditions d'immunodétection utilisées selon les anticorps primaire sont présentées dans le tableau 5. La révélation des membranes dépend de l'anticorps secondaire utilisés. Pour l'anticorps anti-IgG de lapin couplé à une molécule fluorescente (IRDye 800), les membranes ont été scannées avec le scanner de fluorescence infrarouge Odyssey (LI-COR) à 778 nm. Pour l'anticorps anti-IgG de lapin couplé à une peroxydase, les membranes ont été incubées avec le kit « Enhanced Chimio Luminescence » (ECL) (Amersham). Elles sont ensuite mises en contact avec un film pendant un temps d'exposition variable qui est après passé dans la développeuse. Pour révéler l'ensemble des protéines, les membranes ont été ensuite colorées au nitrate d'argent ou à l'or colloïdal. Pour la coloration u nitrate d'argent, après deux rinçages de 15 minutes dans du TBST et trois rinçages de deux minutes dans de l'eau bidistillée, les membranes ont été incubées pendant 30 minutes dans la solution de coloration [citrate de sodium 2% (v/v), sulfate de fer 0,8% (v/v), AgNO<sub>3</sub> 0,2% (v/v)], rincées à l'eau, puis séchées, avant d'être scannées (umax power look III, GE Healthcare). Pour la coloration à l'or colloïdal, après les rinçages, les membranes ont été incubées dans la solution commerciale d'or colloïdal.

### 3.3.6. Immunoprécipitation

Deux protocoles d'immunoprécipitation ont été utilisés avec des billes magnétiques couplées à un mélange de protéines A et G (Ademtech).

*Protocole d'Ademtech.* Les billes magnétiques (20 µL/tube) ont été lavées deux fois avec du tampon PBS pH 7,5 contenant du Tween 0,65% (v/v) (tampon PBST), puis

incubées 1 h sous agitation à température ambiante avec l'anticorps anti-ZmASR1 EP39 (2  $\mu\text{g}$ ). Les billes ont été lavées deux fois avec le tampon PBST, puis reprises dans le tampon Triethanolamine 200 mM pH, et lavées deux fois avec 20 mM de diméthyl pimélimidate dihydrochloride (DMP ; dissous dans le tampon Triethanolamine 200 mM pH 9) pendant 30 min, sous agitation et à température ambiante. Les billes ont ensuite été reprises 30 min dans le tampon Tris-HCl 50 mM pH 7,5, lavées deux fois avec une solution contenant de la glycine 50 mM pH 2,7 et du tween 0.65% (v/v), puis reprises dans du tampon d'extraction natif (HEPES 50 mM pH 7,5,  $\text{MgCl}_2$  2 mM, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM pH8, leupeptine 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , chymostatine 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , pepstatine 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  ; inhibiteur trypsique de soja 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , PMSF 1 mM,  $\text{NaVO}_3$  1 mM,  $\beta$ -glycérophosphate 40 mM, NaF 15 mM).

*Protocole de C. Lachaud (UMR 5546 CNRS Toulouse).* Les billes magnétiques (20  $\mu\text{L}/\text{tube}$ ) ont été lavées une fois avec du tampon PBS puis avec du tampon PBST et incubées 1 h sous agitation, à température ambiante avec l'anticorps anti-ZmASR1 EP39 (2  $\mu\text{g}$ ). Les billes ont ensuite été lavées deux fois avec du Naborate 200 mM pH 9, deux autres fois avec du DMP 20 mM (dissous dans du Naborate 200 mM pH 9) pendant 30 min à température ambiante, puis reprises dans de l'éthanolamine 200 mM pH 8 pendant 2 h. Les billes ont été reprises dans du tampon PBS, lavées 3 fois avec de la glycine 100 mM pH 2,5, puis reprise dans le tampon Tris-HCl 100 mM pH 8,5, et enfin le tampon d'extraction natif.

Dans chaque protocole, les billes ont ensuite été incubées avec la protéine recombinante ZmASR1 (200 ng) ou des extraits protéiques foliaires solubles (300  $\mu\text{g}$ ) pendant 1 h à température ambiante ou toute la nuit à 4 °C. Par la suite, les tubes ont été lavés trois fois avec du tampon d'extraction puis repris dans le tampon d'élution PAG (Ademtech). Le surnageant a été prélevé et dénaturé par addition de Leammli 5X et une incubation à 90 °C pendant 5 min. Les protéines ont ensuite été séparées par gel d'électrophorèse monodimensionnelle 12% (w/v). Après électrophorèse, les protéines ont été colorées au bleu de colloïdal ou analysées par Western blot à l'aide de l'anticorps anti-ZmASR1.

### 3.3.7. Essai de phosphorylation *in vitro* des protéines ZmASR1 et GST-ZmASR1

*Essai avec la protéine AtSnRK1.1.* La protéine recombinante ZmASR1 (5  $\mu\text{g}$ ) a été incubée dans un milieu réactionnel A (HEPES 100 mM pH 7,4,  $\text{MgCl}_2$  10 mM, DTT 5 mM, EGTA 0,5 mM, leupeptine 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , chymostatine 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , pepstatine 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  ; inhibiteur trypsique de soja 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , PMSF 1 mM,  $\text{NaVO}_3$  1 mM,  $\beta$ -glycérophosphate 40 mM, 15 mM NaF) en présence de 5  $\mu\text{g}$  de protéine AtSnRK1 (don

de M. Thomas, UMR 8618 CNRS, Orsay ; Crozet et al., 2010). La phosphorylation a été initiée par l'ajout de 5 mM d'ATP et de 2  $\mu\text{Ci}$  de  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  (Amersham ?) dans un volume réactionnel final de 25  $\mu\text{L}$ . Elle a été arrêtée après 1 h d'incubation dans un bain-marie à 30°C par l'ajout de 5  $\mu\text{L}$  de Laemmli 5X et une incubation à 80°C pendant 5 min.

*Essai avec la protéine OST1 active ou inactive (S175A).* La protéine recombinante ZmASR1 (10  $\mu\text{g}$ ) a été incubée dans un milieu réactionnel B (HEPES 50 mM pH 7,4,  $\text{MgCl}_2$  20 mM, DTT 1 mM, leupeptine 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , chymostatine 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , pepstatine 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  ; inhibiteur trypsique de soja 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , PMSF 1 mM,  $\text{NaVO}_3$  1 mM,  $\beta$ -glycérophosphate 40 mM, NaF 15 mM) en présence de 2,5  $\mu\text{g}$  de protéine OST1 ou de sa forme inactive S175A (don de C. Laurière, UPR2355 CNRS, Gif sur Yvette ; Boudsocq et al., 2004). La phosphorylation a été initiée par l'ajout de 5 mM d'ATP et de 2  $\mu\text{Ci}$  de  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  dans un volume réactionnel final de 25  $\mu\text{L}$ . Elle a été arrêtée après 4 h d'incubation dans un bain-marie à 30°C par l'ajout de 5  $\mu\text{L}$  de Laemmli 5X et une incubation à 80°C pendant 5 min.

*Essai avec la protéine PKA.* La protéine recombinante ZmASR1 (20  $\mu\text{g}$ ) a été incubée dans un milieu réactionnel C (Tris-HCl 50 mM pH 7,8,  $\text{MgCl}_2$  20 mM, glycérol 10% (v/v), DTT 1 mM, EDTA 1 mM, leupeptine 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , chymostatine 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , pepstatine 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  ; inhibiteur trypsique de soja 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , PMSF 1 mM,  $\text{NaVO}_3$  1 mM,  $\beta$ -glycérophosphate 40 mM, NaF 15 mM) en présence de 5 unités de protein kinase A catalytic subunit from bovine heart (PKA ; Sigma-Aldrich P2645). La phosphorylation a été initiée par l'ajout de 5 mM d'ATP et de 2  $\mu\text{Ci}$  de  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  dans un volume réactionnel final de 50  $\mu\text{L}$ . Elle a été arrêtée après 4 h d'incubation dans un bain-marie à 30°C par l'ajout de ?  $\mu\text{L}$  de Laemmli 5X et une incubation à 80°C pendant 5 min.

*Essai avec la protéine VEGF-R1.* La protéines recombinantes ZmASR1 (20  $\mu\text{g}$ ) a été incubée dans un milieu réactionnel D (HEPES 125 mM pH 7,5,  $\text{MgCl}_2$  10 mM, DTT 2,5 mM, leupeptine 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , chymostatine 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , pepstatine 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  ; inhibiteur trypsique de soja 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , PMSF 1 mM,  $\text{NaVO}_3$  1 mM,  $\beta$ -glycérophosphate 40 mM, 15 mM NaF) en présence de 200 ng de protéine kinase human VEGF-R1 (Merck Calbiochem 325895). La phosphorylation a été initiée par l'ajout de 5 mM d'ATP et de 2  $\mu\text{Ci}$  de  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  dans un volume réactionnel final de 50  $\mu\text{L}$ . Elle a été arrêtée après 4 h d'incubation dans un bain-marie à 30°C par l'ajout de 12.4  $\mu\text{L}$  de Laemmli 5X et une incubation à 80°C pendant 5 min.

*Essai avec un extrait protéique foliaire natif.* La protéine recombinante GST-ZmASR1 (20  $\mu\text{g}$ ) a été incubée dans un milieu réactionnel E (Tris-HCl 100 mM pH 7,8,

MgCl<sub>2</sub> 2 mM, EDTA 1 mM, leupeptine 10 µg mL<sup>-1</sup>, chymostatine 10 µg mL<sup>-1</sup>, pepstatine 10 µg mL<sup>-1</sup> ; inhibiteur trypsique de soja 10 µg mL<sup>-1</sup>, 1 mM PMSF) en présence de 25µg d'extrait protéique foliaire natif (tampon E). La phosphorylation a été initiée par l'ajout de 5 mM d'ATP et de 2 µCi [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP dans un volume réactionnel final de 50 µL. Elle a été arrêtée après 4 h d'incubation dans un bain-marie à 30°C par l'ajout de 5 µL de Laemmli 5X et une incubation à 80°C pendant 5 min.

Les protéines ont ensuite été séparées par gel d'électrophorèse monodimensionnelle 12% (w/v). Après électrophorèse, les protéines ont été colorées au bleu de colloïdal puis révélées à l'aide d'un PhosphoImager (?). Pour les identifications par LC-MS/MS, la phosphorylation a été initiée par l'ajout de 5 mM d'ATP seulement.

### 3.3.8. Digestion enzymatique des protéines en solution

Après une extraction en condition dénaturante, les culots protéiques ont été repris dans le tampon de solubilisation pour digestion trypsique [urée 6 M (p/v), thiourée 2 M (p/v), CHAPS 2% (p/v), Tris-HCl 30 mM (v/v) pH 7,8] à 25µL.mg<sup>-1</sup>. Une incubation de deux heures à 4°C a été réalisée avant de réaliser une centrifugation à 14000 g pendant 5 minutes à 4°C. Le surnageant a été isolé, dosé et 2 mg de protéines ont été collectés. Les ponts disulfures ont été réduits par ajout de la solution de réduction [DTT 200 mM (p/v), NH<sub>4</sub>CO<sub>3</sub> 100 mM (v/v)] à 5% pendant une heure à 4°C. Puis l'alkylation des sulfures a été faite par ajout de la solution d'alkylation [IAA 1 M (p/v), NH<sub>4</sub>CO<sub>3</sub> 100 mM (v/v)] à 4 % pendant une heure à 4°C. Les extraits ont été dilués à 12,5 % dans une solution de NH<sub>4</sub>CO<sub>3</sub> à 50 mM. La trypsine gold (Proméga) à 1µg.µL<sup>-1</sup> dans l'HAc 50 mM a été utilisée à 5 % (p/p) pour une protéolyse de 16 heures à 37°C sous agitation. La réaction a été arrêtée par ajout d'acide formique (HFO) à 1% (v/v). Les échantillons ont été séchés en centrifugeuse à vide à température ambiante et conservés à -50°C.

### 3.3.9. Diméthylation des peptides sur colonnes

Après solubilisation des culots peptidiques dans 1 mL d'HFO 5%, le marquage isotopique par diméthylation des amines primaires a été réalisé sur colonne C18 Sep-pak Vac (Waters) selon le protocole décrit par Boersema *et al.* (2009) (Boersema et al., 2009). L'équilibration et le rinçage des colonnes ont été réalisés avec un solvant A [0,6% HAc (v/v)]. Le marquage dit « léger » des échantillons St, a été obtenu par ajout de 5 ml d'une solution contenant NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10mM (v/v) pH 7,5, NaHPO<sub>4</sub> 35mM (v/v) pH 7,5, NaBH<sub>3</sub>CN 30mM (v/v) et CH<sub>2</sub>O 0,2%(v/v) alors que le marquage dit « intermédiaire » des

échantillons T<sub>m</sub> a été obtenu en substituant le CH<sub>2</sub>O par du CD<sub>2</sub>O. Après rinçage des solutions de marquage à l'aide du solvant A, les peptides ont été élués avec deux fois 500 µL de solvant B [HAc 0,6% (v/v) ; ACN 80% (v/v)], séchés à température ambiante, puis conservé à 4°C.

### 3.3.10. Enrichissement en phosphoprotéines

Les culots protéiques ont été solubilisés dans un tampon compatible avec la résine [Urée 7M, Thiourée 2M, CHAPS 2%, SB 3-10 1%, DTT 20 mM]. Pour optimiser la solubilisation, les échantillons ont été incubés 1 heure sous agitation lente à 4°C. Le surnageant prélevé après centrifugation de 5 minutes à 14000 g a été dosé. Pour enrichir les extraits en phosphoprotéines, une chromatographie d'affinité (proQ Diamond Phosphoprotein Enrichment kit) a été réalisée en suivant le protocole mis au point par L. Bonhomme à l'aide de 1 mL de résine par mg de protéine à enrichir. Le mélange a été incubé 1 heure à 4°C sous agitation dans 13,3 mL de tampon de rinçage par mg de protéines à enrichir. Le mélange a ensuite été déposé sur une colonne avec frité afin de collecter la fraction non retenue par la résine (flowthrough, FT). Les phosphoprotéines ont ensuite été éluées avec 4 mL de la solution d'éluion (proQ Diamond Phosphoprotein Enrichment kit). Les extraits enrichis ont été concentrés sur Amicon Ultra-4, 3kDa (Millipore) et une précipitation chloroforme/méthanol/eau bidistillée (Wessel and Flugge, 1984) [MeOH 50% (v/v) ; CHCl<sub>3</sub> 12,5% (v/v) ; ddH<sub>2</sub>O 37,5 % (v/v)] a été réalisée. La solubilisation a été réalisée dans 100 µL d'UKS pour les gels 2D.

### 3.3.11. Enrichissement en phosphopeptides

Les échantillons peptidiques ont été fractionnés sur colonne échangeuse de cations (SCX, "Strong Cation Exchange") en HPLC (Famos - Switchos II - Ultimate DualGradient, Dionex, 200 µL·min<sup>-1</sup>). Les échantillons ont été repris dans 500 µL de solvant A [ACN 30% (v/v), HFO 5% (v/v), pH 2,5]. Pour optimiser le temps de séparation, un gradient décroissant d'acidité a été réalisé par mélange du solvant A et du solvant B [ACN 30% (v/v), HFO 5% (v/v), formate d'ammonium 540 mM (p/v), pH 4,7]. Les peptides ont ainsi été séparés par un gradient de pH du plus acide au plus basique. Des fractions ont été collectées toutes les 90 s, par un robot (Probot), poolées pour l'obtention de 10 fractions finales puis séchées et conservées à 4°C. Pour enrichir les fractions en phosphopeptides, une chromatographie d'affinité utilisant des ions Fe<sup>3+</sup> immobilisés (Fe<sup>3+</sup>-IMAC) a été réalisée selon le protocole SIGMA revu par Nühse et al. (2007) à l'aide de 80 µL de résine Phos-Select Iron affinity (SIGMA) pour chaque fraction. Les fractions

peptidiques post-SCX ont été solubilisées dans 300µL de tampon de rinçage/équilibre [250mM HAc (v/v) ; ACN 30% (v/v)] puis incubées sur roue avec la résine deux heures à température ambiante. Le mélange a ensuite été déposé sur une colonne avec fritté (kit spin colonne, SIGMA). Il a ensuite été rincé deux fois avec 200µL de tampon de rinçage/équilibre, puis une fois avec 200 µL d'eau bidistillée. L'élution des phosphopeptides a été faite avec 50 µL de tampon d'élution [hydroxyde d'ammonium 0,4M (v/v) ; ACN 30% (v/v)] par centrifugation 1 minutes à 8200 g. Les éluas ont été séchés avec une centrifugeuse à vide à température ambiante puis conservés à -20°C.

### 3.3.12. Analyse des peptides par spectrométrie de masse

Les échantillons sont repris dans une solution de TFA 0,05% (v/v), ACN 2% (v/v), HCOOH 0,05% (v/v), puis analysés sur un système HPLC couplé à un spectromètre de masse en tandem (LC-MS/MS). L'HPLC est réalisée sur une chaîne NanoLC-Ultra (Eksigent). Quatre µl d'échantillon sont chargés à 5 µL/min<sup>-1</sup> sur une pré-colonne (C18 PepMap 100, 5 µm; Ø 100 µm, 1 cm; Dionex) et dé-salé avec 0.1% HCOOH, et 2% ACN. Après 3 min, la précolonne est connectée à une colonne de séparation (colonne C18 PepMap 100, 3 µm, Ø 75 µm, 150 mm; Dionex). Un gradient de concentration en acétonitrile de 5% à 30% a été appliqué à 300 nL/min<sup>-1</sup> par augmentation de la proportion du solvant B, contenant 0.1% HCOOH (v/v) et 95% ACN, dans le solvant A, constitué de 0.1% HCOOH (v/v). En incluant l'étape de régénération à 100% de B et l'équilibration à 100% de A, une analyse dure 25 min. Les peptides élués sont analysés en ligne sur une trappe à ion LTQ XL (Thermo Electron) *via* une source nano-electrospray. L'ionisation des peptides (Potentiel de 1.5 kV) est réalisée par une jonction liquide et une aiguille capillaire (10 mm i.d.; New Objective). L'acquisition des peptides est effectuée par le logiciel Xcalibur 2.0.7 en 2 étapes : (1) Spectre de l'ensemble des peptides (masse sur charge (m/z) de 400 to 1900 Th, mode centroid), et (2) Spectre MS/MS (qz de 0.25, temps d'activation de 30 ms, et énergie de collision de 35%; mode centroid). L'étape 2 est répétée pour les 3 ions majoritaires détectés à l'étape 1. L'exclusion dynamique des peptides est de 30s. Dans le cas de recherche de phosphorylation, une troisième étape est ajoutée. Elle correspond à l'analyse en MS3 de la perte de neutre (-98 Da) en MS/MS avec les mêmes paramètres de fragmentation.

L'identification est effectuée, à partir des m/z des peptides et des spectres issus de la fragmentation, par une interrogation *via* le logiciel X!tandem (version 2010.01.01.4) des banques de données d'*E. coli* (Integr8 *E.coli* K12), du maïs (*Zea mays* B73, famille ZmASR), et des contaminants standards. Les paramètres d'interrogation sont : clivage



enzymatique: trypsine, erreur de clivage: 1, modification fixe: carbamidométhylation des cystéines, modification variable: oxydation des méthionines. La précision sur la masse du précurseur est de 2.0 Da et celle sur les fragments de 0.8 (LCQ Deca) ou 0.5 (LTQ). Une recherche supplémentaire (Refine mode), effectuée sur les protéines identifiées par la première analyse, est réalisée avec les mêmes paramètres exceptés que le clivage semi-trypsique et la recherche d'acétylation N-terminal des protéines sont acceptés. De plus, dans le cas de l'analyse des sites de phosphorylation, la recherche de phosphate sur la sérine, thréonine ou tyrosine est ajoutée.

Les données d'identification sont filtrées et regroupées en utilisant le logiciel X!Tandem pipeline (<http://pappso.inra.fr/bioinfo/xtandempipeline/>). Les paramètres standard de filtrage sont : (i) E value des peptides inférieure à 0,05, (ii) au moins deux peptide valide par protéines, et (iii) une E value de la protéine (calculée comme le produit des E values peptidiques) inférieure à  $10^{-4}$ . Les paramètres de filtrage pour l'identification des phosphopeptides sont : (i) au moins un peptide unique par protéines dont la E value est inférieure à 0,01 et (ii) une E value de la protéine (calculée comme le produit des E values peptidiques) toujours inférieure à 0,01. Dans le cas d'identification avec seulement 2 ou 3 peptides, ou de peptides identifiant un site de phosphorylation, la similarité entre spectres théoriques et expérimentales est vérifiée visuellement.

### 3.3.13. Visualisation de l'état redox des protéines

Après une extraction en condition non-dénaturante, les extraits protéiques ont été soumis à une incubation en présence des agents alkylants iodoacétamide (IAM ; 100 mM) et N-ethylmaleimide (NEM ; 50 mM) pour permettre un blocage des groupements réduits ou oxydés.

Les extraits protéiques ont également été soumis à des essais redox correspondant à des oxydations ou des réductions totales. Dans ce but, l'extrait protéique a été incubé en présence d'un agent réducteur (DTTred ; 10 mM) ou d'un agent oxydant (DTTox ; 10 mM) et de 10  $\mu$ M de protéine thioredoxine purifiée Trx\_m1 d'*A. thaliana* (don de E. Issakidis-Bourguet) pendant 30 ou 60 min à 30°C.

## 4. Discussion générale et perspectives

### 4.1. Analyse fonctionnelle de la protéine *ZmASR1* par phénotypage au champ et caractérisation de ses cibles nucléiques, protéiques et métabolomiques

#### 4.1.1. Effet de la protéine *ZmASR1* sur le rendement au champ

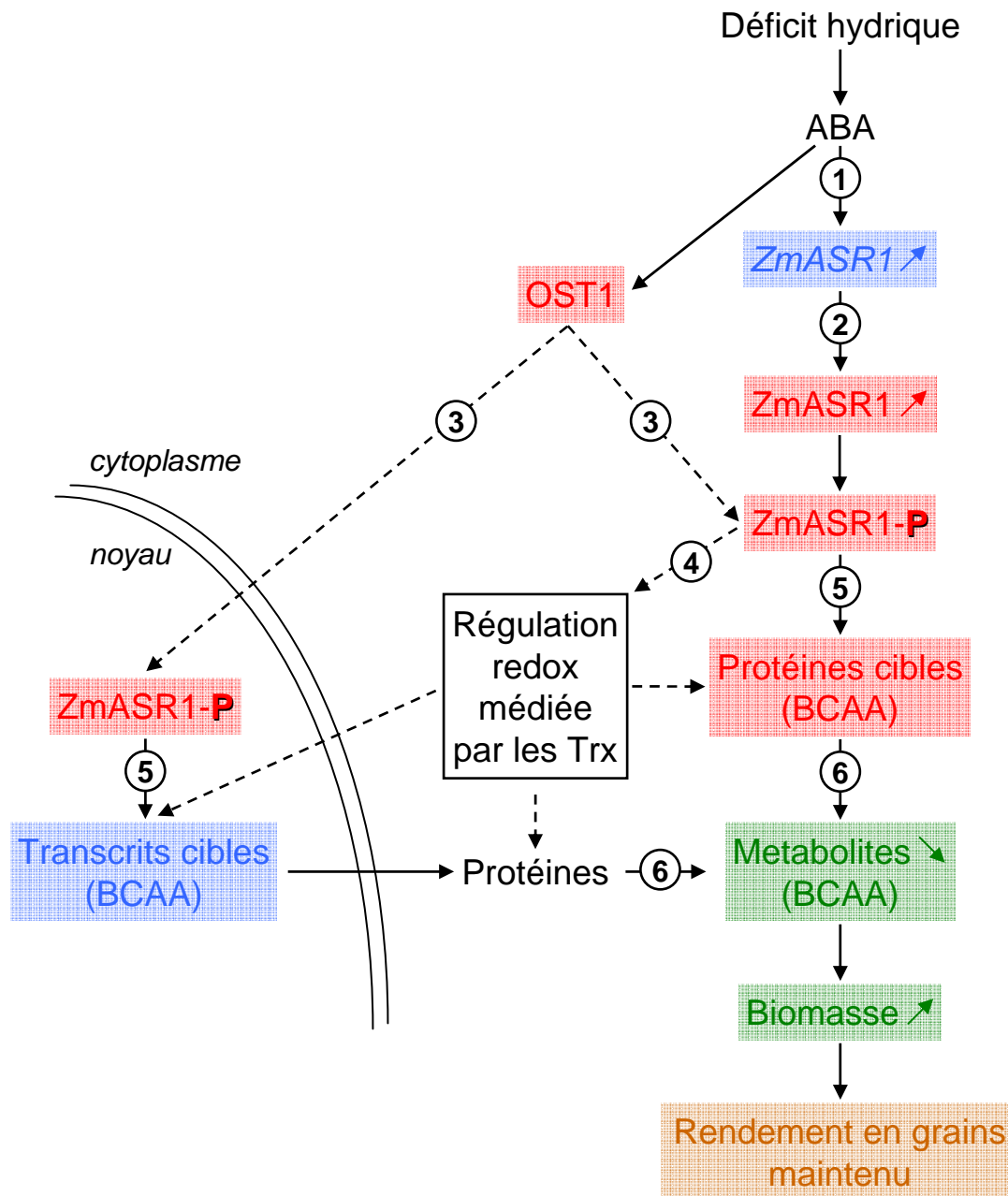
Nous avons observé que la sur-expression du gène *ZmASR1* chez le maïs affectait des composantes du rendement en condition irriguée comme en condition de déficit hydrique au champ (coll. Biogemma). Cet effet sur le rendement était inattendu d'après les analyses de QTL (de Vienne et al., 1999). Néanmoins, il a confirmé différentes analyses antérieures réalisées au laboratoire (coll. Biogemma, programme SEP7 « Tolérance à la sécheresse »). Ainsi, quatre lignées reconverties issues de la lignée LPMM83B (lignée Limagrain issue de la lignée F2 qui n'exprime pas la protéine *ZmASR1*) dans lesquelles avait été transférées, par backcross assistés par marqueurs, l'allèle *ZmASR1* de la lignée F252 qui exprime la protéine *ZmASR1*, avaient montrées une différence nette en condition de déficit hydrique pour différentes composantes du rendement par rapport à la lignée LPMM83B conventionnelle. Par ailleurs, un effet significatif de la sur-expression du gène *ZmASR1* sous contrôle du promoteur du gène d'actine de riz (un promoteur constitutif plus faible que le promoteur *CsVMV* que nous avons utilisé) avait été obtenu en condition irriguée sur la longueur de la rafle, le pourcentage de fécondation, le poids total en grain par épi et le nombre de grains par épi, et un effet plus limité mais néanmoins significatif en condition stressée, pour la protandrie, la longueur de la rafle et le pourcentage de fécondation. Comme la protéine *ZmASR1* a un impact positif sur le rendement en condition irriguée et de déficit hydrique, l'évaluation de plantes transgéniques sur-exprimant le gène *ZmASR1* dans des fonds génétiques adaptés au marché est actuellement à l'étude aux Etats-Unis (Biogemma).

Dans la littérature, l'analyse de QTL de réponse à la sécheresse a montré qu'il existait très peu de QTL communs aux cultures réalisées en condition irriguée ou en condition d'eau limitante, ce qui suggèrent que ce sont des mécanismes indépendants qui assurent le maintien du rendement et la tolérance au déficit hydrique (Lu et al., 2006). Néanmoins, il est intéressant de noter que la sur-expression du facteur de transcription *ZmNF-YB2* accentue la teneur en chlorophylle des feuilles et la floraison en condition irriguée, et a un impact sur le rendement en grain en condition de déficit hydrique (Nelson et al., 2007). Par ailleurs, la sur-expression des gènes *CspA* et *CspB*, codant des ARN chaperonnes bactériennes, a permis une amélioration des performances végétaives, telles

qu'une augmentation de la teneur en chlorophylle, ainsi qu'une amélioration du rendement en condition de déficit hydrique chez le maïs (Castiglioni et al., 2008). De manière intéressante, nous avons montré que la sur-expression du gène *ZmASR1* affectait 20 métabolites, en diminuant en particulier la teneur de 18 d'entre eux en condition irriguée comme en condition de déficit hydrique. Les résultats de l'analyse des corrélations sur les résidus suggèrent qu'il existe un mécanisme commun qui contrôle étroitement la diminution de 13 d'entre eux puisqu'ils montrent que leur teneur est corrélée positivement entre répétitions biologiques. Par ailleurs, six d'entre eux ont été identifiés comme corrélés négativement avec la biomasse chez *A. thaliana* (Meyers et al., 2007 ; Sulpice et al., 2009). Ceci est cohérent avec nos données puisque la teneur de ces métabolites est diminuée, alors que les composantes végétatives et reproductives sont augmentées chez les plantes sur-exprimant le gène *ZmASR1*. Nos travaux suggèrent donc que la protéine *ZmASR1* régulerait négativement la teneur d'au moins 13 métabolites, six étant déjà connus pour être négativement corrélés à la biomasse, via un mécanisme commun. Ces données ne permettent pas à ce stade d'identifier ce mécanisme commun. Il est possible qu'un système de régulation diminue la synthèse de ces métabolites ou que leur diminution soit due à un effet plus indirect, ces composés pouvant jouer un rôle de substrats pour la synthèse d'autres composés importants pour la croissance des feuilles et des grains. L'impact de la protéine *ZmASR1* sur différentes composantes végétatives se répercuterait donc sur les performances reproductrices et les composantes du rendement en condition irriguée et de déficit hydrique.

#### *4.1.2. Identification de gènes dont l'expression est affectée par la sur-expression du gène *ZmASR1**

L'analyse combinée du transcriptome et du protéome foliaire a permis de montrer que la sur-expression du gène *ZmASR1* affectait 10 transcrits (trois via l'analyse transcriptomique ; sept via l'étude des voies métaboliques affectées par la sur-expression du gène *ZmASR1*) et 22 protéines (16 ayant pu être identifiés par LC-MS/MS et codant pour 15 gènes distincts). Les 10 cibles nucléiques identifiées ne correspondaient à aucune des cibles protéiques identifiées. Il est vraisemblable qu'elles soient en quantité trop faible ou qu'elles possèdent des caractéristiques physiques non compatibles avec les conditions expérimentales utilisées pour la séparation sur gel 2D. Néanmoins, il est notable que les 15 cibles protéiques identifiées sont présentes sur la puce d'expression (oligonucléotides de 70mers) utilisée, mais ne sont pas affectés par la sur-expression du gène *ZmASR1*. Ces résultats suggèrent que la protéine *ZmASR1*, comme les protéines *LLA23* et *SIASR1* et



**Figure 15. Modèle d'action de la protéine ZmASR1 en réponse à un déficit hydrique.** 1, Régulation transcriptionnelle du gène *ZmASR1* ; 2 : régulation post-transcriptionnelle du gène *ZmASR1* chez la lignée F2 où la protéine n'est pas détectée ; 3 : régulation post-traductionnelle par phosphorylation de la protéine *ZmASR1* ; 4 : impact potentiel de la protéine *ZmASR1* sur la régulation redox de ces cibles ; 5 : effet de la protéine *ZmASR1* phosphorylée ou non sur l'abondance de transcrits ou protéines cibles impliqués en particulier dans la biosynthèse des acides aminés branchés (BCAA) ; 6 : effet de *ZmASR1* sur la teneur en métabolites qui influencerait sur la biomasse et à plus long terme sur le rendement. L'orientation des flèches situées à gauche des éléments indique le sens de variation de leur abondance (augmentation ou diminution). Les flèches en trait plein indiquent les relations observées lors des différentes analyses (bleu : transcrits, rouge : protéines, vert : métabolites et biomasse, marron : rendement) alors que les flèches en pointillés indiquent des étapes mises en évidence *in vitro* ou hypothétiques. Le symbole « P » indique la MPT par phosphorylation qui demande à être confirmée *in vivo*.

dernièrement la protéine ASR de *Musa paradisiaca* (Yang et al., 2005 ; Rom et al., 2006 ; Konrad et al., 2008 ; Dai et al., 2011), pourrait influencer l'expression de transcrits et de protéines en ayant à la fois une fonction de régulateur transcriptionnel et une fonction de protéine chaperonne (Fig. 15). Néanmoins, la sur-expression du gène *ZmASR1* a un effet relativement modeste sur le transcriptome par comparaison à la sur-expression du gène *LLA23* qui affectait 410 transcrits, tous distincts de ceux que nous avons identifiés (Yang et al., 2008). Cette différence montre que les protéines *ZmASR1* et *LLA23* ont des rôles physiologiques différents.

L'essentiel des cibles nucléiques et protéiques identifiées sont impliqués dans le métabolisme primaire. De manière intéressante, sept d'entre elles (cinq transcrits : *ZmAHA1*, *ZmKAR1*, *ZmKAR2*, *ZmBCAT2* et *ZmBCAT4* ; deux protéines : *ZmIPMDH1* et *ZmIPMDH2*) sont impliquées dans la biosynthèse des trois acides aminés branchés (BCAA) Ile, Leu et Val. De manière concordante, nous avons montré que la teneur en BCAA est affectée chez les sur-expressseurs *ZmASR1*. Il est notable que seule l'expression du transcrit *ZmBCAT2* et des protéines *ZmIPMDH1* et *ZmIPMDH2* varie dans le même sens que la teneur en BCAA. Toutefois, l'analyse des corrélations sur résidus a indiqué que les transcrits *ZmAHAS1*, *ZmKAR1*, *ZmKAR2* et *ZmBCAT4* étaient positivement corrélés entre eux, ainsi qu'à un certain nombre des 13 métabolites diminués par la sur-expression du gène *ZmASR1*. Les différentes enzymes impliqués dans la biosynthèse des BCAA sont connues pour être soumises à des rétro-contrôles positifs et/ou négatifs par les BCAA, tels que l'inhibition de l'enzyme AHAS par les trois BCAA (Joshi et al., 2010). Par conséquent, il est possible que la diminution observée chez les sur-expressseurs puisse avoir l'effet inverse et induire l'expression des gènes *ZmAHAS1*, *ZmKAR1* et *ZmKAR2*. Par ailleurs, il est intéressant de noter que les protéines *ZmKAR1* et *ZmKAR2*, comme la protéine *ZmASR1*, sont plus abondantes dans les cellules de mésophylle (Li et al., 2010 ; Friso et al., 2010). Nos travaux ont donc permis d'impliquer la protéine *ZmASR1* dans la régulation de la biosynthèse des BCAA et de suggérer que cette voie jouerait un rôle important dans l'augmentation des composantes végétatives et reproductrices chez le maïs (Fig. 15).

Par ailleurs, il est intéressant de noter que sur les 25 gènes affectés par la sur-expression du gène *ZmASR1*, 20 pourraient être sujet à des mécanismes de régulation redox dépendant des Trx. La régulation redox liée aux modifications du statut thiol/disulfure des protéines est effectuées par des protéines spécifiques, et en particulier par les Trx qui, sont des senseurs de l'état redox cellulaire en raison du dithiol très réactif présent dans leur site actif. Récemment, les Trx ont été impliquées dans des systèmes anti-oxydants, pouvant

servir de substrats réducteurs à des enzymes capables soit de détoxifier les espèces réactives de l'oxygène (péroxydases), soit d'en réparer les effets délétères (méthionine sulfoxide réductase). De manière intéressante, la protéine AtIPMDH1 a récemment été identifiée comme une cible des Trx chez *A. thaliana* (He et al., 2009). Nous avons montré que les protéines IPMDH de maïs étaient également régulées de manière rédox en réponse au déficit hydrique. Cependant, nous n'avons pas observé d'effet de la sur-expression du gène *ZmASR1* sur l'abondance de leurs formes réduites et oxydées. Toutefois, l'anticorps anti-AtIPMDH utilisé reconnaissait plusieurs isoformes d'IPMDH dans les feuilles de maïs. Par conséquent, les résultats obtenus ne permettent pas d'exclure que la protéine *ZmASR1* posséderait un impact sur la régulation redox de ces cibles (Fig. 15).

#### 4.1.3. Perspectives

Pour valider les deux fonctions potentielles de la protéine *ZmASR1*, il s'agira d'établir sa localisation subcellulaire à l'aide d'un gène rapporteur GFP. Si comme le laisse supposer l'analyse de sa séquence peptidique, la protéine *ZmASR1* est localisée à la fois dans le cytoplasme et le noyau, différentes analyses pourront ensuite être entreprises afin de déterminer si elle a une action directe ou indirecte sur ces cibles nucléiques et protéiques.

Afin de déterminer l'action de la protéine *ZmASR1* sur ses cibles nucléiques, une interaction physique pourrait tout d'abord être recherchée *in vitro* par la méthode du gel retard ou de résonance des plasmons de surface (« surface plasmon resonance » en anglais) à l'aide des promoteurs des gènes cibles et de la protéine recombinante *ZmASR1* produite au cours de ma thèse. Une analyse *in vivo* par la méthode de « Chromatin ImmunoPrecipitation on Chip » (ChiP) suivie d'expériences de PCR quantitative permettraient ensuite de confirmer les interactions mises en évidence *in vitro*. Cette méthode nécessiterait d'avoir un anticorps anti-*ZmASR1* immunoprécipitant ou des plantes transgéniques exprimant la protéine *ZmASR1* avec une étiquette spécifique reconnue par un anticorps immunoprécipitant. Une alternative consisterait à étudier le transcriptome et le protéome de plantes transgéniques sous-exprimant le gène *ZmASR1*. Des plantes transgénique RNAi n'exprimant plus le gène *ZmASR1* ont d'ores et déjà été produites. Il s'agirait de réaliser une analyse du transcriptome et du protéome foliaire des plantes RNAi-*ZmASR1* au même stade de développement et dans les mêmes conditions environnementales que ceux réalisés avec les sur-expressseurs *ZmASR1* pour pouvoir conclure. A plus long terme, les éléments *cis* reconnus par la protéine *ZmASR1* devraient être identifiés. Les séquences promotrices des gènes cibles seraient obtenues par recherche

des bases de données et/ou séquençage, puis analysées par des tests de *trans*-activation. Ceux-ci consisteraient à co-bombarder des grains de maïs immatures avec les séquences identifiées de taille plus ou moins longue (ou mutagénisées si des motifs consensus étaient mis en évidence) couplées à un gène rapporteur GUS et le gène *ZmASR1* sous le contrôle du promoteur *CsVMV*, puis de quantifier l'interaction par des mesures d'activité GUS.

Parallèlement, il s'agira de déterminer si la protéine *ZmASR1* a une action directe ou indirecte sur ces cibles protéiques par (1) purification d'extraits protéiques à l'aide d'une colonne d'affinité couplée à la protéine *ZmASR1*-GST, (2) co-immunoprécipitation *in vivo* à l'aide de plantes transgéniques sur-exprimant le gène *ZmASR1* et les protéines cibles avec des étiquettes différentes reconnues par des anticorps immunoprécipitants. Il serait également intéressant de déterminer qu'elle est la contribution de la régulation rédox dans ces interactions. Dans ce but, il serait intéressant de développer des anticorps spécifiques des protéines cibles de la protéine *ZmASR1*, en particulier des protéines *ZmIPMDH1* et *ZmIPMDH2*, et d'analyser l'impact de la sur-expression du gène *ZmASR1* sur leur état redox grâce à des « redox Western ». A plus long terme, l'influence des différentes Trx plastidiales connues pourrait être analysée sur les cibles protéiques pour préciser la nature des Trx impliquées. De plus, il serait intéressant d'analyser l'influence de la protéine *ZmASR1* sur les Trx plastidiales afin de mettre en avant le rôle effectif de la protéine *ZmASR1* dans la régulation redox cellulaire, en réponse au déficit hydrique.

## **4.2. Etude des mécanismes de régulation des gènes *ZmASR***

### **4.2.1. Analyse phylogénétique de la famille *ZmASR***

L'analyse *in silico* réalisée au laboratoire a permis d'identifier neuf gènes *ZmASR* chez le maïs. Une analyse phylogénétique a ensuite été réalisée pour essayer d'établir des relations d'orthologie entre les gènes *ASR*. En effet, deux gènes orthologues, c'est-à-dire issus d'une spéciation et ayant ainsi un ancêtre commun (Fitch, 1970), ont une forte probabilité d'avoir la même fonction. La phylogénie réalisée sur un total de 100 séquences *ASR* identifiées dans les banques de données, a permis d'établir que les duplications des gènes *ASR* se sont produites indépendamment chez les conifères, les monocotylédones et les dicotylédones. De plus, elle a permis de montrer que la famille des poacées était organisée en cinq clades, confirmant l'analyse phylogénétique réalisée parallèlement par R. Philippe (2010). Par ailleurs, la cartographie des gènes *ZmASR* a permis de montrer que l'ensemble des séquences de riz, de sorgo et de maïs de chacun des clades pouvait être affectées à l'un des cinq protochromosomes de l'ancêtre commun des poacées et de

suggérer que sept gènes *ASR* étaient présents chez l'ancêtre intermédiaire à 12 chromosomes (Murat et al., 2010).

Il est intéressant de noter que les protéines ASR d'un même clade ou même sous-clade de poacées présentent des caractéristiques protéiques similaires. Ainsi, les protéines des sous-clades I-2 et I-3, auxquels appartiennent respectivement les gènes *ZmASR3* et *ZmASR4*, présentent la particularité d'être dépourvues en N-terminal de la région riche en His et d'avoir à la place une région spécifique. Ceci suggère une différenciation du gène ancestral de ces deux sous-clades par l'acquisition de la séquence nucléique supplémentaire qui pourrait jouer un rôle dans leur régulation ou la reconnaissance de partenaires pour des interactions protéine-protéine. Par ailleurs, l'ensemble des protéines ASR du clade II, auquel appartiennent les gènes *ZmASR5*, *ZmASR6*, *ZmASR7-1*, *ZmASR7-2* et *ZmASR7-3*, a un signal de localisation nucléaire (NLS) incomplet (perte du motif B) voir absent, suggérant que ces protéines sont préférentiellement cytoplasmiques. Au contraire, les protéines ASR des sous-clade I-1 et I-2 ont toutes, à une exception près, un NLS bipartite, ce qui suggère qu'elles ont une localisation préférentiellement nucléaire. Enfin, les protéines ASR des sous-clades I-1, I-2 et II-2, et en particulier les protéines *ZmASR1*, *ZmASR2*, *ZmASR3*, *ZmASR7-2* et *ZmASR7-3*, ont un pourcentage d'identité compris entre 71 et 86% avec le domaine de fixation à l'ADN dépendant du  $Zn^{2+}$  identifié chez la protéine *SlASR1* de tomate (Rom et al., 2006), ce qui suggère qu'elle serait susceptible de réguler l'expression de gènes.

#### 4.2.2. Mise en évidence d'une régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle des gènes *ZmASR*

Les analyses de transcrits par qRT-PCR et de protéomique quantitative à l'aide de gels 2D nous ont permis de mesurer l'expression de six des neuf membres de la famille *ZmASR* (six transcrits : *ZmASR1*, *ZmASR2*, *ZmASR3*, *ZmASR4*, *ZmASR5* et *ZmASR7-1* ; trois protéines : *ZmASR1*, *ZmASR2* et *ZmASR3*). Quoique incomplètes, ces données d'expression apportent de nouvelles connaissances par comparaison aux données actuellement présentes dans la littérature (Riccardi et al., 1998, 2004 ; Furumoto et al., 2000 ; Li et al., 2010 ; Friso et al., 2010).

Nous avons montré que les six transcrits *ZmASR* analysés étaient exprimés dans les feuilles, les racines et les grains. Les expériences de qRT-PCR et de gels 2D montrent que le gène *ZmASR1* est l'un des gènes *ZmASR* les plus exprimés dans la feuille, la racine et le grain. Le gène *ZmASR5* serait le gène le plus faiblement exprimé dans la feuille et la racine, alors que le gène *ZmASR4* serait le gène le plus faiblement exprimé dans le grain.



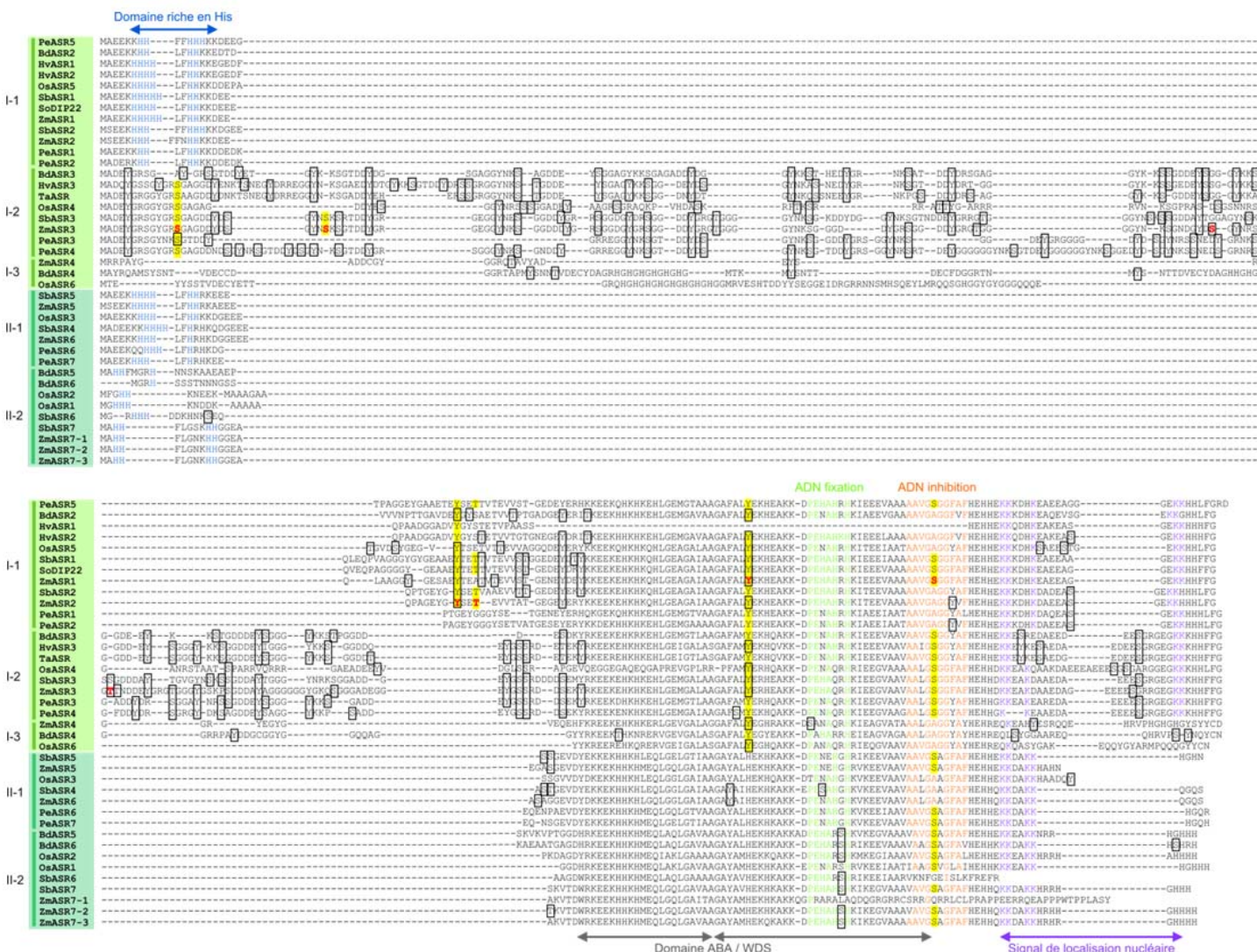
Par ailleurs, les données transcriptomiques obtenues par Li et al. (2010) montrent que les transcrits *ZmASR1*, *ZmASR2*, *ZmASR3* et *ZmASR5*, seraient préférentiellement exprimés dans les cellules de mésophylle, alors que le transcrit *ZmASR4* serait préférentiellement exprimé dans les cellules de la gaine périvasculaire. Les analyses par Western 2D ont confirmé que la protéine ZmASR1 était absente chez la lignée F2, alors que le transcrit était bien présent, suggérant une régulation post-transcriptionnelle de ce gène chez cette lignée de maïs. Curieusement ce phénomène n'a été observé sur aucune des autres lignées testées jusqu'à présent.

Nos travaux ont également montré que les six gènes ZmASR étudiés répondaient de manière différente au déficit hydrique selon le tissu considéré. Ainsi, les quatre transcrits *ZmASR1*, *ZmASR2*, *ZmASR4* et *ZmASR7-1* étaient augmentés dans la feuille en condition de déficit hydrique, alors que seul le transcrit *ZmASR4* était augmenté dans le grain. Les analyses de gels 2D ont permis de confirmer les profils d'expression des gènes *ZmASR1* et *ZmASR3*. En revanche, elles ont montré que la quantité de la protéine ZmASR2 augmentait de manière relativement modeste au déficit hydrique par comparaison au profil de transcrits.

Les résultats obtenus ont également montré que les gènes *ASR* d'un même sous-clade de poacées répondaient de manière relativement similaire au déficit hydrique dans la feuille. Ainsi, les gènes *ASR* des sous-clade I-1 (*ZmASR1*, *ZmASR2*, *OsASR5*, *SoDIP22*), I-3 (*ZmASR4*, *OsASR6*) et II-2 (*ZmASR7-1*, *OsASR*, *OsASR1*) sont induits par le déficit hydrique, alors que ceux des sous-clades I-2 (*ZmASR3*, *OsASR4*) et II-1 (*ZmASR5*, *OsASR3*) sont réprimés par le déficit hydrique ou ne répondent pas au déficit hydrique (Sugiharto et al., 2002 ; Rabbani et al., 2003 ; Takasaki et al., 2008 ; Philippe et al., 2010). L'ensemble des résultats obtenus suggère donc une sous-fonctionnalisation des gènes *ASR* des poacées selon la cellule, l'organe et le traitement considérés.

#### 4.2.3. Mise en évidence d'une phosphorylation des protéines ZmASR

Les analyses protéomiques réalisées dans la feuille mature ont tout d'abord permis de montrer que la protéine ZmASR1 était phosphorylable *in vitro*. Elles ont ensuite permis d'établir que les protéines ZmASR2 et ZmASR3 étaient phosphorylées *in vivo* en condition de déficit hydrique et de suggérer que la protéine ZmASR1 le serait également. Enfin, elles ont permis d'identifier plusieurs sites de phosphorylation : (1) deux sites *in vitro* chez la protéine ZmASR1 ; (2) deux sites *in vivo* chez la protéine ZmASR2, (3) quatre sites *in vivo* chez la protéine ZmASR3.



**Figure 16. Comparaison des sites de phosphorylation prédits et identifiés expérimentalement pour les protéines ASR de Poacées.** Le domaine riche en His et le domaine ABA/WDS caractéristiques des protéines ASR sont indiqués respectivement par des flèches bleues et grises. Les acides aminés en vert sont identiques aux acides aminés du motif nécessaire à la fixation à l'ADN dépendante du Zn<sup>2+</sup> de la protéine SIASR1, alors que ceux en orange correspondent à la séquence empêchant sa fixation (Rom et al. 2006). Les acides aminés en violet sont identiques aux acides aminés du signal de localisation nucléaire identifié chez la protéine LLA23 (Wang et al., 2006). Les clades I et II sont indiqués respectivement par des carrés vert clair et vert foncé. Les rectangles noir correspondent aux résidus prédits comme phosphorylés par le logiciel NetPhos. Les acides aminés en rouge correspondent aux sites phosphorylés identifiés par l'analyse LC-MS/MS.

L'analyse du protéome de feuilles de maïs avait permis de mettre en évidence que les protéines ZmASR2 et ZmASR3 existaient sous la forme de trains de spots, le nombre total de spots étant maximal dans la feuille différenciée avec trois spots identifiés pour la protéine ZmASR2 et quatre pour la protéine ZmASR3. Compte tenu du nombre de sites de phosphorylation identifiés *in vivo*, il est possible que les spots ZmASR2.1, ZmASR2.2 et ZmASR2.3 correspondent à la protéine ZmASR2 ayant respectivement zéro, un et deux résidus phosphorylés. De façon similaire, les spots ZmASR3.1, ZmASR3.2, ZmASR3.3 et ZmASR3.4 correspondraient à la protéine ZmASR3 ayant respectivement un, deux, trois et quatre résidus phosphorylés. De manière intéressante, l'abondance des différents spots protéique au sein des trains de spots varie au cours du développement de la feuille et en réponse au déficit hydrique. Ces résultats suggèrent donc que les protéines ZmASR2 et ZmASR3 seraient régulées par phosphorylation en réponse au déficit hydrique.

Les deux sites de phosphorylation identifiés *in vitro* (S107 et Y78) sur la protéine ZmASR1 ont été obtenus avec seulement deux des quatre kinases testées. L'une d'elles correspondait à la protéine recombinante AtOST1, une protéine kinase de la sous-famille SnRK2 dont la plupart des membres sont activés par un stress osmotique (Boudsocq et al., 2004). Il est intéressant de noter que la protéine AtOST1 présente la particularité, comme deux autres membres de la famille SnRK2, d'être activée par l'ABA et de jouer un rôle clé dans la fermeture stomatique et l'homéostasie métabolique (Assmann et al., 2003 ; Boudsocq et al., 2007 ; Zheng et al., 2010). Bien qu'elle soit apparentée à la même famille de protéines kinases, la protéine AtSnRK1 s'est avérée incapable de phosphoryler la protéine ZmASR1 *in vitro*. Ceci suggère donc que les résultats de phosphorylation obtenus *in vitro* ne sont pas des artefacts et mettent en avant un lien possible entre la protéine kinase AtOST1 et la protéine ZmASR1.

Comme cela n'est pas rare dans la littérature, les sites identifiés *in vitro* sur la protéine ZmASR1 sont différents des sites identifiés *in vivo* sur les protéines ZmASR2 et ZmASR3. En effet, les premiers sont présents dans le domaine ABA-WDS situé en C-terminal et conservé chez l'ensemble des protéines ASR, alors que les seconds sont présents en N-terminal dans une région très peu conservée et spécifique de chaque sous-clade de poacées auxquels les protéines ZmASR2 et ZmASR3 appartiennent. Ceci suggère donc que ces sites auraient des fonctions différentes : les sites identifiés en N-terminal pourraient favoriser des interactions protéine-protéine spécifiques, alors que ceux identifiés en C-terminal pourraient modifier l'activité de la protéine ZmASR1 (Fig. 16). En effet, il est notable que le premier site identifié en C-terminal (Y78) est situé au niveau du domaine connu pour être impliqué dans la fixation à l'ADN, alors que le second (S107) est situé

dans le domaine empêchant la fixation à l'ADN (Fig. 16). Dans la littérature, l'activité des facteurs de transcription, tels que les basic domain-containing leucine-zipper (bZIP), est connue pour être régulée par phosphorylation des domaines de fixation à l'ADN en réponse à l'ABA ou à d'autres stress (Kirchler et al., 2010). De manière intéressante, le résidu Y78 est spécifique des protéines du clade I des poacées, une His étant présente chez les protéines ASR du clade II (Fig. 16). La présence d'une Tyr chez l'ancêtre *Musa* suggère donc une perte de ce résidu chez les protéines ASR du clade II, ce qui pourrait avoir un impact fonctionnel sur les protéines de ce clade. Contrairement au site Y78, le site S107 est commun à plusieurs ASR des deux clades de poacées, suggérant une acquisition de la Ser par mutations indépendantes.

#### 4.2.4. Perspectives

A court terme, il s'agira de confirmer que la protéine ZmASR1 est phosphorylée *in vivo* et de montrer que cette phosphorylation, ainsi que celle des protéines ZmASR2 et ZmASR3, varie en réponse au déficit hydrique. Pour confirmer que la protéine ZmASR1 est phosphorylée *in vivo*, de nouveaux Western 2D sont prévus au printemps 2011 (stage M1 de S. Bobet) avec l'anticorps anti-ZmASR1 et des extraits foliaires irrigués ou stressés qui auront été enrichis en phosphoprotéines, puis traités ou non avec une phosphatase, et enfin co-migrés. Une alternative consisterait à optimiser les essais kinase *in vitro* réalisés avec la protéine recombinante GST-ZmASR1 et les extraits protéiques foliaires de plantes cultivées en condition irriguées et de déficit hydrique. Il serait également intéressant de refaire une analyse de phosphopeptides à partir d'extraits irrigués et stressés suivant le protocole optimisé au cours du stage de M1 de T. Vain. Ceci permettrait de (1) confirmer les données obtenues *in vivo* pour les protéines ZmASR2 et ZmASR3, (2) de déterminer si les sites phosphorylés identifiés varient en réponse au déficit hydrique, (3) d'identifier éventuellement la phosphorylation d'autres protéines ZmASR.

A moyen terme, une analyse phylogénique pourrait être effectuée au niveau moléculaire pour évaluer l'existence d'une pression de sélection sur certains des nucléotides codant les résidus phosphorylés identifiés. Cette analyse doit se faire avec un ensemble de séquences assez conséquent. A l'heure actuelle, elle n'est donc possible que sur les sites identifiés *in vitro* car ils sont localisés dans le domaine ABA/WDW conservé, alors que ceux identifiés *in vivo* sont spécifiques de sous-clades de poacées, dont le nombre de séquences est encore relativement restreint. En parallèle, il serait envisageable de cloner les gènes *ZmASR* pour générer par PCR des mutations inactivant (substitution par une Gly)

ou mimant (substitution par un Glu) les différents sites de phosphorylation identifiés *in vivo*. Après transformation, le phénotype des plantes ainsi générées serait étudié, ainsi que la variation quantitative des trains de spots d'isoformes en réponse à la sécheresse. Dans le cas de la protéine ZmASR1, il serait en particulier intéressant de déterminer l'impact de ces mutations sur l'expression des cibles transcriptomiques et protéomiques mises en évidence.

A plus long terme, il s'agirait d'identifier la ou les protéines kinases impliquées dans la régulation par phosphorylation des protéines ZmASR par immunoprécipitation à l'aide d'un anticorps anti-ZmASR immunoprécipitant.

## **CONCLUSION GENERALE**

## CONCLUSION GENERALE

Les étés 2003 et 2006 nous ont rappelé que l'eau est une ressource limitée qui fait l'objet d'une compétition entre les usages agricoles et industriels. La recherche de plantes plus tolérantes à la sécheresse est donc un enjeu fondamental pour la production agricole dans les prochaines décennies. Le maïs est particulièrement concerné en raison de la position estivale de son cycle cultural. Dans ce contexte, ma thèse a consisté à entreprendre une analyse multidisciplinaire pour identifier et caractériser des gènes impliqués dans la variation de caractères complexes affectés par la sécheresse chez le maïs, en utilisant des outils relevant de la génétique, de la transcriptomique, de la protéomique, de la métabolomique et de la biochimie.

La première partie de ma thèse a permis d'identifier huit gènes candidats exprimés différemment entre les deux populations de lignées recombinantes analysées et co-localisant avec la région chromosomique ciblée contenant un QTL de sensibilité de la croissance foliaire au déficit hydrique et un QTL de protandrie en condition de déficit hydrique. L'ensemble des données obtenues a débouché sur un modèle original de régulation des voies métaboliques de la lignine et des acides gras par le facteur de transcription ZmMYB31 en réponse au déficit hydrique, ainsi que sur deux demandes de brevets pour deux des huit gènes candidats identifiés. Pour les valider et conforter le modèle proposé, des plantes transgéniques ont été produites et sont actuellement en cours de caractérisation.

La seconde partie de ma thèse a permis de valider au champ le rôle important joué par la protéine candidate ZmASR1 chez le maïs en condition de déficit hydrique et d'accéder à une meilleure compréhension de son rôle biologique, via son implication dans la régulation de la biosynthèse des BCAA. L'étude de la famille *ZmASR* a en outre permis de montrer que certains des membres de cette famille étaient soumis à différents niveaux de régulation en réponse au déficit hydrique. Elle ouvre donc des perspectives quant à leur intérêt dans la réponse à la sécheresse chez le maïs.

Pour conclure, les résultats obtenus au cours de ma thèse ont débouché sur la création d'outils originaux qui permettront, je l'espère, une amélioration de la tolérance des plantes à la sécheresse.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abebe T, Guenzi AC, Martin B, Cushman JC** (2003) Tolerance of mannitol-accumulating transgenic wheat to water stress and salinity. *Plant Physiol* **131**: 1748-1755
- Agarwal M, Hao Y, Kapoor A, Dong CH, Fujii H, Zheng X, Zhu JK** (2006) A R2R3 type MYB transcription factor is involved in the cold regulation of CBF genes and in acquired freezing tolerance. *J Biol Chem* **281**: 37636-37645
- Alexandersson E, Fraysse L, Sjoval-Larsen S, Gustavsson S, Fellert M, Karlsson M, Johanson U, Kjellbom P** (2005) Whole gene family expression and drought stress regulation of aquaporins. *Plant Mol Biol* **59**: 469-484
- Amigues E, Hardacre C, Keane G, Migaud M, O'Neill M** (2006) Ionic liquids--media for unique phosphorus chemistry. *Chem Commun (Camb)*: 72-74
- Assmann SM** (2003) OPEN STOMATA1 opens the door to ABA signaling in Arabidopsis guard cells. *Trends Plant Sci* **8**: 151-153
- Baena-Gonzalez E, Sheen J** (2008) Convergent energy and stress signaling. *Trends Plant Sci* **13**: 474-482
- Barnabas B, Jager K, Feher A** (2008) The effect of drought and heat stress on reproductive processes in cereals. *Plant Cell Environ* **31**: 11-38
- Bartels D, Sunkar R** (2005) Drought and salt tolerance in plants. critical review in plant sciences **24**: 23-58
- Bates B, Kundzewicz ZW, Wu S, Palutikof JP** (2008) Le changement climatique et l'eau. Document technique publié par le Groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat. Secrétariat du GIEC, Genève, 236 p.
- Battaglia M, Olvera-Carrillo Y, Garciarrubio A, Campos F, Covarrubias AA** (2008) The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. *Plant Physiol* **148**: 6-24
- Beisson F, Koo AJ, Ruuska S, Schwender J, Pollard M, Thelen JJ, Paddock T, Salas JJ, Savage L, Milcamps A, Mhaske VB, Cho Y, Ohlrogge JB** (2003) Arabidopsis genes involved in acyl lipid metabolism. A 2003 census of the candidates, a study of the distribution of expressed sequence tags in organs, and a web-based database. *Plant Physiol* **132**: 681-697
- Ben-Haj-Salah H, Tardieu F** (1997) Control of leaf expansion rate of droughted maize plants under fluctuating evaporative demand. *Plant Physiol* **114**: 893-900
- Bhatnagar-Mathur P, Vadez V, Sharma KK** (2008) Transgenic approaches for abiotic stress tolerance in plants: retrospect and prospects. *Plant Cell Rep* **27**: 411-424

- Bies-Etheve N, Gaubier-Comella P, Debures A, Lasserre E, Jobet E, Raynal M, Cooke R, Delseny M** (2008) Inventory, evolution and expression profiling diversity of the LEA (late embryogenesis abundant) protein gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* **67**: 107-124
- Boersema PJ, Mohammed S, Heck AJ** (2009) Phosphopeptide fragmentation and analysis by mass spectrometry. *J Mass Spectrom* **44**: 861-878
- Boudsocq M, Barbier-Brygoo H, Lauriere C** (2004) Identification of nine sucrose nonfermenting 1-related protein kinases 2 activated by hyperosmotic and saline stresses in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* **279**: 41758-41766
- Boudsocq M, Droillard MJ, Barbier-Brygoo H, Lauriere C** (2007) Different phosphorylation mechanisms are involved in the activation of sucrose non-fermenting 1 related protein kinases 2 by osmotic stresses and abscisic acid. *Plant Mol Biol* **63**: 491-503
- Boyle MG, Boyer JS, Morgan PW** (1991) Stem infusion of liquid medium prevents reproductive failure of maize at low water potential. *Crop Sciences* **31**: 1246-1252
- Brown AP, Affleck V, Fawcett T, Slabas AR** (2006) Tandem affinity purification tagging of fatty acid biosynthetic enzymes in *Synechocystis* sp. PCC6803 and *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* **57**: 1563-1571
- Cakir B, Agasse A, Gaillard C, Saumonneau A, Delrot S, Atanassova R** (2003) A grape ASR protein involved in sugar and abscisic acid signaling. *Plant Cell* **15**: 2165-2180
- Campos H, Cooper M, Habben JE, Edmeades GO, Schussler JR** (2004) Improving drought tolerance in maize: a view from industry. *Field Crops Research* **90**: 19-34
- Casson SA, Hetherington AM** (2010) Environmental regulation of stomatal development. *Curr Opin Plant Biol* **13**: 90-95
- Castiglioni P, Warner D, Bensen RJ, Anstrom DC, Harrison J, Stoecker M, Abad M, Kumar G, Salvador S, D'Ordine R, Navarro S, Back S, Fernandes M, Targolli J, Dasgupta S, Bonin C, Luethy MH, Heard JE** (2008) Bacterial RNA chaperones confer abiotic stress tolerance in plants and improved grain yield in maize under water-limited conditions. *Plant Physiol* **147**: 446-455
- Chaves M, Maroco J, Pereira J** (2003) Understanding plant responses to drought: from genes to whole plant. *Fonctionnal Plant Biology* **30**: 239-264
- Coello P, Hey SJ, Halford NG** (2011) The sucrose non-fermenting-1-related (SnRK) family of protein kinases: potential for manipulation to improve stress tolerance and increase yield. *J Exp Bot* **62**: 883-893

- Collins NC, Tardieu F, Tuberosa R** (2008) Quantitative trait loci and crop performance under abiotic stress: where do we stand? *Plant Physiol* **147**: 469-486
- Cominelli E, Sala T, Calvi D, Gusmaroli G, Tonelli C** (2008) Over-expression of the Arabidopsis AtMYB41 gene alters cell expansion and leaf surface permeability. *Plant J* **53**: 53-64
- Cosgrove DJ** (2005) Growth of the plant cell wall. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**: 850-861
- Cutler SR, Rodriguez PL, Finkelstein RR, Abrams SR** (2010) Abscisic acid: emergence of a core signaling network. *Annu Rev Plant Biol* **61**: 651-679
- Dai JR, Liu B, Feng DR, Liu HY, He YM, Qi KB, Wang HB, Wang JF** (2011) MpAsr encodes an intrinsically unstructured protein and enhances osmotic tolerance in transgenic Arabidopsis. *Plant Cell Rep* DOI: 10.1007/s00299-011-1030-1
- Damerval C, Maurice A, Josse JM, de Vienne D** (1994) Quantitative trait loci underlying gene product variation: a novel perspective for analyzing regulation of genome expression. *Genetics* **137**: 289-301
- de Vienne D, Leonardi A, Damerval C, Zivy M** (1999) Genetics of proteome variation for QTL characterization: application to drought-stress response in maize. *Journal of Experimental Botany* **50**: 303-309
- DeWald DB, Torabinejad J, Jones CA, Shope JC, Cangelosi AR, Thompson JE, Prestwich GD, Hama H** (2001) Rapid accumulation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and inositol 1,4,5-trisphosphate correlates with calcium mobilization in salt-stressed arabidopsis. *Plant Physiol* **126**: 759-769
- Doczi R, Kondrak M, Kovacs G, Beczner F, Banfalvi Z** (2005) Conservation of the drought-inducible DS2 genes and divergences from their ASR paralogues in solanaceous species. *Plant Physiol Biochem* **43**: 269-276
- Dodd AN, Kudla J, Sanders D** (2010) The language of calcium signaling. *Annu Rev Plant Biol* **61**: 593-620
- Dubos C, Stracke R, Grotewold E, Weisshaar B, Martin C, Lepiniec L** (2010) MYB transcription factors in Arabidopsis. *Trends Plant Sci* **15**: 573-581
- Dunford RP, Catley MA, Raines CA, Lloyd JC, Dyer TA** (1998) Purification of active chloroplast sedoheptulose-1,7-bisphosphatase expressed in Escherichia coli. *Protein Expr Purif* **14**: 139-145
- Dure L, Galau GA** (1981) Developmental Biochemistry of Cottonseed Embryogenesis and Germination : XIII. REGULATION OF BIOSYNTHESIS OF PRINCIPAL STORAGE PROTEINS. *Plant Physiol* **68**: 187-194

- Engler C, Kandzia R, Marillonnet S** (2008) A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. *PLoS One* **3**: e3647
- Fitch WM** (1970) Distinguishing homologous from analogous proteins. *Syst Zool* **19**: 99-113
- Fornale S, Shi X, Chai C, Encina A, Irar S, Capellades M, Fuguet E, Torres JL, Rovira P, Puigdomenech P, Rigau J, Grotewold E, Gray J, Caparros-Ruiz D** (2010) *ZmMYB31* directly represses maize lignin genes and redirects the phenylpropanoid metabolic flux. *Plant J* **64**: 633-644
- Fornale S, Sonbol FM, Maes T, Capellades M, Puigdomenech P, Rigau J, Caparros-Ruiz D** (2006) Down-regulation of the maize and *Arabidopsis thaliana* caffeic acid O-methyl-transferase genes by two new maize R2R3-MYB transcription factors. *Plant Mol Biol* **62**: 809-823
- Frankel N, Nunes-Nesi A, Balbo I, Mazuch J, Centeno D, Iusem ND, Fernie AR, Carrari F** (2007) *ci21A/Asr1* expression influences glucose accumulation in potato tubers. *Plant Mol Biol* **63**: 719-730
- Friso G, Majeran W, Huang M, Sun Q, van Wijk KJ** (2010) Reconstruction of metabolic pathways, protein expression, and homeostasis machineries across maize bundle sheath and mesophyll chloroplasts: large-scale quantitative proteomics using the first maize genome assembly. *Plant Physiol* **152**: 1219-1250
- Furumoto T, Hata S, Izui K** (2000) Isolation and characterization of cDNAs for differentially accumulated transcripts between mesophyll cells and bundle sheath strands of maize leaves. *Plant Cell Physiol* **41**: 1200-1209
- Gaufichon L, Prioul JL, Bachelier B** (2010) Quelles sont les perspectives d'amélioration génétique de plantes cultivées tolérantes à la sécheresse? *In*. Etude de la fondation FARM
- Goyal K, Walton LJ, Tunnacliffe A** (2005) LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress. *Biochem J* **388**: 151-157
- Granier C, Inze D, Tardieu F** (2000) Spatial distribution of cell division rate can be deduced from that of p34(*cdc2*) kinase activity in maize leaves grown at contrasting temperatures and soil water conditions. *Plant Physiol* **124**: 1393-1402
- Grelet J, Benamar A, Teyssier E, Avelange-Macherel MH, Grunwald D, Macherel D** (2005) Identification in pea seed mitochondria of a late-embryogenesis abundant protein able to protect enzymes from drying. *Plant Physiol* **137**: 157-167

- Halford NG, Hey SJ** (2009) Snf1-related protein kinases (SnRKs) act within an intricate network that links metabolic and stress signalling in plants. *Biochem J* **419**: 247-259
- Hand SC, Menze MA, Toner M, Boswell L, Moore D** (2011) LEA proteins during water stress: not just for plants anymore. *Annu Rev Physiol* **73**: 115-134
- Hara M, Kumagai K, Kunboi T** (2002) Characterization and Expression of a Water Stress Responsive Gene from a Seashore Plant *Calystegia Soldanella*. *Plant Biotechnology* **19**: 227-281
- Haussuhl K, Andersson B, Adamska I** (2001) A chloroplast DegP2 protease performs the primary cleavage of the photodamaged D1 protein in plant photosystem II. *Embo J* **20**: 713-722
- He Y, Mawhinney TP, Preuss ML, Schroeder AC, Chen B, Abraham L, Jez JM, Chen S** (2009) A redox-active isopropylmalate dehydrogenase functions in the biosynthesis of glucosinolates and leucine in *Arabidopsis*. *Plant J* **60**: 679-690
- Hoisington D, Khairallah M, Reeves T, Ribaut JM, Skovmand B, Taba S, Warburton M** (1999) Plant genetic resources: what can they contribute toward increased crop productivity? *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 5937-5943
- Hong-Bo S, Li-Ye C, Ming-An S** (2008) Calcium as a versatile plant signal transducer under soil water stress. *Bioessays* **30**: 634-641
- Hong-Bo S, Zong-Suo L, Ming-An S** (2005) LEA proteins in higher plants: structure, function, gene expression and regulation. *Colloids Surf B Biointerfaces* **45**: 131-135
- Jaspers P, Kangasjarvi J** (2010) Reactive oxygen species in abiotic stress signaling. *Physiol Plant* **138**: 405-413
- Jeanneau M, Gerentes D, Foueillassar X, Zivy M, Vidal J, Toppan A, Perez P** (2002) Improvement of drought tolerance in maize: towards the functional validation of the *ZmASR1* gene and increase of water use efficiency by over-expressing C4-PEPC. *Biochimie* **84**: 1127-1135
- Jones HG** (1992) Drought and drought tolerance. Cambridge University Press, UK.
- Joshi V, Joung JG, Fei Z, Jander G** (2010) Interdependence of threonine, methionine and isoleucine metabolism in plants: accumulation and transcriptional regulation under abiotic stress. *Amino Acids* **39**: 933-947
- Kalifa Y, Gilad A, Konrad Z, Zaccari M, Scolnik PA, Bar-Zvi D** (2004) The water- and salt-stress-regulated *Asr1* (abscisic acid stress ripening) gene encodes a zinc-dependent DNA-binding protein. *Biochem J* **381**: 373-378

- Kalifa Y, Perlson A, Gilad A, Konrad Z, Scolnik PA, Bar-Zvi D** (2004) Over-expression of the water and salt stress-regulated *Asr1* gene confers an increased salt tolerance. *Plant cell and Environment* **27**: 1459-1468
- Karpilov YS** (1970) Cooperative photosynthesis in xerophytes. *Proc Moldavian Inst Irrigation Agric Res* **11**: 3-66
- Ke Y, Han G, He H, Li J** (2009) Differential regulation of proteins and phosphoproteins in rice under drought stress. *Biochem Biophys Res Commun* **379**: 133-138
- Kim TH, Bohmer M, Hu H, Nishimura N, Schroeder JI** (2010) Guard cell signal transduction network: advances in understanding abscisic acid, CO<sub>2</sub>, and Ca<sup>2+</sup> signaling. *Annu Rev Plant Biol* **61**: 561-591
- Kirchler T, Briesemeister S, Singer M, Schutze K, Keinath M, Kohlbacher O, Vicente-Carbajosa J, Teige M, Harter K, Chaban C** (2010) The role of phosphorylatable serine residues in the DNA-binding domain of Arabidopsis bZIP transcription factors. *Eur J Cell Biol* **89**: 175-183
- Klimecka M, Muszynska G** (2007) Structure and functions of plant calcium-dependent protein kinases. *Acta Biochim Pol* **54**: 219-233
- Knight H** (2000) Calcium signaling during abiotic stress in plants. *Int Rev Cytol* **195**: 269-324
- 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**: 175-182
- Konrad Z, Bar-Zvi D** (2008) Synergism between the chaperone-like activity of the stress regulated ASR1 protein and the osmolyte glycine-betaine. *Planta* **227**: 1213-1219
- Kosma DK, Bourdenx B, Bernard A, Parsons EP, Lu S, Joubes J, Jenks MA** (2009) The impact of water deficiency on leaf cuticle lipids of Arabidopsis. *Plant Physiol* **151**: 1918-1929
- Lemaire SD, Michelet L, Zaffagnini M, Massot V, Issakidis-Bourguet E** (2007) Thioredoxins in chloroplasts. *Curr Genet* **51**: 343-365
- Li P, Ponnala L, Gandotra N, Wang L, Si Y, Tausta SL, Kebrom TH, Provart N, Patel R, Myers CR, Reidel EJ, Turgeon R, Liu P, Sun Q, Nelson T, Brutnell TP** (2010) The developmental dynamics of the maize leaf transcriptome. *Nat Genet* **42**: 1060-1067
- Lim YS, Cha MK, Kim HK, Uhm TB, Park JW, Kim K, Kim IH** (1993) Removals of hydrogen peroxide and hydroxyl radical by thiol-specific antioxidant protein as a possible role in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* **192**: 273-280

- Lu G-H, Tang J-H, Yan F-B, Ma X-Q, Li J-S, Chen S-J, Ma J-C, Liu Z-X, E L-Z, Zhang Y-R, Dai J-R** (2006) Quantitative trait loci mapping of maize yield and its components under different water treatments at flowering time. *Journal of Integrative Plant biology* **48**: 1233-1243
- Luan S, Lan W, Chul Lee S** (2009) Potassium nutrition, sodium toxicity, and calcium signaling: connections through the CBL-CIPK network. *Curr Opin Plant Biol* **12**: 339-346
- Majeran W, Friso G, Ponnala L, Connolly B, Huang M, Reidel E, Zhang C, Asakura Y, Bhuiyan NH, Sun Q, Turgeon R, van Wijk KJ** (2010) Structural and metabolic transitions of C4 leaf development and differentiation defined by microscopy and quantitative proteomics in maize. *Plant Cell* **22**: 3509-3542
- Mangelsdorf PC, Reeves RG** (1939) The origin of Indian corn and its relatives. *Texas Agric. Exp. Sta. Bull.* **574**: 1-315
- Marcotte WR, Jr., Russell SH, Quatrano RS** (1989) Abscisic acid-responsive sequences from the em gene of wheat. *Plant Cell* **1**: 969-976
- Maskin L, Frankel N, Gudesblat G, Demergasso MJ, Pietrasanta LI, Iusem ND** (2007) Dimerization and DNA-binding of ASR1, a small hydrophilic protein abundant in plant tissues suffering from water loss. *Biochem Biophys Res Commun* **352**: 831-835
- Maurel C, Verdoucq L, Luu DT, Santoni V** (2008) Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions. *Annu Rev Plant Biol* **59**: 595-624
- Meyer RC, Steinfath M, Lisec J, Becher M, Witucka-Wall H, Torjek O, Fiehn O, Eckardt A, Willmitzer L, Selbig J, Altmann T** (2007) The metabolic signature related to high plant growth rate in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 4759-4764
- 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*. *Plant J* **15**: 563-568
- Monroe-Augustus M, Zolman BK, Bartel B** (2003) IBR5, a dual-specificity phosphatase-like protein modulating auxin and abscisic acid responsiveness in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **15**: 2979-2991
- Montrichard F, Alkhalfioui F, Yano H, Vensel WH, Hurkman WJ, Buchanan BB** (2009) Thioredoxin targets in plants: the first 30 years. *J Proteomics* **72**: 452-474

- Mou Z, He Y, Dai Y, Liu X, Li J** (2000) Deficiency in fatty acid synthase leads to premature cell death and dramatic alterations in plant morphology. *Plant Cell* **12**: 405-418
- Mundy J, Yamaguchi-Shinozaki K, Chua NH** (1990) Nuclear proteins bind conserved elements in the abscisic acid-responsive promoter of a rice rab gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 1406-1410
- Munnik T, Irvine RF, Musgrave A** (1998) Phospholipid signalling in plants. *Biochim Biophys Acta* **1389**: 222-272
- Munnik T, Vermeer JE** (2010) Osmotic stress-induced phosphoinositide and inositol phosphate signalling in plants. *Plant Cell Environ* **33**: 655-669
- Murat F, Xu JH, Tannier E, Abrouk M, Guilhot N, Pont C, Messing J, Salse J** (2010) Ancestral grass karyotype reconstruction unravels new mechanisms of genome shuffling as a source of plant evolution. *Genome Res* **20**: 1545-1557
- Nakashima K, Fujita Y, Katsura K, Maruyama K, Narusaka Y, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2006) Transcriptional regulation of ABI3- and ABA-responsive genes including RD29B and RD29A in seeds, germinating embryos, and seedlings of *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* **60**: 51-68
- 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*. *Plant J* **12**: 851-861
- Naqvi S, Ramessar K, Farre G, Sabalza M, Miralpeix B, Twyman RM, Capell T, Zhu C, Christou P** (2010) High-value products from transgenic maize. *Biotechnol Adv* **29**: 40-53
- Nelson DE, Repetti PP, Adams TR, Creelman RA, Wu J, Warner DC, Anstrom DC, Bensen RJ, Castiglioni PP, Donnarummo MG, Hinchey BS, Kumimoto RW, Maszle DR, Canales RD, Krolkowski KA, Dotson SB, Gutterson N, Ratcliffe OJ, Heard JE** (2007) Plant nuclear factor Y (NF-Y) B subunits confer drought tolerance and lead to improved corn yields on water-limited acres. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 16450-16455
- Pata MO, Hannun YA, Ng CK** (2010) Plant sphingolipids: decoding the enigma of the Sphinx. *New Phytol* **185**: 611-630
- Pelloux J, Rusterucci C, Mellerowicz EJ** (2007) New insights into pectin methylesterase structure and function. *Trends Plant Sci* **12**: 267-277



- Philippe R** (2009) Diversité et évolution des Asr, gènes candidats pour la tolérance à la sécheresse, chez le riz (*Oryza sativa*) et le sorgho (*Sorghum bicolor* ssp. *bicolor*). Université Montpellier II, Montpellier
- Philippe R, Courtois B, McNally KL, Mournet P, El-Malki R, Le Paslier MC, Fabre D, Billot C, Brunel D, Glaszmann JC, This D** (2010) Structure, allelic diversity and selection of Asr genes, candidate for drought tolerance, in *Oryza sativa* L. and wild relatives. *Theor Appl Genet* **121**: 769-787
- Pollard M, Beisson F, Li Y, Ohlrogge JB** (2008) Building lipid barriers: biosynthesis of cutin and suberin. *Trends Plant Sci* **13**: 236-246
- Quettier AL, Bertrand C, Habricot Y, Miginiac E, Agnes C, Jeannette E, Maldiney R** (2006) The *phs1-3* mutation in a putative dual-specificity protein tyrosine phosphatase gene provokes hypersensitive responses to abscisic acid in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **47**: 711-719
- Rabbani MA, Maruyama K, Abe H, Khan MA, Katsura K, Ito Y, Yoshiwara K, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2003) Monitoring expression profiles of rice genes under cold, drought, and high-salinity stresses and abscisic acid application using cDNA microarray and RNA gel-blot analyses. *Plant Physiol* **133**: 1755-1767
- Raffaele S, Bayer E, Lafarge D, Cluzet S, German Retana S, Boubekour T, Leborgne-Castel N, Carde JP, Lherminier J, Noirot E, Satiat-Jeunemaitre B, Laroche-Traineau J, Moreau P, Ott T, Maule AJ, Reymond P, Simon-Plas F, Farmer EE, Bessoule JJ, Mongrand S** (2009) Remorin, a solanaceae protein resident in membrane rafts and plasmodesmata, impairs potato virus X movement. *Plant Cell* **21**: 1541-1555
- Raffaele S, Mongrand S, Gamas P, Niebel A, Ott T** (2007) Genome-wide annotation of remorins, a plant-specific protein family: evolutionary and functional perspectives. *Plant Physiol* **145**: 593-600
- Raffaele S, Vaillau F, Leger A, Joubes J, Miersch O, Huard C, Blee E, Mongrand S, Domergue F, Roby D** (2008) A MYB transcription factor regulates very-long-chain fatty acid biosynthesis for activation of the hypersensitive cell death response in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **20**: 752-767
- Ray S, Dansana PK, Giri J, Deveshwar P, Arora R, Agarwal P, Khurana JP, Kapoor S, Tyagi AK** (2011) Modulation of transcription factor and metabolic pathway genes in response to water-deficit stress in rice. *Funct Integr Genomics* **11**: 157-178

- Raymond Park J, McFarlane I, Hartley Phipps R, Ceddia G** (2010) The role of transgenic crops in sustainable development. *Plant Biotechnol J* **9**: 2-21
- Reiser V, Raitt DC, Saito H** (2003) Yeast osmosensor Sln1 and plant cytokinin receptor Cre1 respond to changes in turgor pressure. *J Cell Biol* **161**: 1035-1040
- Reymond M, Muller B, Leonardi A, Charcosset A, Tardieu F** (2003) Combining quantitative trait Loci analysis and an ecophysiological model to analyze the genetic variability of the responses of maize leaf growth to temperature and water deficit. *Plant Physiol* **131**: 664-675
- Ribaut JM, Banziger M, Betran J, Jiang C, Edmeades GO, Dreher K, Hoisington D** (2002) Use of molecular markers in plant breeding: Drought tolerance improvement in tropical maize. *In* MS Kang, ed, *Quantitative genetics, genomics, and plant breeding*. CABI Pub, New York, pp 85-99
- Ribaut JM, Hoisington D, Deutsch J, Jiang C, Gaonzalez-de-Leon D** (1996) Identification of quantitative trait loci under drought conditions in tropical maize. 1. Flowering parameters and the anthesis.silking interval. *Theor Appl Genet* **92**: 905-914
- Ribaut JM, Jiang C, Gonzalez JM, Edmeades GO, Hoisington D** (1997) Identification of quantitative trait loci under drought conditions in tropical maize; 2. Yield components and marker-assisted selection strategies. *Theor Appl Genet* **94**: 887-896
- Riccardi F, Gazeau P, de Vienne D, Zivy M** (1998) Protein changes in response to progressive water deficit in maize . Quantitative variation and polypeptide identification. *Plant Physiol* **117**: 1253-1263
- Riccardi F, Gazeau P, Jacquemot MP, Vincent D, Zivy M** (2004) Deciphering genetic variations of proteome responses to water deficit in maize leaves. *Plant Physiol Biochem* **42**: 1003-1011
- Ricroch AE, Berge JB, Kuntz M** (2011) Evaluation of genetically engineered crops using transcriptomic, proteomic and metabolomic profiling techniques. *Plant Physiol* **155**: 1752-1761
- Rivero RM, Kojima M, Gepstein A, Sakakibara H, Mittler R, Gepstein S, Blumwald E** (2007) Delayed leaf senescence induces extreme drought tolerance in a flowering plant. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 19631-19636
- Rockman MV, Kruglyak L** (2006) Genetics of global gene expression. *Nat Rev Genet* **7**: 862-872

- Rodriguez J, Calvo F, Gonzalez JM, Casar B, Andres V, Crespo P** (2010) ERK1/2 MAP kinases promote cell cycle entry by rapid, kinase-independent disruption of retinoblastoma-lamin A complexes. *J Cell Biol* **191**: 967-979
- Rom S, Gilad A, Kalifa Y, Konrad Z, Karpasas MM, Goldgur Y, Bar-Zvi D** (2006) Mapping the DNA- and zinc-binding domains of ASR1 (abscisic acid stress ripening), an abiotic-stress regulated plant specific protein. *Biochimie* **88**: 621-628
- Sadok W, Naudin P, Boussuge B, Muller B, Welcker C, Tardieu F** (2007) Leaf growth rate per unit thermal time follows QTL-dependent daily patterns in hundreds of maize lines under naturally fluctuating conditions. *Plant Cell Environ* **30**: 135-146
- Salekdeh GH, Siopongco J, Wade LJ, Ghareyazie B, Bennett J** (2002) Proteomic analysis of rice leaves during drought stress and recovery. *Proteomics* **2**: 1131-1145
- Salvi S, Tuberosa R** (2005) To clone or not to clone plant QTLs: present and future challenges. *Trends Plant Sci* **10**: 297-304
- Schulze WX** (2010) Proteomics approaches to understand protein phosphorylation in pathway modulation. *Curr Opin Plant Biol* **13**: 280-287
- Schurmann P, Buchanan BB** (2008) The ferredoxin/thioredoxin system of oxygenic photosynthesis. *Antioxid Redox Signal* **10**: 1235-1274
- Seki M, Narusaka M, Ishida J, Nanjo T, Fujita M, Oono Y, Kamiya A, Nakajima M, Enju A, Sakurai T, Satou M, Akiyama K, Taji T, Yamaguchi-Shinozaki K, Carninci P, Kawai J, Hayashizaki Y, Shinozaki K** (2002) Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *Plant J* **31**: 279-292
- Sharp RE, Poroyko V, Hejlek LG, Spollen WG, Springer GK, Bohnert HJ, Nguyen HT** (2004) Root growth maintenance during water deficits: physiology to functional genomics. *J Exp Bot* **55**: 2343-2351
- Shen G, Pang Y, Wu W, Deng Z, Liu X, Lin J, Zhao L, Sun X, Tang K** (2005) Molecular cloning, characterization and expression of a novel Asr gene from *Ginkgo biloba*. *Plant Physiol Biochem* **43**: 836-843
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2007) Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *J Exp Bot* **58**: 221-227
- Shkolnik D, Bar-Zvi D** (2008) Tomato ASR1 abrogates the response to abscisic acid and glucose in Arabidopsis by competing with ABI4 for DNA binding. *Plant Biotechnol J* **6**: 368-378
- Sirichandra C, Davanture M, Turk BE, Zivy M, Valot B, Leung J, Merlot S** (2010) The Arabidopsis ABA-activated kinase OST1 phosphorylates the bZIP

- transcription factor ABF3 and creates a 14-3-3 binding site involved in its turnover. *PLoS One* **5**: e13935
- Staswick PE** (2008) JAZing up jasmonate signaling. *Trends Plant Sci* **13**: 66-71
- Sugiharto B, Ermawati N, Mori H, Aoki K, Yonekura-Sakakibara K, Yamaya T, Sugiyama T, Sakakibara H** (2002) Identification and characterization of a gene encoding drought-inducible protein localizing in the bundle sheath cell of sugarcane. *Plant Cell Physiol* **43**: 350-354
- Sulpice R, Pyl ET, Ishihara H, Trenkamp S, Steinfath M, Witucka-Wall H, Gibon Y, Usadel B, Poree F, Piques MC, Von Korff M, Steinhauser MC, Keurentjes JJ, Guenther M, Hoehne M, Selbig J, Fernie AR, Altmann T, Stitt M** (2009) Starch as a major integrator in the regulation of plant growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 10348-10353
- Takasaki H, Mahmood T, Matsuoka M, Matsumoto H, Komatsu S** (2008) Identification and characterization of a gibberellin-regulated protein, which is ASR5, in the basal region of rice leaf sheaths. *Mol Genet Genomics* **279**: 359-370
- Tardieu F, Cruiziat P, Durand JL, Triboï E, Zivy M** (2007) ESCo « sécheresse et agriculture ». *In* Rapport d'expertise réalisé par l'INRA à la demande du Ministère de l'Agriculture et de la Pêche, pp 242-257
- Tuberosa R, Salvi S** (2006) Genomics-based approaches to improve drought tolerance of crops. *Trends Plant Sci* **11**: 405-412
- Tunnacliffe A, Wise MJ** (2007) The continuing conundrum of the LEA proteins. *Naturwissenschaften* **94**: 791-812
- Urao T, Yakubov B, Satoh R, Yamaguchi-Shinozaki K, Seki M, Hirayama T, Shinozaki K** (1999) A transmembrane hybrid-type histidine kinase in Arabidopsis functions as an osmosensor. *Plant Cell* **11**: 1743-1754
- Urtasun N, Correa Garcia S, Iusem ND, Bermudez Moretti M** (2010) Predominantly Cytoplasmic Localization in Yeast of ASR1, a Non-Receptor Transcription Factor from Plants. *Open Biochem J* **4**: 68-71
- Vaidyanathan R, Kuruvilla S, Thomas G** (1999) Characterization and expression pattern of an abscisic acid and osmotic stress responsive gene from rice. *Plant Science* **140**: 21-30
- Valliyodan B, Nguyen HT** (2006) Understanding regulatory networks and engineering for enhanced drought tolerance in plants. *Curr Opin Plant Biol* **9**: 189-195
- Vlad F, Droillard MJ, Valot B, Khafif M, Rodrigues A, Brault M, Zivy M, Rodriguez PL, Merlot S, Lauriere C** (2010) Phospho-site mapping, genetic and in planta

- activation studies reveal key aspects of the different phosphorylation mechanisms involved in activation of SnRK2s. *Plant J* **63**: 778-790
- Voltas J, Lopez-Corcoles H, Borrás G** (2005) Use of biplot analysis and factorial regression for the investigation of superior genotypes in multi-environment trials. *Eur. J. Agron* **22**: 309-324
- von Caemmerer S, Furbank R** (2003) The C<sub>4</sub> pathway: an efficient CO<sub>2</sub> pump. *Photosynthesis research* **77**: 191-207
- Wang H-J, Hsu C-M, Jauh GY, Wang CS** (2005) A lily pollen ASR protein localizes to both cytoplasm and nuclei requiring a nuclear localization signal. *Physiologia plantarum* **123**: 314-320
- Wang W, Vinocur B, Altman A** (2003) Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* **218**: 1-14
- Wang W, Vinocur B, Shoseyov O, Altman A** (2004) Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends Plant Sci* **9**: 244-252
- Wasilewska A, Vlad F, Sirichandra C, Redko Y, Jammes F, Valon C, Frei dit Frey N, Leung J** (2008) An update on abscisic acid signaling in plants and more. *Mol Plant* **1**: 198-217
- Wasternack C** (2007) Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Ann Bot* **100**: 681-697
- Weber AP, von Caemmerer S** (2010) Plastid transport and metabolism of C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> plants--comparative analysis and possible biotechnological exploitation. *Curr Opin Plant Biol* **13**: 257-265
- Wei A, He C, Li B, Li N, Zhang J** (2011) The pyramid of transgenes TsVP and BetaA effectively enhances the drought tolerance of maize plants. *Plant Biotechnol J* **9**: 216-219
- Welcker C, Boussuge B, Bencivenni C, Ribaut JM, Tardieu F** (2007) Are source and sink strengths genetically linked in maize plants subjected to water deficit? A QTL study of the responses of leaf growth and of Anthesis-Silking Interval to water deficit. *J Exp Bot* **58**: 339-349
- Werner JD, Borevitz JO, Warthmann N, Trainer GT, Ecker JR, Chory J, Weigel D** (2005) Quantitative trait locus mapping and DNA array hybridization identify an FLM deletion as a cause for natural flowering-time variation. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 2460-2465

- Wessel D, Flugge UI** (1984) A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem* **138**: 141-143
- Westgate ME, Steudle E** (1985) Water transport in the midrib tissue of maize leaves : direct measurement of the propagation of changes in cell turgor across a plant tissue. *Plant Physiol* **78**: 183-191
- 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. *Plant Cell* **20**: 1101-1117
- Xiong J, Verkhratsky A, Toescu EC** (2002) Changes in mitochondrial status associated with altered Ca<sup>2+</sup> homeostasis in aged cerebellar granule neurons in brain slices. *J Neurosci* **22**: 10761-10771
- Xiong L, Lee B, Ishitani M, Lee H, Zhang C, Zhu JK** (2001) FIERY1 encoding an inositol polyphosphate 1-phosphatase is a negative regulator of abscisic acid and stress signaling in Arabidopsis. *Genes Dev* **15**: 1971-1984
- Xiong L, Schumaker KS, Zhu JK** (2002) Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *Plant Cell* **14 Suppl**: S165-183
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (1992) A novel Arabidopsis DNA binding protein contains the conserved motif of HMG-box proteins. *Nucleic Acids Res* **20**: 6737
- Yang CY, Chen YC, Jauh GY, Wang CS** (2005) A Lily ASR protein involves abscisic acid signaling and confers drought and salt resistance in Arabidopsis. *Plant Physiol* **139**: 836-846
- Yang CY, Wu CH, Jauh GY, Huang JC, Lin CC, Wang CS** (2008) The LLA23 protein translocates into nuclei shortly before desiccation in developing pollen grains and regulates gene expression in Arabidopsis. *Protoplasma* **233**: 241-254
- Zhang J, Nguyen HT, Blum A** (1999) Genetic analysis of osmotic adjustment in crop plants. *J Exp Bot* **50**: 291-302
- Zhang T, Liu Y, Yang T, Zhang L, Xu S, Xue L, An L** (2006) Diverse signals converge at MAPK cascades in plant. *Plant Physiol Biochem* **44**: 274-283
- Zheng Z, Xu X, Crosley RA, Greenwalt SA, Sun Y, Blakeslee B, Wang L, Ni W, Sopko MS, Yao C, Yau K, Burton S, Zhuang M, McCaskill DG, Gachotte D, Thompson M, Greene TW** (2010) The protein kinase SnRK2.6 mediates the regulation of sucrose metabolism and plant growth in Arabidopsis. *Plant Physiol* **153**: 99-113

- Zhu L, Kreth J, Cross SE, Gimzewski JK, Shi W, Qi F** (2006) Functional characterization of cell-wall-associated protein WapA in *Streptococcus mutans*. *Microbiology* **152**: 2395-2404
- Zinselmeier C, Lauer MJ, Boyer JS** (1995) Reversing drought induced losses in grain yield : sucrose maintains embryo growth. *crop sciences* **35**: 1390-1400

## **ANNEXES**



## **ANNEXE 1**

### **BREVET D'INVENTION**

**Obtention de plantes ayant une tolérance améliorée à un déficit hydrique grâce a un facteur de transcription R2R3-MYB de la sous-famille 4**



26bis, rue de Saint-Petersbourg - 75800 PARIS Cedex 08  
 Pour vous informer : INPI Direct 0 820 210 211  
 Pour déposer par télécopie : 33 (0)1 53 04 52 65

**BREVET D'INVENTION  
 CERTIFICAT D'UTILITÉ**  
 Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



**REQUÊTE EN DÉLIVRANCE**  
 page 1/2





Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire DB 540 W - 12 08

15/10/2010 REMISE DES PIÈCES DATE INPI - Paris SP34 Réservé à l'INPI		<b>1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE          À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE</b>	
LIEU <b>10/04059</b> N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI		CABINET ORÈS 36 rue de Saint Pétersbourg 75008 PARIS	
<b>Vos références pour ce dossier</b> (facultatif) XRN-1516-38FR			
<b>Confirmation d'un dépôt par télécopie</b>		<input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie	
<b>2 NATURE DE LA DEMANDE</b>		<b>Cochez l'une des 4 cases suivantes</b>	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
<i>Demande de brevet initiale</i>		N°	Date
<i>ou demande de certificat d'utilité initiale</i>		N°	Date
Transformation d'une demande de brevet européen <i>Demande de brevet initiale</i>		<input type="checkbox"/> N°	Date
<b>3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)</b> Obtention de plantes ayant une tolérance améliorée à un déficit hydrique.			
<b>4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ          OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE          LA DATE DE DÉPÔT D'UNE          DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE</b>		Pays ou organisation Date _____ N° Pays ou organisation Date _____ N° Pays ou organisation Date _____ N° <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
<b>5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)</b>		<input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique	
Nom ou dénomination sociale		GENOPLANTE-VALOR	
Prénoms			
Forme juridique			
N° SIREN		_____	
Code APE-NAF		_____	
Domicile ou siège	Rue	28 rue du Docteur Finlay	
	Code postal et ville	7 5   0   1   5   PARIS	
	Pays	France	
Nationalité		Française	
N° de téléphone (facultatif)		N° de télécopie (facultatif)	
Adresse électronique (facultatif)			
<input type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»			

Remplir impérativement la 2<sup>ème</sup> page

**BREVET D'INVENTION  
 CERTIFICAT D'UTILITÉ**
**REQUÊTE EN DÉLIVRANCE**  
 page 2/2

**BR2**

15/10/2010		Réservé à l'INPI	
REMISE DES PIÈCES			
DATE		INPI - Paris SP34	
LIEU		10/04059	
N° D'ENREGISTREMENT			
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		DB 540 W - 12 08	
<b>6 MANDATAIRE (s'il y a lieu)</b>			
Nom		RANÇON	
Prénom		Xavier	
Cabinet ou Société		CABINET ORÈS	
Nationalité			
N °de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel			
Adresse	Rue	36 rue de Saint Pétersbourg	
	Code postal et ville	75 008 PARIS	
	Pays		
N° de téléphone (facultatif)			
N° de télécopie (facultatif)			
Adresse électronique (facultatif)			
<b>7 INVENTEUR (S)</b>			
		Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques	
Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : <b>Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)</b>	
<b>8 BÉNÉFICIAIRE DE LA RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b>			
		<input type="checkbox"/> Personne(s) physique(s) <input checked="" type="checkbox"/> PME jusqu'à 1000 salariés ( <b>attestation à fournir dans le mois du dépôt</b> ) <input type="checkbox"/> Organisme à but non lucratif dans le domaine de l'enseignement ou de la recherche ( <b>attestation à fournir dans le mois du dépôt</b> )	
<b>9 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS</b>			
		<input checked="" type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences	
Le support électronique de données est joint		<input checked="" type="checkbox"/>	
La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe		<input checked="" type="checkbox"/>	
<b>Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes</b>			
<b>10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)</b>		Xavier RANÇON CPI n° 10-0921	<b>VISA DE L'INPI</b>
			

Conformément aux dispositions de la loi n° 78-17 du 6.01.1978 modifiée relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés, vous bénéficiez d'un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI. Les données à caractère personnel que vous êtes tenu(e) de nous fournir dans ce formulaire sont exclusivement utilisées pour identifier le titulaire de la demande et son éventuel mandataire.

---

**OBTENTION DE PLANTES AYANT UNE TOLERANCE AMELIOREE A UN DEFICIT  
HYDRIQUE**

La présente invention concerne un procédé d'obtention de plantes tolérantes à un déficit hydrique.

Le « déficit hydrique » correspond à une situation où la quantité d'eau transpirée par une plante est supérieure à la quantité d'eau absorbée par ladite plante.

Le déficit hydrique est l'un des stress abiotiques les plus importants pour les plantes. Il peut affecter leur croissance et leur reproduction, conduisant ainsi à une perte de rendement.

Par conséquent, il est important d'identifier des gènes qui possèdent la capacité d'améliorer la tolérance des plantes au déficit hydrique.

La famille des facteurs de transcription R2R3-MYB (« *myeoblastosis oncogene* ») compte 126 membres chez *Arabidopsis thaliana* (STRACKE *et al.*, Curr. Opin. Plant Biol., 4:447-546, 2001), 84 membres chez le riz (JIANG *et al.*, Genome Bio., 5:R46, 2004) et 192 membres chez le peuplier (WILKINS *et al.*, Plant Physiol., 149:981-993, 2009). Cette famille est caractérisée par la présence des motifs R2 (de séquence X<sub>5</sub>WX<sub>19</sub>WX<sub>19</sub>WX<sub>7</sub>, SEQ ID NO : 2) et R3 (de séquence X<sub>24</sub>WX<sub>18</sub>WX<sub>7</sub>, SEQ ID NO : 3) de liaison à l'ADN qui régulent de nombreux processus physiologiques, dont le contrôle du cycle cellulaire (STRACKE *et al.*, 2001, cité ci-dessus, FORNALE *et al.*, Plant Mol. Biol., 62:809-823, 2006). L'alignement des séquences peptidiques déduites des séquences nucléotidiques codant ces facteurs de transcription a permis de les classer en différentes sous-familles (STRACKE *et al.*, 2001, cité ci-dessus). Les membres d'une même sous-famille - qui possèdent des sites similaires de liaison à l'ADN et d'interaction protéine-protéine - partagent en partie des fonctions biologiques communes.

Les facteurs de transcription R2R3-MYB de la sous-famille 4 (FORNALE *et al.*, 2006, cité ci-dessus) sont généralement impliqués dans le métabolisme des phénylpropanoïdes et la biosynthèse de la lignine (JIN *et al.*, EMBO J., 19:6150-6561, 2000). Ces facteurs de transcription possèdent, outre les deux motifs peptidiques R2 et R3, le motif peptidique de séquence LNL[D/E]L ; SEQ ID NO : 4) dans la partie C-terminale de la protéine (STRACKE *et al.*, 2001, cité ci-dessus).

Les facteurs de transcription R2R3-MYB de la sous-famille 4 sont bien connus de l'homme du métier. A titre d'exemple de facteurs de transcription R2R3-MYB de la sous-famille 4, on peut citer ceux identifiés par FORNALE *et al.*, 2006 et WILKINS *et al.*, 2009 (cités ci-dessus) et décrit dans le Tableau I ci-après :

<b>Espèce</b>	<b>Nom de la protéine</b>	<b>Numéro d'accension dans les bases de données GENBANK ou UniProtKB</b>	<b>Référence : (a) : FORNALE <i>et al.</i>, 2006 (b) : WILKINS <i>et al.</i>, 2009</b>
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtMYB7 AtMYB32 AtMYB4 AtY49 AtMYB3 AtMYB8 AtMYB6 AtCAB78069	U26937 NM_119665 AY519615 CAA62033 AF062859 NP849749 AL161515 CAB78069	(a) et (b)
<i>Populus trichocarpa</i>	PtrMYB156 PtrMYB221		(b)
<i>Populus tremula x Populus tremuloides</i>	PttMYB	CAD98762	(a)
<i>Vitis vinifera</i>	Vv3g1569838 Vv4g15106462		(b)
<i>Zea mays</i>	ZmMYB38 ZmMYB31 ZmMYB42 ZmMYB8		(a) et (b)
<i>Solanum lycopersicum</i>	SlMYB27 (ou LeMYB27)	CAA64614	(a) et (b)
<i>Eucalyptus gunii</i>	EgMYB1	CAE09058	(a) et (b)
<i>Picea glauca</i>	PgMYB5 PgMYB10 PgMYB13 PtMYB14		(b)
<i>Tradescantia fluminensis</i>	TfMYB2 TfMYB6 TfMYB1	AAS19476 AAS19480 AAS19475	(a)
<i>Oryza sativa</i>	OsNP91576 OsT02984	NP_91576 T02984	(a)

	OsAAV59423 OsPTYPE2 OsPTYPE1	AAV59423 XP_483665 AAL84628	
<i>Hordeum vulgare</i>	HvMYB5 HvMYB1	CAA50221 CAA50224	(a) et (b)
<i>Triticum aestivum</i>	TaMYB1	AAT37167	(a)
<i>Dendrobium sp.</i>	DspMYB8 DspMYB10	AAO49417 AAO49419	(a)
<i>Gossypium hirsutum</i>	GhMYB9 GhMYB1	AAK19619 AAN28270	(a)
<i>Antirrhinum majus</i>	AmMYB308 AmMYB330	JQ0960 JQ0957	(a)

Des plantes de tabac transformées avec la séquence codante des gènes d'*Antirrhinum majus* *AmMYB308* et *AmMYB30* présentent un phénotype de réduction de la taille et de la longévité des feuilles exposées à la lumière dont la sévérité est corrélée au niveau d'expression du facteur de transcription (TAMAGNONE *et al.*, Plant Cell, 10:135-154, 1998). Le gène *AtMYB4*, qui appartient également à la sous-famille 4, réprime lui aussi la voie des phénylpropanoïdes en inhibant notamment l'expression des gènes *AtC4H* (« trans-cinnamate 4-hydroxylase ») et *At4CL1* (« 4-coumarate:coenzyme A ligase 1 »), ce qui conduit à la synthèse du sinapoyl malate qui protège les feuilles contre les dommages occasionnés par les ultraviolets (JIN *et al.*, 2000, cité ci-dessus). Enfin, la sur-expression de la séquence codante du gène *ZmMYB31* chez *Arabidopsis thaliana* conduit à nouveau à une répression des gènes *At4CL1*, *AtCOMT* (« caffeic acid O-methyltransferase ») et *ZmCOMT*, une légère stimulation du gène *AtCAD6* (« cinnamyl alcohol dehydrogenase 6 » ; correspond à *AtCAD5* de TAIR) et une réduction de la teneur en lignine (FORNALE *et al.*, 2006, cité ci-dessus).

La Demande Internationale WO 01/32002 décrit une méthode pour augmenter la tolérance d'une plante à un stress abiotique (par exemple sécheresse, température, salinité), comprenant la modification du génome de ladite plante pour surexprimer dans ladite plante un facteur de transcription MYB choisi parmi les facteurs de transcription MYB60 (appartenant à la sous-famille 1 selon la définition des sous-famille donnée par STRACKE *et al.*, 2001, cité ci-dessus), MYB74 (appartenant à la

sous-famille 11), MYB75 (appartenant à la sous-famille 6) et MYB90 (appartenant aussi à la sous-famille 6) d'*A. thaliana*.

Au cours de leurs travaux, les inventeurs ont mis en évidence que des plantes de maïs (*Zea mays*) transgéniques surexprimant le facteur de transcription ZmMYB31 présentaient une tolérance augmentée à un déficit hydrique par rapport aux plantes de maïs sauvages (non transgéniques). Le facteur de transcription ZmMYB31 de maïs (disponible dans la base de données GENBANK sous le numéro d'accèsion GI:89143144 ; référencée également sur la puce du Maize Oligonucleotide Array Project [<http://www.maizearray.org>] sous le numéro MZ00022562) appartient à la sous-famille 4 des facteurs de transcription R2R3-MYB. Il est également représenté par la séquence SEQ ID NO : 1.

Les inventeurs ont identifié des paralogues du facteur de transcription ZmMYB31 et des orthologues chez *Hordeum vulgare*, *Oryza sativa* et *Triticum aestivum*. Ces paralogues et orthologues possèdent les motifs R2, R3 et LNL[E/D]L définis ci-dessus et présentent au moins 70% d'identité avec la séquence du facteur de transcription ZmMYB31 (SEQ ID NO: 1).

Les inventeurs ont aussi montré que la séquence peptidique des paralogues et des orthologues chez les plantes monocotylédones *H. vulgare*, *O. sativa* et *T. aestivum*, du facteur de transcription ZmMYB31 comprend les acides aminés conservés situés aux positions 1-9, 11-13, 15-22, 24-25, 27, 30-41, 43-70, 74-75, 77-78, 80-83, 85-93, 95-111, 113-116, 120-127, 138, 140-141, 197, 202-212, 214, 234, 239, 242, 252, 254-255, 261-263, 267-271 et 274-275 de ladite séquence peptidique de ZmMYB31 (SEQ ID NO : 1) lorsqu'elle est alignée avec celle-ci (voir Figure 1).

Sauf précision contraire, l'alignement entre deux séquences peptidiques et le calcul des pourcentages d'identité sont effectués sur toute la longueur des séquences peptidiques à l'aide du programme d'ordinateur « *needle* » (NEEDLEMAN et WUNSCH, J. Mol. Biol., 48, 443-453, 1970) en utilisant les paramètres par défaut : « *Matrix* » : EBLOSUM62, « *Gap penalty* » : 10,0 et « *Extend penalty* » : 0,5.

La présente invention propose en conséquence d'utiliser la protéine ZmMY31 ou un paragologue ou orthologue de celle-ci pour augmenter la résistance des plantes au déficit hydrique.

La présente invention a pour objet un procédé pour augmenter la tolérance d'une plante au déficit hydrique, caractérisé en ce que l'on surexprime dans ladite plante un facteur de transcription R2R3-MYB de la sous-famille 4, possédant au moins 70% d'identité, et par ordre de préférence croissant au moins 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% et 99% d'identité, avec la séquence SEQ ID NO: 1.

On entend par un facteur de transcription R2R3-MYB de la sous-famille 4, un facteur de transcription R2R3-MYB tel que décrit par STRACKE et al., 2001 (cité ci-dessus), possédant les motifs conservés R2 (de séquence X<sub>5</sub>WX<sub>19</sub>WX<sub>19</sub>WX<sub>7</sub>, SEQ ID NO : 2) et R3 (de séquence X<sub>24</sub>WX<sub>18</sub>WX<sub>7</sub>, SEQ ID NO : 3) de liaison à l'ADN, et le motif conservé LNL[E/D]L (SEQ ID NO : 4).

Selon un mode de réalisation avantageux de la présente invention, ledit facteur de transcription R2R3-MYB de la sous-famille 4 est issu d'une plante monocotylédone et comprend les acides aminés conservés situés aux positions 1-9, 11-13, 15-22, 24-25, 27, 30-41, 43-70, 74-75, 77-78, 80-83, 85-93, 95-111, 113-116, 120-127, 138, 140-141, 197, 202-212, 214, 234, 239, 242, 252, 254-255, 261-263, 267-271 et 274-275 de ladite séquence SEQ ID NO : 1 lorsqu'il est aligné avec ladite séquence SEQ ID NO : 1.

On entend par un facteur de transcription R2R3-MYB de la sous-famille 4 issu d'une plante monocotylédone, un facteur de transcription R2R3-MYB de la sous-famille 4 exprimée par une plante monocotylédone ou un facteur de transcription R2R3-MYB de la sous-famille 4 synthétique obtenu par mutation d'un facteur de transcription R2R3-MYB de la sous-famille 4 exprimé par une plante monocotylédone.

Selon un mode de réalisation préféré de la présente invention, ledit facteur de transcription R2R3-MYB de la sous-famille 4 est choisi dans le groupe constitué par les séquences d'acides aminés suivantes :

- SEQ ID NO : 1 (ZmMYB31),
- SEQ ID NO : 5 (facteur de transcription R2R3-MYB de la sous-famille 4 d'*Hordeum vulgare*, dénommé HvMYB1),
- SEQ ID NO : 6 (facteur de transcription R2R3-MYB de la sous-famille 4 d'*Oryza sativa*, dénommé Os09g36730),
- SEQ ID NO : 7 (facteur de transcription R2R3-MYB de la sous-famille 4 d'*Oryza sativa*, dénommé OsPTYPE),



- SEQ ID NO : 8 (facteur de transcription R2R3-MYB de la sous-famille 4 de *Triticum aestivum*, dénommé TaMYB1),
- SEQ ID NO : 9 (facteur de transcription R2R3-MYB de la sous-famille 4 de *Zea mays*, dénommé ZmMYB42), et
- SEQ ID NO : 10 (facteur de transcription R2R3-MYB de la sous-famille 4 de *Zea mays*, dénommé ZmP20025),  
de préférence encore, SEQ ID NO : 1.

La présente invention s'applique à toutes les plantes monocotylédones ou dicotylédones, et notamment aux plantes sensibles au déficit hydrique. De manière non limitative, elle peut s'appliquer aux plantes potagères, aux plantes ornementales, aux arbres fruitiers, aux plantes de grandes cultures telles que le blé, le maïs ou le riz, ou aux plantes de cultures industrielles comme le cotonnier, le colza ou le tournesol, de préférence le maïs.

La surexpression (augmentation de l'expression) dans une plante d'un facteur de transcription R2R3-MYB de la sous-famille 4 tel que défini ci-dessus, peut être effectuée par la modification du génome de ladite plante. Cette modification du génome peut notamment s'effectuer par transformation génétique de ladite plante par une ou plusieurs copies d'un polynucléotide codant pour ledit facteur de transcription de la sous-famille 4, associé à des séquences de régulation en *cis* de son expression. La surexpression dudit facteur de transcription R2R3-MYB de la sous-famille 4 peut également être obtenue par modification des séquences de régulation en *cis* de l'expression dudit facteur de transcription R2R3-MYB de la sous-famille 4, par exemple en remplaçant son promoteur endogène par un promoteur plus fort, permettant un niveau de transcription plus élevé, ou bien en adjoignant au promoteur endogène des séquences activatrices de la transcription, de type « amplificateur », ou de la traduction.

Pour la mise en œuvre du procédé selon la présente invention, on utilise une cassette d'expression recombinante, comprenant un polynucléotide codant pour un facteur de transcription R2R3-MYB de la sous-famille 4 tel que défini ci-dessus, placé sous le contrôle transcriptionnel d'un promoteur approprié.

Ledit promoteur peut être un promoteur hétérologue. Dans ce cas, on peut utiliser par exemple :

- des promoteurs constitutifs, tels que le promoteur de la gluténine de haut poids moléculaire spécifique de l'endosperme (VERDAGUER *et al.*, *Plant Mol Biol.*, 31:1129-1139, 1996), le promoteur de l'ARN 35S (ODELL *et al.*, *Nature*, 313:810-812, 1985) ou 19S (KAY *et al.*, *Science*, 236:1299-1302, 1987) du CaMV, le promoteur de l'actine 1 du riz (McELROY *et al.*, *Plant Cell*, 2:163-171, 1990), le promoteur de l'ubiquitine 3 du riz ou du maïs (SIVAMANI *et al.*, *Plant Mol Biol.*, 60:225-239, 2006),

- des promoteurs spécifiques du phloème, tels que le promoteur du Wheat Dwarf Virus (DINANT *et al.*, *Physiologia plantarum* 121 : 108-116, 2004 ; Demande PCT WO 03/060135) ou le promoteur de *AtPP2-A1* (DINANT *et al.*, *Plant Physiol.*, 131 : 114-128, 2003),

- des promoteurs spécifiques des feuilles, tels que le promoteur de la petite sous-unité de la Rubisco, le promoteur de la phosphoénolpyruvate carboxylase,

- des promoteurs spécifiques des racines, tels que le promoteur RCc3 du riz (Demande Internationale WO 2009/016104), le promoteur antiquitine du riz (Demande Internationale WO 2007/076115), ou

- des promoteurs localement inductibles par le stress (sécheresse, salinité), tels que le promoteur rd29 d'*Arabidopsis* (YAMAGUCHI-SHINOZAKI *et al.*, *Mol. Gen. Genet.*, 236: 331-340, 1993),

de préférence le promoteur de la gluténine de haut poids moléculaire spécifique de l'endosperme.

On peut également utiliser le promoteur d'un facteur de transcription R2R3-MYB d'une autre sous-famille que la sous-famille 4.

Pour la mise en œuvre du procédé selon la présente invention, on peut aussi utiliser des vecteurs recombinants, résultant de l'insertion d'une cassette d'expression telle que décrite ci-dessus dans un vecteur hôte.

Les cassettes d'expression et vecteurs recombinants tels que décrits ci-dessus peuvent, bien entendu, comprendre en outre d'autres séquences, usuellement employées dans ce type de constructions. Le choix de ces autres séquences sera effectué, de manière classique, par l'homme du métier en fonction notamment de critères tels que les cellules-hôtes choisies, les protocoles de transformation envisagés, etc.

On citera, à titre d'exemples non limitatifs, les terminateurs de transcription, les séquences de tête (séquences « *leader* ») et les sites de polyadénylation. Ces séquences peuvent être celles qui sont naturellement associées au gène codant le facteur de transcription R2R3-MYB de la sous-famille 4 tel que défini ci-dessus, ou bien peuvent être des séquences hétérologues. Ces séquences n'interviennent pas sur les propriétés spécifiques du promoteur ou du gène auxquelles elles sont associées, mais peuvent améliorer globalement qualitativement ou quantitativement, la transcription, et le cas échéant, la traduction. A titre d'exemples de séquences de ce type fréquemment utilisées chez les plantes, on citera parmi les plus répandues, le terminateur de l'ARN 35S du CaMV et le terminateur du gène de la nopaline synthase. On peut également, dans le but d'augmenter le niveau d'expression, utiliser des séquences amplificatrices (séquences « *enhancer* » de transcription et de traduction).

Parmi les autres séquences couramment employées dans la construction de cassettes d'expression et vecteurs recombinants, on citera également les séquences permettant le suivi de la transformation, et l'identification et/ou la sélection des cellules ou organismes transformés. Il s'agit notamment de gènes rapporteurs, conférant aux cellules ou organismes transformés un phénotype aisément reconnaissable, ou bien de gènes marqueurs de sélection : seules les cellules ou organismes exprimant un gène marqueur de sélection déterminé, sont viables dans des conditions données (conditions sélectives). Des gènes rapporteurs fréquemment employés sont par exemple celui de la beta-glucuronidase (GUS), celui de la luciférase, ou celui de la « *green fluorescent protein* » (GFP). Des gènes marqueurs de sélection sont généralement des gènes de résistance à un antibiotique, ou également, dans le cas des plantes ou des cellules végétales, à un herbicide. Il existe une très grande variété de gènes marqueurs de sélection parmi lesquels l'homme du métier peut effectuer son choix en fonction des critères qu'il aura lui-même déterminés.

Pour la mise en œuvre du procédé selon la présente invention, on peut également utiliser des cellules-hôtes transformées par un polynucléotide codant pour un facteur de transcription R2R3-MYB de la sous-famille 4 tel que défini ci-dessus, ce qui inclut en particulier les cellules hôtes

transformées par une cassette d'expression ou un vecteur recombinants tels que décrits ci-dessus.

On entend par cellule ou organisme transformé par un polynucléotide, toute cellule ou organisme dont le contenu génétique a été modifié par transfert dudit polynucléotide dans ladite cellule ou ledit organisme, quelle que soit la méthode de transfert qui a été utilisée, et que l'information génétique apportée par ledit polynucléotide soit intégrée dans l'ADN chromosomique ou demeure extra-chromosomique.

Les cellules hôtes peuvent être des cellules procaryotes ou eucaryotes. Dans le cas de cellules procaryotes, il peut notamment s'agir d'Agrobactéries telles qu'*Agrobacterium tumefaciens* ou *Agrobacterium rhizobium*. Dans le cas de cellules eucaryotes, il peut s'agir notamment de cellules végétales, issues de plantes monocotylédones ou dicotylédones.

Les plantes transgéniques peuvent être obtenues par transformation génétique par au moins un polynucléotide, une cassette d'expression ou un vecteur recombinants tels que définis ci-dessus.

La présente invention englobe également une plante monocotylédone transgénique, de préférence une plante de maïs transgénique, comprenant au moins un transgène contenant une cassette d'expression recombinante comprenant un polynucléotide codant pour un facteur de transcription R2R3-MYB de la sous-famille 4 tels que défini ci-dessus.

On définit ici comme plante transgénique une plante transformée chez laquelle l'information génétique exogène apportée par un polynucléotide transformant est intégrée de manière stable dans l'ADN chromosomique, sous forme de transgène, et peut ainsi être transmise aux descendants de ladite plante. Cette définition englobe donc également les descendants des plantes résultant de la transgénèse initiale, dès lors qu'ils contiennent dans leur génome une copie du transgène.

Le matériel végétal (protoplastes, cals, boutures, graines, etc.) obtenu à partir des cellules transformées ou des plantes transgéniques fait également partie de l'objet de la présente invention. L'invention englobe également les produits obtenus à partir de ces plantes transgéniques, notamment le fourrage, le bois, les feuilles, les tiges, les racines, les fleurs et les fruits.

Différentes méthodes d'obtention de plantes transgéniques sont bien connues en elles-mêmes de l'homme du métier. Généralement, ces méthodes impliquent la transformation de cellules végétales, la régénération de plantes à partir des cellules transformées, et la sélection des plantes ayant intégré le transgène.

De nombreuses techniques de transformation de cellules végétales germinales ou somatiques (isolées, sous forme de cultures de tissus ou d'organe, ou sur la plante entière), et de régénération des plantes sont disponibles. Le choix de la méthode la plus appropriée dépend généralement de la plante concernée.

A titre d'exemples non limitatifs de méthodes utilisables dans le cas des plantes mentionnées ci-dessus, il est possible de citer les protocoles décrits par GUIZ *et al.* (*Scientia Horticulturae* 84 : 91-99, 2000) pour le melon, par HAMZA et CHUPEAU (*J. Exp. Bot.* 44 : 1837-1845, 1993) pour la tomate, par SHOEMAKER *et al.* (*Plant Cell Rep.* 3 : 178-181, 1986), par TROLINDER et GOODIN (*Plant Cell Rep.* 6 : 231-234, 1987) pour le cotonnier, par VAN DER MARK *et al.* (*J. Genet Breeding* 44 : 263-268, 1990) ou par MARCHANT *et al.* (*Ann. Bot.* 81 : 109-114, 1998) pour les rosiers. Dans le cas des plantes monocotylédones, on peut citer par exemple les protocoles décrits par HIEI *et al.* (*The Plant Journal*, 6, 271-282, 1994) ou ISHIDA *et al.* (*Nature biotechnology*, 14, 745-750, 1996) pour le maïs, ou par RASCO-GAUNT *et al.* (*J. Exp. Bot.* 52 : 865-874, 2001) pour le blé.

A titre d'exemple complémentaire, l'obtention d'*A. thaliana* surexprimant les facteurs de transcription ZmMYB31 ou ZmMYB42 a été décrite par FORNALE *et al.*, 2006 (cité ci-dessus).

La présente invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples non-limitatifs illustrant l'obtention de plantes transgéniques surexprimant le facteur de transcription R2R3-MYB de la sous-famille 4 tel que défini ci-dessus et la mise en évidence de son rôle dans l'augmentation de la résistance au déficit hydrique, ainsi que des figures annexées :

**Figure 1** : alignement des séquences peptidiques des facteurs de transcription R2R3-MYB de la sous-famille 4 de *H. vulgare* (HvMYB1, SEQ ID NO : 5), *T. aestivum* (TaMYB1, SEQ ID NO : 8), d'*O. sativa* (Os09g36730, SEQ ID NO : 6 et OsPTYPE, SEQ ID NO :

7), de *Z. mays* (ZmMYB42, SEQ ID NO : 9 et ZmP20025, SEQ ID NO : 10) avec le facteur de transcription ZmMYB31 de *Z. mays* (SEQ ID NO : 1), en utilisant le programme d'ordinateur « *needle* » (« *Matrix* » : EBLOSUM62, « *Gap penalty* » : 10,0 et « *Extend penalty* » : 0,5). Les acides aminés conservés (a. a. conservés) entre toutes les séquences peptidiques sont aussi représentés.

**Figure 2** : carte des vecteurs binaires pBIOS1977 (A) et pBIOS1978 (B).

**(1) Exemple 1 : obtention de maïs transgéniques surexprimant le facteur de transcription ZmMYB31**

1) Clonage et transformation génétique du maïs

Deux vecteurs de transformation différents (pBIOS 1562 et pBIOS 1958) ont été utilisés pour la transformation génétique du maïs. Ces vecteurs contiennent le gène *bar* de *Streptomyces hygroscopicus* conférant la résistance à l'herbicide bialaphos (WHITE *et al.*, Nucleic Acids Res., 18:1062, 1990), utile pour la sélection des transformants de maïs, et un gène codant une GFP (*Green Fluorescente Protein*) en tant que marqueur visuel pour suivre la présence du transgène dans les plantes et les graines. La différence entre ces deux vecteurs réside dans la stratégie de clonage utilisée pour introduire la cassette d'expression contenant le gène d'intérêt (clonage via le système Gateway® ou clonage par restriction) et le promoteur pour l'expression de la GFP (le promoteur du virus de la mosaïque des nervures du manioc (CsVMV) suivi par l'intron FAD2 d'*Arabidopsis* ou le promoteur de la gluténine de haut poids moléculaire spécifique de l'endosperme).

Selon une première stratégie de clonage, le gène synthétique codant ZmMYB31 (SEQ ID NO : 11 ; séquence synthétique optimisée pour l'expression dans le maïs) contenant les sites de restriction *attL1* et *attL2* a été introduit par une réaction de recombinaison LR dans le vecteur binaire de destination GATEWAY pBIOS 1562, générant ainsi le vecteur pBIOS1977 (voir Figure 2A). Le vecteur pBIOS 1562 est dérivé du vecteur pSB12 (KOMARI *et al.*, Plant J., 10:165-174, 1996) contenant le gène *bar* sous le contrôle du promoteur pActin, le gène codant une GFP sous le contrôle du promoteur du CsVMV suivi par l'intron FAD2, le promoteur et le 1<sup>er</sup> intron de l'ubiquitine 3 du riz (SIVAMANI *et al.*, Plant Mol Biol., 60:225-239, 2006) suivie d'une cassette GATEWAY et d'une séquence

de polyadénylation provenant du gène Sac66 d'*Arabidopsis* (JENKINS *et al.*, Plant Cell Environ., 22:159-167, 1999).

Selon une seconde stratégie de clonage, le gène synthétique codant ZmMYB31 (SEQ ID NO : 11) a été introduit par clonage par restriction (présence de sites de restriction *SapI* entre la région codante et les sites attL) dans le vecteur binaire de destination pBIOS 1958 digéré par *SapI*, générant ainsi le vecteur pBIOS1978 (voir Figure 2B). pBIOS 1958 est également dérivé du vecteur pSB12, mais possède le gène codant une GFP sous le contrôle du promoteur de la gluténine de haut poids moléculaire spécifique de l'endosperme (promoteur HMWG).

les vecteurs pBIOS1977 ou pBIOS1978 ont ensuite été transférés dans la souche d'*Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 (pSB1) selon la méthode décrite par KOMARI *et al.*, 1996 (cité ci-dessus).

Le cultivar de maïs A188 a ensuite été transformé par cette souche d'agrobactérie contenant le vecteur pBIOS1977 ou le vecteur pBIOS1978, selon la méthode décrite par ISHIDA *et al.*, 1996 (cité ci-dessus).

Les transformants primaires (T0) ont été sélectionnés selon des méthodes de routine en fonction des quatre critères suivants :

- (i) *nombre de copies insérées* : Cette détermination a été réalisée par PCR quantitative. Tous les événements de transformation possédant plus de 2 copies du transgène ont été éliminés.
- (ii) *intégrité de l'ADN-T inséré* : Elle a été vérifiée par une réaction de PCR au cours des premières étapes de développement de la plante transformée.
- (iii) *absence de terminaison prématurée de la transcription du transgène* : Chacun des gènes ciblés étant sous le contrôle d'un promoteur constitutif, il est possible de mesurer leur expression à partir de tissus foliaires. Les ARN de feuilles de plantes T0 ont donc été extraits et l'intégrité des transcrits vérifiée par RT-PCR à l'aide d'une amorce sens située sur l'intron ubiquitine3 de riz et d'une amorce antisens située sur le terminateur AtSac66.
- (iv) *nombre de grains T1 récoltés*.

Après sélection des transformants, il a été obtenu 52 lignées transgéniques dont 21 ont un transgène unique et intègre.

2) Evaluation de la tolérance des plantes transgéniques au déficit hydrique

Des plantes de première génération (croisement du transformant primaire avec la lignée récurrente A188) sont évaluées sur une plate-forme de phénotypage. Ces plantes transgéniques sont donc hémizygotes pour le transgène (caractère dominant de la transformation génétique). Les témoins (« RRS » et « RCP) utilisés dans l'expérimentation correspondent aux ségrégants sauvages issus de ce même croisement.

### 2.1 Compartiment de culture

Les plantes étudiées sont cultivées en phytotron. Ce dernier, d'une surface de 30 m<sup>2</sup> dispose de deux chambres de culture indépendantes. Dans ces chambres l'éclairage, la température et l'hygrométrie sont régulés (voir paragraphe 2.2. ci-dessous).

Les semis sont réalisés dans des terrines de dimensions 44 x 28,5 x 7 cm (H x l x L). Cinq génotypes sont semés par terrine à raison de dix graines par génotype. Cinq plantes seulement par génotype sont utilisées pour mesurer la cinétique de dessèchement.

### 2.2 Conditions de culture

Au sein du compartiment de culture la température, l'humidité et l'éclairage sont régulés.

Les conditions appliquées sont les suivantes :

*Photopériode :*

- Jour durant 16h (6h à 22h) avec complément photosynthétique (lampe à sodium 400W) lorsque le rayonnement extérieur est inférieur à 100W/m<sup>2</sup>.

- Nuit durant 8h (22h à 6h).

*Thermopériode :* 24°C / 20°C.

Le respect de ces conditions est assuré par un chauffage lorsque la température est inférieure à 20°C la nuit ou 24°C le jour, lorsque la température dépasse 25°C.

*Humidité :* 75% d'humidité relative régulée par brumisation nocturne.

Ces différentes conditions assurent une croissance optimale du maïs.

### 2.3 Mesure de la cinétique de dessèchement

*Pertinence du caractère mesuré :*

Le comportement des plantes vis-à-vis de la transpiration est étudié grâce au suivi en continu de la baisse de la teneur en eau relative (RWC : Relative Water Content) de



plantules à un stade jeune (4 feuilles visibles). L'objectif est d'étudier la réponse en termes de contrôle stomatique des plantes lors d'un arrêt brutal de l'alimentation en eau.

Un contrôle stomatique très rapide à l'apparition d'un déficit hydrique permet d'économiser l'eau disponible mais limite la capacité d'assimilation du  $\text{CO}_2$  donc le potentiel de production de la plante. En revanche, une fermeture assez tardive des stomates permet le maintien de l'activité photosynthétique de la plante assurant le maintien du potentiel de production au risque de se dessécher plus rapidement (Khalifaoui, 1991, In : *L'amélioration des plantes pour l'adaptation aux milieux arides*. Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext, pp. 51-63).

*Méthode :*

Les mesures sont réalisées sur des plantules T1 entières au stade 3-4 feuilles visibles. Les plantes utilisées au cours de cette mesure sont des plantes issues d'un semis en excès par rapport aux besoins de la plate-forme (3 graines semées par pot). Les effectifs pour la mesure de dessèchement sont de 5 plantes par évènement de transformation et témoins sauvages.

Les plantes sont coupées au niveau du collet, immergées pendant 24 heures à 4°C à l'obscurité (pour saturer les cellules en eau) puis placées dans une enceinte climatique lumineuse régulée à 30°C.

Un suivi du poids des plantules est alors réalisé selon le calendrier détaillé dans le Tableau II ci-dessous :

Tableau II : Calendrier des pesées des plantules conditionnées à 30°C en pleine lumière. Le poids à H0 correspond au poids à pleine turgescence. En fin de jour 3, les plantules sont placées dans une étuve à 80°C pendant 24h00 afin d'obtenir par une dernière pesée la valeur de poids sec.

Jour	Durée	
1	H0	← Poids pleine turgescence ( $P_{\text{Turg}}$ )
1	H0+2	← Poids à l'instant t ( $P_t$ )
1	H0+6	
1	H0+8	
4	H0+96	← Poids sec ( $P_s$ )

A l'instant t, la teneur en eau relative des plantes est ensuite calculée selon la formule mathématique suivante :  $(P_t - P_s) / (P_{\text{Turg}} - P_s) \times 100$ .

## REVENDECATIONS

1) Procédé pour augmenter la tolérance d'une plante au déficit hydrique, caractérisé en ce que l'on surexprime dans ladite plante un facteur de transcription R2R3-MYB de la sous-famille 4 possédant au moins 70% d'identité avec la séquence SEQ ID NO: 1.

2) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que ledit facteur de transcription R2R3-MYB de la sous-famille 4 est issue d'une plante monocotylédone, et comprend les acides aminés conservés situés aux positions 1-9, 11-13, 15-22, 24-25, 27, 30-41, 43-70, 74-75, 77-78, 80-83, 85-93, 95-111, 113-116, 120-127, 138, 140-141, 197, 202-212, 214, 234, 239, 242, 252, 254-255, 261-263, 267-271 et 274-275 de ladite séquence SEQ ID NO : 1 lorsqu'il est aligné avec ladite séquence SEQ ID NO : 1.

3) Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que ledit facteur de transcription R2R3-MYB de la sous-famille 4 est choisi dans le groupe constitué parmi les séquences d'acides aminés SEQ ID NO : 1 et SEQ ID NO : 5 à SEQ ID NO : 10, de préférence SEQ ID NO : 1.

4) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que ladite plante est choisie parmi les plantes potagères, les plantes ornementales, les arbres fruitiers, les plantes de grandes cultures et les plantes de cultures industrielles.

5) Plante monocotylédone transgénique, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un transgène contenant une cassette d'expression recombinante comprenant un polynucléotide codant pour un facteur de transcription R2R3-MYB de la sous-famille 4 tel que défini à l'une quelconque des revendications 1 à 3.

6) Plante monocotylédone transgénique selon la revendication 5, caractérisée en ce qu'elle est une plante de maïs transgénique.

7) Utilisation d'un polynucléotide codant un facteur de transcription R2R3-MYB de la sous-famille 4 tel que définie à l'une quelconque des revendications 1 à 3, pour induire chez une plante une tolérance à un stress hydrique.

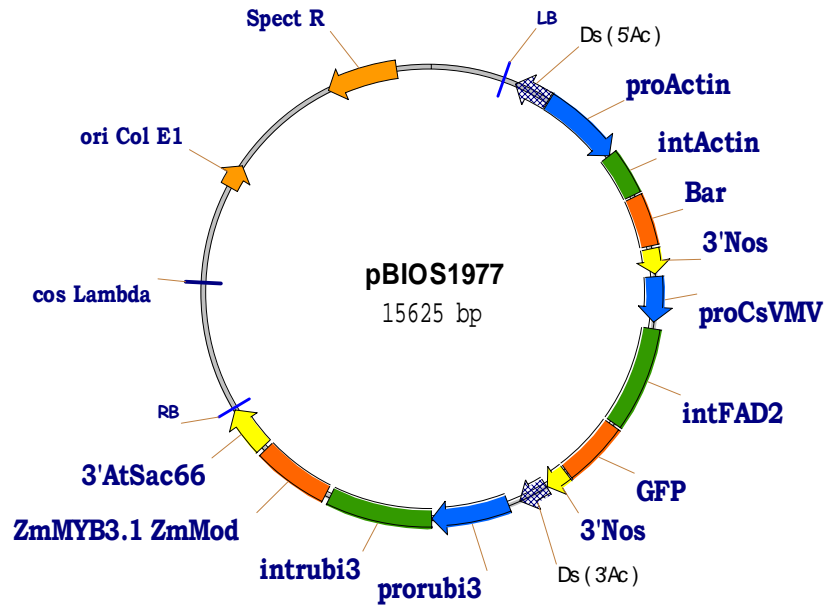
## ABREGE

La présente invention concerne un procédé pour augmenter la tolérance d'une plante au déficit hydrique, lequel procédé comprend la surexpression dans ladite plante d'un facteur de transcription R2R3-MYB de la sous-famille 4.

	1	50
HvMYB1	(1) MGRSPCCEKAHTNKGAWTKEEDDRLTAYIKAHGEGCWRSPLPKAAGLLRCG	
TaMYB1	(1) MGRSPCCEKAHTNKGAWTKEEDDRLTAYIKAHGEGCWRSPLPKAAGLLRCG	
Os09g36730	(1) MGRSPCCEKAHTNKGAWTKEEDDRLIAYIKAHGEGCWRSPLPKAAGLLRCG	
OsPTYPE	(1) MGRSPCCEKEHTNKGAWTKEEDERLVAYIRAHGEGCWRSPLPKAAGLLRCG	
ZmMYB42	(1) MGRSPCCEKAHTNRGAWTKEEDERLVAYVRAHGEGCWRSPLPRAAGLLRCG	
ZmP20025	(1) MGRSPCCEKAHTNRGAWTKEEDERLVAYIRAHGEGCWRSPLPKAAGLLRCG	
ZmMYB31	(1) MGRSPCCEKAHTNKGAWTKEEDERLVAHIRAHGEGCWRSPLPKAAGLLRCG	
a. a. conservés	(1) MGRSPCCEK HTN GAWTKEED RL A AHGEGCWRSPLP AAGLLRCG	
	51	100
HvMYB1	(51) KSCRLRWINYLRPDLKRGNFSHEEDELIIKLHSLGNGKWSLIAGRRLPGRT	
TaMYB1	(51) KSCRLRWINYLRPDLKRGNFSDEEDELIIKLHSLGNGKWSLIAGRRLPGRT	
Os09g36730	(51) KSCRLRWINYLRPDLKRGNFTEEDEDELIIKLHSLGNGKWSLIAGRRLPGRT	
OsPTYPE	(51) KSCRLRWINYLRPDLKRGNFTAEDDLIIKLHSLGNGKWSLIAARLPGR	
ZmP20025	(51) KSCRLRWINYLRPDLKRGNFTAEDDLIVKLHSLGNGKWSLIAARLPGR	
ZMP20025	(51) KSCRLRWINYLRPDLKRGNFTAEDDLIVKLHSLGNGKWSLIAARLPGR	
ZmMYB31	(51) KSCRLRWINYLRPDLKRGNFTEEDEDELIVKLHSLVGNKWSLIAGRRLPGRT	
a. a. conservés	(51) KSCRLRWINYLRPDLKRGNF ED LI KLHS LGNKWSLIA RLPGR	
	101	150
HvMYB1	(101) DNEIKNYWNTHIRRKLT SRGIDPVTHRAINS DHAASNITISFES-----A	
TaMYB1	(101) DNEIKNYWNTHIRRKLT SRGIDPVTHRAINS DHAASNITISFET-----A	
Os09g36730	(101) DNEIKNYWNTHIRRKLLSRGIDPVTHR PIN--DSASNITISFEAAAA--A	
OsPTYPE	(101) DNEIKNYWNTHIRRKLLGRGIDPVTHR PVNAAAA----TISFHPQP----	
ZmMYB42	(101) DNEIKNYWNTHIRRKLLGSGIDPVTHR RVAGGAA---TTISFQPSPN---	
ZmP20025	(101) DNEIKNYWNTHVRRKLLGRGIDPVTHRPIAADAVTV-TTVSFQPS-----	
ZmMYB31	(101) DNEIKNYWNTHIRRKLLSRGIDPVTHR PVTE--EHHASNITISFEVAAAA	
a. a. conservés	(101) DNEIKNYWNTH RRKL GIDPVTHR T SF	
	151	200
HvMYB1	(146) QRDDKGAVFRRDAEPAKAAAAAASHHVDHHR-SN--PQLDWGQ GK-P	
TaMYB1	(146) QRDDKGAVFRRDAEPTKVAAAAAITHVDHHHHR-SNPLHQMEWGQ GK-P	
Os09g36730	(147) ARDDKAAVFRREDHPHQKAVTVAQ-----EQQ-----AAADWGHGK-P	
OsPTYPE	(143) -----PPTTKEEQ LILS-----K-P	
ZmMYB42	(145) S---AAAAAAETAQAQAPIKAEETA-----AVK-A	
ZmP20025	(146) S---AAAAAAEAEATA-----A-----K-A	
ZmMYB31	(150) RDDKKGAVFRLEDEEEEEERNKATMVVGRDRQSQSHSHSPAGEWGQ GKRP	
a. a. conservés	(150) K	
	201	250
HvMYB1	(192) LKCPDLNLDLCISPP IH-----EDPMVDTKPVVKREAGVGV-----	
TaMYB1	(195) LKCPDLNLDLCISPPSH-----EDPMVDTKPVVKREA-----	
Os09g36730	(185) LKCPDLNLDLCISLPSQ-----EEPMMMK--PVKRET-----	
OsPTYPE	(157) PKCPDLNLDLCISPPSCQEED-----DDYEAKPAMIVRAPELQR-----	
ZmMYB42	(171) PRCPDLNLDLCISPPCQHEDDGEEDDEELDLPKPAFVKREALQAG----HG	
ZmP20025	(163) PRCPDLNLDLCISPPCQQQEE---EEVDLKPSAAVVKREVLLGGRGHGHG	
ZmMYB31	(200) LKCPDLNLDLCISPPCQEEEEE---MEEAAMRVRPAVKREA-----	
a. a. conservés	(200) CPDLNLDLCIS P R	
	251	301
HvMYB1	(228) GVVGLCFSCSMGLPR-SSDCKCSS-----FMGLRTAMLDFRSLEMK	
TaMYB1	(227) -VVGLCFSCSMGLPR-SADCKCSS-----FMGLRTAMLDFRSLEMK	
Os09g36730	(215) ---GVCFSCSLGLPK-STDCKCSS-----FLGLRTAMLDFRSLEMK	
OsPTYPE	(196) RRGGLCFGCSLGLQK---ECKCSGGGAGAGAGNNFLGLRAGMLDFRSLPMK	
ZmMYB42	(217) HGHGLCLGCGLGQKGAAGCSCS-----NGHHFLGLRTSVLDFRGLMK	
ZmP20025	(210) HGGALCFGCSLGLVQKGAAGCSCSSS-----NGHRCLGLRGMDFRGLMK	
ZmMYB31	(237) ---GLCFGCSLGLPR-TADCKCSSS-----SFLGLRTAMLDFRSLEMK	
a. a. conservés	(237) C C G C CS GLR LDFR MK	

Figure 1

A



B

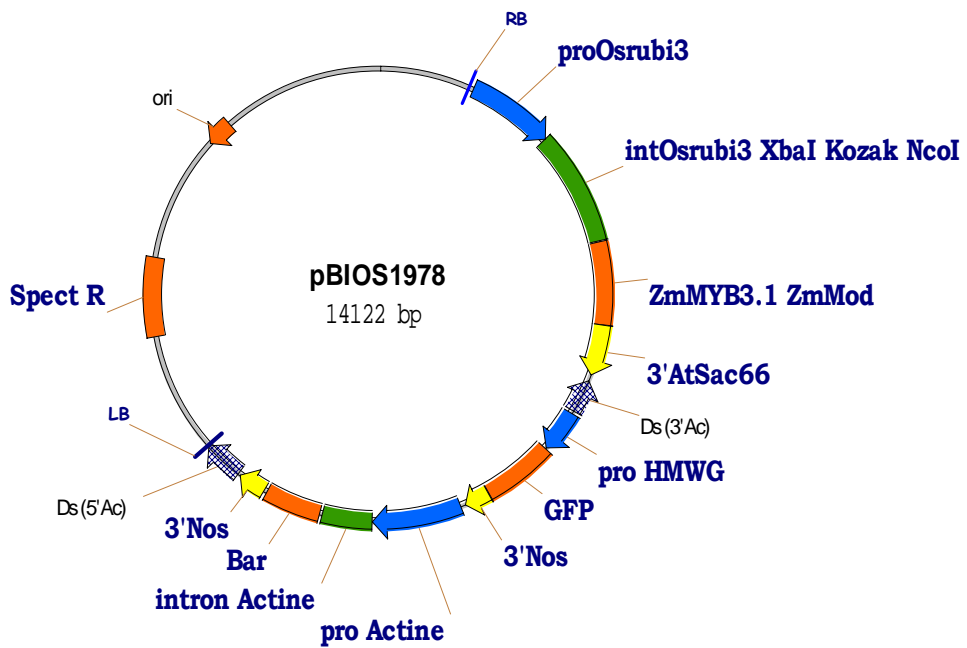


Figure 2

## **ANNEXE 2**

### **BREVET D'INVENTION**

**Obtention de plantes ayant une tolérance améliorée à un déficit hydrique grâce à d'une protéine TE (acyl-ACP thioestérase) de type FatA**



26bis, rue de Saint-Petersbourg - 75800 PARIS Cedex 08  
 Pour vous informer : INPI Direct 0 820 210 211  
 Pour déposer par télécopie : 33 (0)1 53 04 52 65

## BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354\*06

### REQUÊTE EN DELIVRANCE page 1/2



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire



DB 540 W - 12 08

REMISE DES PIÈCES DATE <b>15/10/2010</b> INPI - Paris SP34 LIEU <b>10/04058</b> N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI		Réservé à l'INPI <b>1</b> NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE CABINET ORÈS 36 rue de Saint Pétersbourg 75008 PARIS	
<b>Vos références pour ce dossier</b> <i>(facultatif)</i> XRN-1516-39FR		<input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie	
<b>Confirmation d'un dépôt par télécopie</b>		<input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie	
<b>2 NATURE DE LA DEMANDE</b>		<b>Cochez l'une des 4 cases suivantes</b>	
Demande de brevet	<input checked="" type="checkbox"/>		
Demande de certificat d'utilité	<input type="checkbox"/>		
Demande divisionnaire <i>Demande de brevet initiale</i> <i>ou demande de certificat d'utilité initiale</i>	<input type="checkbox"/>	N° _____ Date _____ N° _____ Date _____	
Transformation d'une demande de brevet européen <i>Demande de brevet initiale</i>	<input type="checkbox"/>	N° _____ Date _____	
<b>3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)</b> Obtention de plantes ayant une tolérance améliorée à un déficit hydrique.			
<b>4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE</b>		Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
<b>5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)</b>		<input checked="" type="checkbox"/> <b>Personne morale</b> <input type="checkbox"/> <b>Personne physique</b>	
Nom ou dénomination sociale		GENOPLANTE-VALOR	
Prénoms			
Forme juridique			
N° SIREN		_____	
Code APE-NAF		_____	
Domicile ou siège	Rue	28 rue du Docteur Finlay	
	Code postal et ville	[7 5 0 1 5] PARIS	
	Pays	France	
Nationalité		Française	
N° de téléphone <i>(facultatif)</i>		N° de télécopie <i>(facultatif)</i>	
Adresse électronique <i>(facultatif)</i>			
<input type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»			

Remplir impérativement la 2<sup>ème</sup> page

**BREVET D'INVENTION  
 CERTIFICAT D'UTILITÉ**
**REQUÊTE EN DÉLIVRANCE**  
 page 2/2

**BR2**

15/10/2010 <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">Réservé à l'INPI</span> REMISE DES PIÈCES DATE 75 INPI - Paris SP34 LIEU N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		10/04058 DB 540 W - 12 08
<b>6 MANDATAIRE (s'il y a lieu)</b>		
Nom		RANÇON
Prénom		Xavier
Cabinet ou Société		CABINET ORÈS
Nationalité		
N °de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel		
Adresse	Rue	36 rue de Saint Pétersbourg
	Code postal et ville	7 5 0 0 8   PARIS
	Pays	
N° de téléphone (facultatif)		
N° de télécopie (facultatif)		
Adresse électronique (facultatif)		
<b>7 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques</b>		
Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : <b>Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)</b>
<b>8 BÉNÉFICIAIRE DE LA RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b>		
		<input type="checkbox"/> Personne(s) physique(s) <input checked="" type="checkbox"/> PME jusqu'à 1000 salariés ( <b>attestation à fournir dans le mois du dépôt</b> ) <input type="checkbox"/> Organisme à but non lucratif dans le domaine de l'enseignement ou de la recherche ( <b>attestation à fournir dans le mois du dépôt</b> )
<b>9 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS</b>		
		<input checked="" type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences
Le support électronique de données est joint		<input checked="" type="checkbox"/>
La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe		<input checked="" type="checkbox"/>
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes		
<b>10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)</b>		<b>VISA DE L'INPI</b>
Xavier RANÇON CPI n° 10-0921 		

Conformément aux dispositions de la loi n° 78-17 du 6.01.1978 modifiée relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés, vous bénéficiez d'un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI. Les données à caractère personnel que vous êtes tenu(e) de nous fournir dans ce formulaire sont exclusivement utilisées pour identifier le titulaire de la demande et son éventuel mandataire.



---

OBTENTION DE PLANTES AYANT UNE TOLERANCE AMELIOREE A UN DEFICIT  
HYDRIQUE

La présente invention concerne un procédé d'obtention de plantes tolérantes à un déficit hydrique.

Le « déficit hydrique » correspond à une situation où la quantité d'eau transpirée par une plante est supérieure à la quantité d'eau absorbée par ladite plante.

Le déficit hydrique est l'un des stress abiotiques les plus importants pour les plantes. Il peut affecter leur croissance et leur reproduction des plantes, conduisant ainsi à une perte de rendement.

Par conséquent, il est important d'identifier des gènes qui possèdent la capacité d'améliorer la tolérance des plantes au déficit hydrique.

Les protéines ENR (« *enoyl-acyl carrier protein (ACP) reductase* ») et TE (acyl-ACP thioestérase, E.C. 3.1.2.14) sont impliquées dans la biosynthèse des acides gras chez les plantes. Les protéines ENR convertissent le 2,3-*trans*-enoyl-ACP en acyl-ACP saturé et les protéines TE hydrolysent la moitié acyl de l'ACP libérant un ACP-SH et un acide gras qui va subir d'autres transformations *via* la voie de biosynthèse des acides gras à longues chaînes catalysée par l'acyl-CoA synthétase. Il a été montré que les protéines ENR et TE interagissent physiquement ensemble (HELLYER *et al.*, Plant Mol. Biol., 20:763-780, 1992). Elles constitueraient un métabolite facilitant le transfert de substrats et de produits, et la régulation simultanée (« *channeling* ») des enzymes impliquées dans la voie métabolique des acides gras (BROWN *et al.*, J. Exp. Bot., 57:1563-1571, 2006).

Il existe deux classes majeurs de protéines TE : la classe de type FatA, qui a comme substrat préférentiel l'acide oléique-ACP (18:1-ACP), et la classe de type FatB qui a comme substrat préférentiel l'acide palmitique-ACP (16:0-ACP) (BEISSON *et al.*, Plant Physiol., 132:681-697, 2003).

Chez le maïs, une protéine TE de type FatA (dénommée ZmFatA), dont le gène codant pour cette protéine est localisé sur le chromosome 2, possède la séquence peptidique représentée par la séquence SEQ ID NO : 1.

MAYER et SHANKLIN (BMC Plant Biology, 7:1, 2007) ont identifié 4 résidus d'acides aminés dans la séquence peptidique

des protéines TE d'*Arabidopsis thaliana* (acides aminés en position 74, 86, 141 et 174) qui influencent, chez les plantes, la spécificité de substrat entre les protéines TE de type FataA et celles de type FatB. Ces 4 résidus sont respectivement situés aux positions 108, 120, 175 et 208 dans la séquence d'acides aminés de ZmFataA (SEQ ID NO : 1).

Au cours de leurs travaux, les inventeurs ont mis en évidence que des plantes de maïs (*Zea mays*) transgéniques surexprimant la protéine TE de type FataA (ZmFataA) présentaient une tolérance augmentée à un déficit hydrique par rapport aux plantes de maïs sauvages (non transgéniques).

Les inventeurs ont également mis en évidence les orthologues de la protéine ZmFataA chez le riz (*Oryza sativa*), le sorgho (*Sorghum bicolor*), le blé (*Triticum aestivum*), *Brachypodium distachyon* et *Arabidopsis thaliana*.

La séquence peptidique des orthologues chez les plantes monocotylédones (e.g., sorgho, blé et *Brachypodium*) possède au moins 78% d'identité ou au moins 84% de similarité avec la séquence peptidique ZmFataA et comprend les acides aminés conservés situés aux positions 1-4, 8-10, 15, 19, 46, 51, 69-74, 76-87, 89-92, 94-116, 118-121, 123-133, 135-136, 138-168, 170-171, 174-180, 182-184, 187-189, 191-197, 200-202, 204-212, 214-219, 221-224, 226-239, 241-242, 244, 246, 249, 251-303, 305-312, 315, 317-318, 323-325, 330-331, 337-345, 348, 350, 352-359, 360-361 et 363 de ZmFataA (SEQ ID NO : 1) lorsqu'elle est alignée avec la protéine ZmFataA (voir les Figures 1A et 1B).

La séquence peptidique des orthologues chez *A. thaliana* (plante dicotylédone) (BEISSON et al., 2003, cité ci-dessus) possède au moins 63% d'identité ou au moins 69% de similarité avec la séquence peptidique ZmFataA et comprend les acides aminés conservés situés aux positions 24, 55, 61, 70, 73-74, 76, 78, 80-82, 84-87, 89, 91-92, 94-97, 99-103, 105-114, 116-118, 120, 122-132, 134-138, 140-144, 146-157, 159-168, 171, 173-183, 186-189, 191-202, 204-208, 210, 212, 214-217, 222-223, 226-235, 237-242, 244, 246-251, 254-255, 257-283, 285, 287-291, 294-303, 305-306, 308-312, 323-325, 328, 338-340, 342-343, 348, 350-354, 356 et 358-360 de ZmFataA (SEQ ID NO : 1) lorsqu'elle est alignée avec la protéine ZmFataA (voir Figure 2).

Sauf précision contraire, l'alignement entre deux séquences peptidiques et le calcul des pourcentages d'identité et

de similarité sont effectués sur toute la longueur des séquences peptidiques à l'aide du programme d'ordinateur « *needle* » (NEEDLEMAN et WUNSCH, J. Mol. Biol., 48, 443-453, 1970) en utilisant les paramètres par défaut : « *Matrix* » : EBLOSUM62, « *Gap penalty* » : 10,0 et « *Extend penalty* » : 0,5..

La présente invention propose en conséquence d'utiliser la protéine ZmFatA ou un orthologue de celle-ci pour augmenter la résistance des plantes au déficit hydrique.

La présente invention a pour objet un procédé pour augmenter la tolérance d'une plante au déficit hydrique, caractérisé en ce que l'on surexprime dans ladite plante une protéine TE de type FatA possédant au moins 60% d'identité, et par ordre de préférence croissant au moins 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% et 99% d'identité, ou au moins 70% de similarité, et par ordre de préférence croissant au moins 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% et 99% de similarité avec la séquence SEQ ID NO: 1.

Selon un mode de réalisation avantageux de la présente invention, ladite protéine TE de type FatA comprend les acides aminés conservés situés aux positions 70, 73-74, 76, 78, 80-82, 84-87, 89, 91-92, 94-97, 99-103, 105-114, 116, 118, 120, 123-132, 135-136, 138, 140-144, 146-157, 159-168, 171, 174-180, 182-183, 187-189, 191-197, 200-202, 204-208, 210, 212, 214-217, 222-223, 226-235, 237-239, 241-242, 244, 246, 249, 251, 254-255, 257-283, 285, 287-291, 294-303, 305-306, 308-312, 323-325, 338-340, 342-343, 348, 350, 352-354, 356, 358-359 et 360 de ladite séquence SEQ ID NO : 1 lorsqu'elle est alignée avec ladite séquence SEQ ID NO : 1.

Selon un autre mode de réalisation avantageux de la présente invention, ladite protéine TE de type FatA est issue d'une plante monocotylédone, et possède au moins 78% d'identité, et par ordre de préférence croissant au moins 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% et 99% d'identité, ou au moins 84% de similarité, et par ordre de préférence croissant au moins 85%, 90%, 95%, 97%, 98% et 99% de similarité avec la séquence SEQ ID NO: 1 et comprend les acides aminés conservés situés aux positions 1-4, 8-10, 15, 19, 46, 51, 69-74, 76-87, 89-92, 94-116, 118-121, 123-133, 135-136, 138-168, 170-171, 174-180, 182-184, 187-189, 191-197, 200-202, 204-212, 214-219, 221-224, 226-239, 241-242, 244, 246, 249, 251-303, 305-312, 315, 317-318, 323-325, 330-331, 337-345, 348, 350,

352-359, 360-361 et 363 de ladite séquence SEQ ID NO : 1 lorsqu'elle est alignée avec ladite séquence SEQ ID NO : 1.

Selon un autre mode de réalisation avantageux de la présente invention, ladite protéine TE de type Fata est issue d'une plante dicotylédone, et comprend les acides aminés conservés situés aux positions 24, 55, 61, 70, 73-74, 76, 78, 80-82, 84-87, 89, 91-92, 94-97, 99-103, 105-114, 116-118, 120, 122-132, 134-138, 140-144, 146-157, 159-168, 171, 173-183, 186-189, 191-202, 204-208, 210, 212, 214-217, 222-223, 226-235, 237-242, 244, 246-251, 254-255, 257-283, 285, 287-291, 294-303, 305-306, 308-312, 323-325, 328, 338-340, 342-343, 348, 350-354, 356 et 358-360 de ladite séquence SEQ ID NO : 1 lorsqu'elle est alignée avec ladite séquence SEQ ID NO : 1.

On entend par une protéine TE de type Fata issue d'une plante monocotylédone ou dicotylédone, une protéine TE de type Fata exprimée par une plante monocotylédone ou dicotylédone ou une protéine TE de type Fata synthétique obtenue par mutation d'une protéine TE de type Fata exprimée par une plante monocotylédone ou dicotylédone.

Selon un mode de réalisation préféré de la présente invention, ladite protéine TE de type Fata est fonctionnelle. La détermination d'une protéine TE de type Fata fonctionnelle peut être effectuée selon la méthode décrite par MAYER et SHANKLIN (BMC Plant Biology, 7:1, 2007). Brièvement, un plasmide contenant un gène codant pour une protéine TE de type Fata telle que définie ci-dessus est introduit dans la souche d'*E. coli* K27 (CGSC 5478). Les souches d'*E. coli* transformées sont ensuite cultivées dans un milieu approprié. La teneur et la quantité des esters méthyliques d'acides gras excrétés dans le milieu de culture par lesdites souches sont alors déterminées.

Selon un autre mode de réalisation préféré de la présente invention, ladite protéine TE de type Fata est choisie dans le groupe constitué par les séquences d'acides aminés suivantes :

- SEQ ID NO : 1 (ZmFata),
- SEQ ID NO : 2 (protéine TE de type Fata de *B. distachyon*),
- SEQ ID NO : 3 (protéine TE de type Fata de *T. aestivum*),
- SEQ ID NO : 4 (protéine TE de type Fata d'*O. sativa*),
- SEQ ID NO : 5 et 6 (protéines TE de type Fata de *S. bicolor*), et
- SEQ ID NO : 7 et 8 (protéines TE de type Fata d'*A. thaliana*).

- SEQ ID NO : 8 (protéine TE de type FatA d'*A. thaliana*), de préférence encore, SEQ ID NO : 1.

La présente invention s'applique à toutes les plantes monocotylédones ou dicotylédones, et notamment aux plantes sensibles au déficit hydrique. De manière non limitative, elle peut s'appliquer aux plantes potagères, aux plantes ornementales, aux arbres fruitiers, aux plantes de grandes cultures telles que le blé, le maïs ou le riz, ou aux plantes de cultures industrielles comme le cotonnier, le colza ou le tournesol, de préférence le maïs.

La surexpression (augmentation de l'expression) dans une plante d'une protéine TE de type FatA telle que définie ci-dessus, peut être effectuée par la modification du génome de ladite plante. Cette modification du génome peut notamment s'effectuer par transformation génétique de ladite plante par une ou plusieurs copies d'un polynucléotide codant pour ladite protéine, associé à des séquences de régulation en *cis* de son expression. La surexpression de ladite protéine TE de type FatA peut également être obtenue par modification des séquences de régulation en *cis* de l'expression de ladite protéine TE FatA, par exemple en remplaçant son promoteur endogène par un promoteur plus fort, permettant un niveau de transcription plus élevé, ou bien en adjoignant au promoteur endogène des séquences activatrices de la transcription, de type « amplificateur », ou de la traduction.

Pour la mise en œuvre du procédé selon la présente invention, on utilise une cassette d'expression, comprenant un polynucléotide codant pour une protéine TE de type FatA telle que définie ci-dessus, placé sous le contrôle transcriptionnel d'un promoteur approprié.

Ledit promoteur peut être un promoteur hétérologue. Dans ce cas, on peut utiliser par exemple :

- des promoteurs constitutifs, tels que le promoteur de la gluténine de haut poids moléculaire spécifique de l'endosperme (VERDAGUER *et al.*, Plant Mol Biol., 31:1129-1139, 1996), le promoteur de l'ARN 35S (ODELL *et al.*, Nature, 313:810-812, 1985) ou 19S (KAY *et al.*, Science, 236:1299-1302, 1987) du CaMV, le promoteur de l'actine 1 du riz (McELROY *et al.*, Plant Cell, 2:163-171, 1990), le promoteur de l'ubiquitine 3 du riz ou du maïs (SIVAMANI *et al.*, Plant Mol Biol., 60:225-239, 2006),

- des promoteurs spécifiques du phloème, tels que le promoteur du Wheat Dwarf Virus (DINANT et al., *Physiologia plantarum* 121 : 108-116, 2004 ; Demande PCT WO 03/060135) ou le promoteur de *AtPP2-A1* (DINANT et al., *Plant Physiol.*, 131 : 114-128, 2003),

- des promoteurs spécifiques des feuilles, tels que le promoteur de la petite sous-unité de la Rubisco, le promoteur de la phosphoénolpyruvate carboxylase,

- des promoteurs spécifiques des racines, tels que le promoteur RCc3 du riz (Demande Internationale WO 2009/016104), le promoteur antiquitine du riz (Demande Internationale WO 2007/076115), ou

- des promoteurs localement inductibles par le stress (sécheresse, salinité), tels que le promoteur rd29 d'*Arabidopsis* (YAMAGUCHI-SHINOZAKI et SHINOZAKI, *Mol. Gen. Genet.*, 236: 331-340, 1993),

de préférence le promoteur de la gluténine de haut poids moléculaire spécifique de l'endosperme.

On peut également utiliser le promoteur d'une autre protéine TE (par exemple une protéine TE de type FatB).

Pour la mise en œuvre du procédé selon la présente invention, on peut aussi utiliser des vecteurs recombinants, résultant de l'insertion d'une cassette d'expression telle que décrite ci-dessus dans un vecteur hôte.

Les cassettes d'expression et vecteurs recombinants tels que décrits ci-dessus peuvent, bien entendu, comprendre en outre d'autres séquences, usuellement employées dans ce type de constructions. Le choix de ces autres séquences sera effectué, de manière classique, par l'homme du métier en fonction notamment de critères tels que les cellules-hôtes choisies, les protocoles de transformation envisagés, etc.

On citera, à titre d'exemples non limitatifs, les terminateurs de transcription, les séquences de tête (séquences « leader ») et les sites de polyadénylation. Ces séquences peuvent être celles qui sont naturellement associées au gène codant la protéine TE de type FatA telle que définie ci-dessus, ou bien peuvent être des séquences hétérologues. Ces séquences n'interviennent pas sur les propriétés spécifiques du promoteur ou du gène auxquelles elles sont associées, mais peuvent améliorer globalement qualitativement ou quantitativement, la transcription,

et le cas échéant, la traduction. A titre d'exemples de séquences de ce type fréquemment utilisées chez les plantes, on citera parmi les plus répandues, le terminateur de l'ARN 35S du CaMV et le terminateur du gène de la nopaline synthase. On peut également, dans le but d'augmenter le niveau d'expression, utiliser des séquences amplificatrices (séquences « *enhancer* » de transcription et de traduction).

Parmi les autres séquences couramment employées dans la construction de cassettes d'expression et vecteurs recombinants, on citera également les séquences permettant le suivi de la transformation, et l'identification et/ou la sélection des cellules ou organismes transformés. Il s'agit notamment de gènes rapporteurs, conférant aux cellules ou organismes transformés un phénotype aisément reconnaissable, ou bien de gènes marqueurs de sélection : seules les cellules ou organismes exprimant un gène marqueur de sélection déterminé, sont viables dans des conditions données (conditions sélectives). Des gènes rapporteurs fréquemment employés sont par exemple celui de la beta-glucuronidase (GUS), celui de la luciférase, ou celui de la « *green fluorescent protein* » (GFP). Des gènes marqueurs de sélection sont généralement des gènes de résistance à un antibiotique, ou également, dans le cas des plantes ou des cellules végétales, à un herbicide. Il existe une très grande variété de gènes marqueurs de sélection parmi lesquels l'homme du métier peut effectuer son choix en fonction des critères qu'il aura lui-même déterminés.

Pour la mise en œuvre du procédé selon la présente invention, on peut également utiliser des cellules-hôtes transformées par un polynucléotide codant pour une protéine TE de type Fata telle que définie ci-dessus, ce qui inclut en particulier les cellules hôtes transformées par une cassette d'expression ou un vecteur recombinant tels que décrits ci-dessus.

On entend par cellule ou organisme transformé par un polynucléotide, toute cellule ou organisme dont le contenu génétique a été modifié par transfert dudit polynucléotide dans ladite cellule ou ledit organisme, quelle que soit la méthode de transfert qui a été utilisée, et que l'information génétique apportée par ledit polynucléotide soit intégrée dans l'ADN chromosomique ou demeure extra-chromosomique.

Les cellules hôtes peuvent être des cellules procaryotes ou eucaryotes. Dans le cas de cellules procaryotes, il peut notamment s'agir d'Agrobactéries telles qu'*Agrobacterium tumefaciens* ou *Agrobacterium rhizobium*. Dans le cas de cellules eucaryotes, il peut s'agir notamment de cellules végétales, issues de plantes monocotylédones ou dicotylédones.

Les plantes transgéniques peuvent être obtenues par transformation génétique par au moins un polynucléotide, une cassette d'expression ou un vecteur recombinant tels que définis ci-dessus. Ces plantes transgéniques comprennent dans leur génome au moins une copie d'un transgène contenant un polynucléotide tel que défini ci-dessus.

On définit ici comme plante transgénique une plante transformée chez laquelle l'information génétique exogène apportée par un polynucléotide transformant est intégrée de manière stable dans l'ADN chromosomique, sous forme de transgène, et peut ainsi être transmise aux descendants de ladite plante. Cette définition englobe donc également les descendants des plantes résultant de la transgénèse initiale, dès lors qu'ils contiennent dans leur génome une copie du transgène.

Le matériel végétal (protoplastes, cals, boutures, graines, etc.) obtenu à partir des cellules transformées ou des plantes transgéniques fait également partie de l'objet de la présente invention. L'invention englobe également les produits obtenus à partir de ces plantes transgéniques, notamment le fourrage, le bois, les feuilles, les tiges, les racines, les fleurs et les fruits.

Différentes méthodes d'obtention de plantes transgéniques sont bien connues en elles-mêmes de l'homme du métier. Généralement, ces méthodes impliquent la transformation de cellules végétales, la régénération de plantes à partir des cellules transformées, et la sélection des plantes ayant intégré le transgène.

De nombreuses techniques de transformation de cellules végétales germinales ou somatiques (isolées, sous forme de cultures de tissus ou d'organe, ou sur la plante entière), et de régénération des plantes sont disponibles. Le choix de la méthode la plus appropriée dépend généralement de la plante concernée.



A titre d'exemples non limitatifs de méthodes utilisables dans le cas des plantes mentionnées ci-dessus, il est possible de citer les protocoles décrits par GUIBÉ *et al.* (Scientia Horticulturae 84 : 91-99, 2000) pour le melon, par HAMZA et CHUPEAU (J. Exp. Bot. 44 : 1837-1845, 1993) pour la tomate, par SHOEMAKER *et al.* (Plant Cell Rep. 3 : 178-181, 1986), ou TROLINDER et GOODIN (Plant Cell Rep. 6 : 231-234, 1987) pour le cotonnier, par VAN DER MARK *et al.* (J. Genet Breeding 44 : 263-268, 1990) ou par MARCHANT *et al.* (Ann. Bot. 81 : 109-114, 1998) pour les rosiers. Dans le cas des plantes monocotylédones, on peut citer par exemple les protocoles décrits par HIEI *et al.* (The Plant Journal, 6, 271-282, 1994) ou ISHIDA *et al.* (Nature biotechnology, 14, 745-750, 1996) pour le maïs, ou par RASCO-GAUNT *et al.* (J. Exp. Bot. 52 : 865-874, 2001) pour le blé.

La présente invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples non-limitatifs illustrant l'obtention de plantes transgéniques surexprimant la protéine TE de type Fata telle que définie ci-dessus et la mise en évidence de son rôle dans l'augmentation de la résistance au déficit hydrique, ainsi que des figures annexées :

**Figure 1A et 1B :** alignement et pourcentage d'identité et de similarité des séquences peptidiques des protéines TE de type Fata de *B. distachyon* (SEQ ID NO : 2), *T. aestivum* (SEQ ID NO : 3), d'*O. sativa* (SEQ ID NO : 4), de *S. bicolor* (SEQ ID NO : 5, Fata1 et SEQ ID NO : 6, Fata2) avec la protéine TE de type Fata de *Z. mays* (ZmFata, SEQ ID NO : 1), en utilisant le programme d'ordinateur « *needle* » (« *Matrix* » : EBLOSUM62, « *Gap penalty* » : 10,0 et « *Extend penalty* » : 0,5). Les acides aminés conservés (a. a. conservés) entre toutes les séquences peptidiques sont aussi représentés.

**Figure 2 :** alignement et pourcentage d'identité et de similarité des séquences peptidiques des protéines TE de type Fata d'*A. thaliana* (SEQ ID NO : 7 [AtFatA1] et SEQ ID NO : 8 [AtFatA2]) avec la protéine TE de type Fata de *Z. mays* (ZmFata, SEQ ID NO : 1), en utilisant le programme d'ordinateur « *needle* » (« *Matrix* » : EBLOSUM62, « *Gap penalty* » : 10,0 et « *Extend penalty* » : 0,5). Les acides aminés conservés (a. a. conservés) entre toutes les séquences peptidiques sont représentés par un astérisque (\*).

**Figure 3** : carte des vecteurs binaires pBIOS1996 (A) et pBIOS1995 (B).

**(2) Exemple 1 : obtention de maïs transgéniques surexprimant la protéine ZMFATA**

1) Clonage et transformation génétique du maïs

Deux vecteurs de transformation différents (pBIOS 1562 et pBIOS 1958) ont été utilisés pour la transformation génétique du maïs. Ces vecteurs contiennent le gène bar de *Streptomyces hygroscopicus* conférant la résistance à l'herbicide bialaphos (WHITE *et al.*, Nucleic Acids Res., 18:1062, 1990), utile pour la sélection des transformants de maïs, et un gène codant une GFP (*Green Fluorescent Protein*) en tant que marqueur visuel pour suivre la présence du transgène dans les plantes et les graines. La différence entre ces deux vecteurs réside dans la stratégie de clonage utilisée pour introduire la cassette d'expression contenant le gène d'intérêt (clonage via le système Gateway® ou clonage par restriction) et le promoteur pour l'expression de la GFP (le promoteur du virus de la mosaïque des nervures du manioc (CsVMV) suivi par l'intron FAD2 d'*Arabidopsis* ou le promoteur de la gluténine de haut poids moléculaire spécifique de l'endosperme).

Selon une première stratégie de clonage, le gène synthétique codant ZmFataA (SEQ ID NO : 9 ; séquence synthétique optimisée pour l'expression dans le maïs) contenant les sites de restriction attL1 et attL2 a été introduit par une réaction de recombinaison LR dans le vecteur binaire de destination GATEWAY pBIOS 1562, générant ainsi le vecteur pBIOS1995 (voir Figure 3A). Le vecteur pBIOS 1562 est dérivé du vecteur pSB12 (KOMARI *et al.*, Plant J., 10:165-174, 1996) contenant le gène bar sous le contrôle du promoteur pActin, le gène codant une GFP sous le contrôle du promoteur du CsVMV suivi par l'intron FAD2, le promoteur et le 1<sup>er</sup> intron de l'ubiquitine 3 du riz (SIVAMANI *et al.*, Plant Mol Biol., 60:225-239, 2006) suivie d'une cassette GATEWAY et d'une séquence de polyadénylation provenant du gène Sac66 d'*Arabidopsis* (JENKINS *et al.*, Plant Cell Environ., 22:159-167, 1999).

Selon une seconde stratégie de clonage, le gène synthétique codant ZmFataA (SEQ ID NO : 9) a été introduit par clonage par restriction (présence de sites de restriction SapI entre la région codante et les sites attL) dans le vecteur binaire de destination pBIOS 1958 digéré par SapI, générant ainsi le

vecteur pBIOS1996 (voir Figure 3B). pBIOS 1958 est également dérivé du vecteur pSB12, mais possède le gène codant une GFP sous le contrôle du promoteur de la gluténine de haut poids moléculaire spécifique de l'endosperme (promoteur HMWG).

les vecteurs pBIOS1995 ou pBIOS1996 ont ensuite été transférés dans la souche d'*Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 (pSB1) selon la méthode décrite par KOMARI *et al.*, 1996 (cité ci-dessus).

Le cultivar de maïs A188 a ensuite été transformé par cette souche d'agrobactérie contenant le vecteur pBIOS1995 ou le vecteur pBIOS1996, selon la méthode décrite par ISHIDA *et al.*, 1996 (cité ci-dessus). Les transformants primaires (T0) ont été sélectionnés selon des méthodes de routine en fonction des quatre critères suivants :

- (v) *nombre de copies insérées* : Cette détermination a été réalisée par PCR quantitative. Tous les évènements de transformation possédant plus de 2 copies du transgène ont été éliminés.
- (vi) *intégrité de l'ADN-T inséré* : Elle a été vérifiée par une réaction de PCR au cours des premières étapes de développement de la plante transformée.
- (vii) *absence de terminaison prématurée de la transcription du transgène* : Chacun des gènes ciblés étant sous le contrôle d'un promoteur constitutif, il est possible de mesurer leur expression à partir de tissus foliaires. Les ARN de feuilles de plantes T0 ont donc été extraits et l'intégrité des transcrits vérifiée par RT-PCR à l'aide d'une amorce sens située sur l'intron ubiquitine3 de riz et d'une amorce antisens située sur le terminateur AtSac66.
- (viii) *nombre de grains T1 récoltés*.

Après sélection des transformants, il a été obtenu 41 lignées transgéniques dont 18 ont un transgène unique et intègre.

## 2) Evaluation de la tolérance des plantes transgéniques au déficit hydrique

Des plantes de première génération (croisement du transformant primaire avec la lignée récurrente A188) sont évaluées sur une plate-forme de phénotypage. Ces plantes transgéniques sont donc hémizygotes pour le transgène (caractère dominant de la transformation génétique). Les témoins (« RRS » et « RCP) utilisés dans l'expérimentation correspondent aux ségrégants sauvages issus de ce même croisement.

### 2.1 Compartiment de culture

Les plantes étudiées sont cultivées en phytotron. Ce dernier, d'une surface de 30 m<sup>2</sup> dispose de deux chambres de culture indépendantes. Dans ces chambres l'éclairage, la température et l'hygrométrie sont régulés (voir paragraphe 2.2. ci-dessous)

Les semis sont réalisés dans des terrines de dimensions 44 x 28,5 x 7 cm (H x l x L). Cinq géotypes sont semés par terrine à raison de dix graines par géotype. Cinq plantes seulement par géotype sont utilisées pour la cinétique de dessèchement.

### 2.2 Conditions de culture

Au sein du compartiment de culture la température, l'humidité et l'éclairage sont régulés.

Les conditions appliquées sont les suivantes :

*Photopériode :*

- Jour durant 16h (6h à 22h) avec complément photosynthétique (lampe à sodium 400W) lorsque le rayonnement extérieur est inférieur à 100W/m<sup>2</sup>.

- Nuit durant 8h (22h à 6h).

*Thermopériode :* 24°C / 20°C.

Le respect de ces conditions est assuré par un chauffage lorsque la température est inférieure à 20°C la nuit ou 24°C le jour, lorsque la température dépasse 25°C.

*Humidité :* 75% d'humidité relative régulée par brumisation nocturne.

Ces différentes conditions assurent une croissance optimale du maïs.

### 2.3 Mesure de la cinétique de dessèchement

*Pertinence du caractère mesuré :*

Le comportement des plantes vis-à-vis de la transpiration est étudié grâce au suivi en continu de la baisse de la teneur en eau relative (RWC : Relative Water Content) de plantules à un stade jeune (4 feuilles visibles). L'objectif est d'étudier la réponse en terme de contrôle stomatique des plantes lors d'un arrêt brutal de l'alimentation en eau.

Un contrôle stomatique très rapide à l'apparition d'un déficit hydrique permet d'économiser l'eau disponible mais limite la capacité d'assimilation du CO<sub>2</sub> donc le potentiel de production de la plante. En revanche, une fermeture assez tardive des stomates permet le maintien de l'activité photosynthétique de la plante assurant le maintien du potentiel de production au risque de se dessécher plus rapidement (Khalifaoui, 1991).

*Méthode :*

Les mesures sont réalisées sur des plantules T1 entières au stade 3-4 feuilles visibles. Les plantes utilisées au cours de cette mesure sont des plantes issues d'un semis en excès par rapport aux besoins de la plate-forme (3 graines semées par pot). Les effectifs pour la mesure de dessèchement sont de 5 plantes par évènement de transformation et témoins sauvages.

Les plantes sont coupées au niveau du collet, immergées pendant 24 heures à 4°C à l'obscurité (pour saturer les cellules en eau) puis placées dans une enceinte climatique lumineuse régulée à 30°C.

Un suivi du poids des plantules est alors réalisé selon le calendrier détaillé dans le Tableau I ci-dessous :

Tableau I : Calendrier des pesées des plantules conditionnées à 30°C en pleine lumière. Le poids à H0 correspond au poids à pleine turgescence. En fin de jour 3, les plantules sont placées dans une étuve à 80°C pendant 24h00 afin d'obtenir par une dernière pesée la valeur de poids sec.

Jour	Durée	
1	H0	← Poids pleine turgescence ( $P_{Turg}$ )
1	H0+2	← Poids à l'instant t ( $P_t$ )
1	H0+6	
1	H0+8	
4	H0+96	← Poids sec ( $P_s$ )

A l'instant t, la teneur en eau relative des plantes est ensuite calculée selon la formule mathématique suivante :  $(P_t - P_s) / (P_{Turg} - P_s) \times 100$ .

## REVENDEICATIONS

1) Procédé pour augmenter la tolérance d'une plante au déficit hydrique, caractérisé en ce que l'on surexprime dans ladite plante une protéine TE de type FatA possédant au moins 60% d'identité ou au moins 70% de similarité avec la séquence SEQ ID NO: 1.

2) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que protéine TE de type FatA comprend les acides aminés conservés situés aux positions 70, 73-74, 76, 78, 80-82, 84-87, 89, 91-92, 94-97, 99-103, 105-114, 116, 118, 120, 123-132, 135-136, 138, 140-144, 249, 146-157, 159-168, 171, 174-180, 182-183, 187-189, 191-197, 200-202, 204-208, 210, 212, 214-217, 222-223, 226-235, 237-239, 241-242, 244, 246, 249, 251, 254-255, 257-283, 285, 287-291, 294-303, 305-306, 308-312, 323-325, 338-340, 342-343, 348, 350, 352-354, 356, 358-359 et 360 de ladite séquence SEQ ID NO : 1 lorsqu'elle est alignée avec ladite séquence SEQ ID NO : 1.

3) Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que ladite protéine TE de type FatA est issue d'une plante monocotylédone, et possède au moins 79% d'identité, ou au moins 79% de similarité avec la séquence SEQ ID NO: 1, et comprend les acides aminés conservés situés aux positions 1-4, 8-10, 15, 19, 46, 51, 69-74, 76-87, 89-92, 94-116, 118-121, 123-133, 135-136, 138-168, 170-171, 174-180, 182-184, 187-189, 191-197, 200-202, 204-212, 214-219, 221-224, 226-239, 241-242, 244, 246, 249, 251-303, 305-312, 315, 317-318, 323-325, 330-331, 337-345, 348, 350, 352-359, 360-361 et 363 de ladite séquence SEQ ID NO : 1 lorsqu'elle est alignée avec ladite séquence SEQ ID NO : 1.

4) Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que ladite protéine TE de type FatA est issue d'une plante dicotylédone, et comprend les acides aminés conservés situés aux positions 24, 55, 61, 70, 73-74, 76, 78, 80-82, 84-87, 89, 91-92, 94-97, 99-103, 105-114, 116-118, 120, 122-132, 134-138, 140-144, 146-157, 159-168, 171, 173-183, 186-189, 191-202, 204-208, 210, 212, 214-217, 222-223, 226-235, 237-242, 244, 246-251, 254-255, 257-283, 285, 287-291, 294-303, 305-306, 308-312, 323-325, 328, 338-340, 342-343, 348, 350-354, 356 et 358-360 de ladite séquence SEQ ID NO : 1 lorsqu'elle est alignée avec ladite séquence SEQ ID NO : 1.

5) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que ladite protéine TE de type FatA est fonctionnelle.

6) Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que ladite protéine TE de type FatA est choisie dans le groupe constitué parmi les séquences d'acides aminés SEQ ID NO : 1 à SEQ ID NO : 8.

7) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que ladite plante est choisie parmi les plantes potagères, les plantes ornementales, les arbres fruitiers, les plantes de grandes cultures et les plantes de cultures industrielles.

8) Utilisation d'un polynucléotide codant une protéine TE de type FatA telle que définie à l'une quelconque des revendications 1 à 6, pour induire chez une plante une tolérance à un stress hydrique.



## ABREGE

La présente invention concerne un procédé pour augmenter la tolérance d'une plante au déficit hydrique, lequel procédé comprend la surexpression dans ladite plante d'une protéine TE (acyl-ACP thioestérase) de type Fata.

	1	50
<i>B. distachyon</i>	(1) MLRCHTPPQCRPAPLGRRG----LPRAAAEVVRC AARGSRRLP SLIVASS	
<i>T. aestivum</i>	(1) MLRCHIPPQCGPAPLGRRLPRAVR-CAARAPSRGAVAAAAAAQAQVAAA	
<i>O. sativa</i>	(1) MLRCHTPPQCR---LGAGGAGAGVL-LRQRSEVAVRCRAQQVSGVEAAAG	
<i>S. bicolor</i> FatA1	(1) MLRCPTQPQCGRAPLRHHGRRESPPSAAPGVVVR CARGAPQVSR IEAASP	
<i>S. bicolor</i> FatA2	(1) MLRCHTPPQCGRAPLRHHGRRESPPAAAPGVVVR CARGAPQVPG IEAASP	
<i>Z. mays</i>	(1) MLRCHAPPQCGRAPLRHHGRWESSP--APGVVVRCTR GAPQVSG IEAASP	
a a conservés	(1) MLRC PQC L G	A
	51	100
<i>B. distachyon</i>	(47) SSAAEAVTCG-----ESLAERLRMGSLLEDGLSYKESFIVRCYEVGI	
<i>T. aestivum</i>	(50) AVATAEG-----REGAERPGLAERLRMGSLLEDGLSYKESFIVRCYEVGI	
<i>O. sativa</i>	(47) TPAARAA-----VEGGERTSLAERLRLGSLLEDGLSYKESFIVRCYEVGI	
<i>S. bicolor</i> FatA1	(51) VAATTA AAAKAERGDARPSLAERLRLGSLLEDGLSYKEIFIVRSYEVGI	
<i>S. bicolor</i> FatA2	(51) GHAAATA--AKAEGGDARPSLAERLRLGSLLEDGLSYKESFIVRCYEVGI	
<i>Z. mays</i>	(49) DHAAATAVA AKAEGGDARPSLAERLRLGSLLEDGLSYKESFIVRCYEVGI	
a a conservés	(51) A LAERLR G LLEDGLSYKE FIVR YEYVGI	
	101	150
<i>B. distachyon</i>	(89) NKTATVETIANLLQEVGCNHAQSVGFSTDFATTTTMR LGLI WV TNRMH	
<i>T. aestivum</i>	(95) NKTATVETIANLLQEVGCNHAQSVGFSTDFATTTTMR LGLI WV TNRMH	
<i>O. sativa</i>	(92) NKTATVETIANLLQEVGCNHAQSVGFSTDFATTTTMR KLGLI WV TNRMH	
<i>S. bicolor</i> FatA1	(101) NKTATVETIANLLQEVGC SHAQSLGFSTDFATTTSMR KLGLI WV TNRMH	
<i>S. bicolor</i> FatA2	(99) NKTATVETIANLLQEVGCNHAQSVGFSTDFATTTTMR KLGLI WV TNRMH	
<i>Z. mays</i>	(99) NKTATVETIANLLQEVGCNHAQSVGFSTDFATTTTMR KLGLI WV TNRMH	
a a conservés	(101) NKTATVETIANLLQEVGC HAQS GFSTDFATTT MR LGLI WV TNRMH	
	151	200
<i>B. distachyon</i>	(139) IEIYKYPAWGDVVEIETWCQADGRIGTRRDWIIKDLASGEVIGRATSKWL	
<i>T. aestivum</i>	(145) IEIYKYPAWGDVVEIETWCQADGKIGTRRDWILKDLANGEVIGRATSKWV	
<i>O. sativa</i>	(142) IEIYKYPAWGDVVEIETWCQEDGKIGTRRDWILKDLANGEVIGRATSKWV	
<i>S. bicolor</i> FatA1	(151) IEIYKYPAWGDVVEIETWCQADGRMGTRRDWILKDLANGEVIGRATSKWV	
<i>S. bicolor</i> FatA2	(149) IEIYKYPAWGDVVEIETWCQEDGRIGTRRDWILKDLANGEVIGRATSKWV	
<i>Z. mays</i>	(149) IEIYKYPAWGDVVEIETWCQEDGKIGTRRDWILKDLCTGEVTGRATSKWV	
a a conservés	(151) IEIYKYPAWGDVVEIETWCQ DG GTRRDWI KDL GEV GRATSKW	
	201	250
<i>B. distachyon</i>	(189) MMNQSTRRLQRVSDVEVRDEVFVHCPKTPRLAFPEENNGSLKNIPILTDPA	
<i>T. aestivum</i>	(195) MMNQNTRRLQRVSDVEVRDEVFIHCPKSPRLAFPEENNGSLKKIPVLTDPA	
<i>O. sativa</i>	(192) MMNQNTRRLQRVSDDVRDEVFVHCPKTPRLAFPEENNGSLKKIPVLTDPA	
<i>S. bicolor</i> FatA1	(201) TMNQNTRRLQRVSDVEVRDEVFIHCPKTPRLAFPEENNGSLKKIPNLSDDS	
<i>S. bicolor</i> FatA2	(199) MMNQNTRRLQRVSDDVRDEVFIHCPKTPRLAFPEENNGSLKKIPNLSDDPA	
<i>Z. mays</i>	(199) MMNQNTRRLQRVSDDVRDEVFIHCPKTPRLAFPEENNGSLKKIPNLSDDPA	
a a conservés	(201) MNQ TRRLQRVSD VRDEVF HCPK PRLAFPEENNGSLK IP L D	

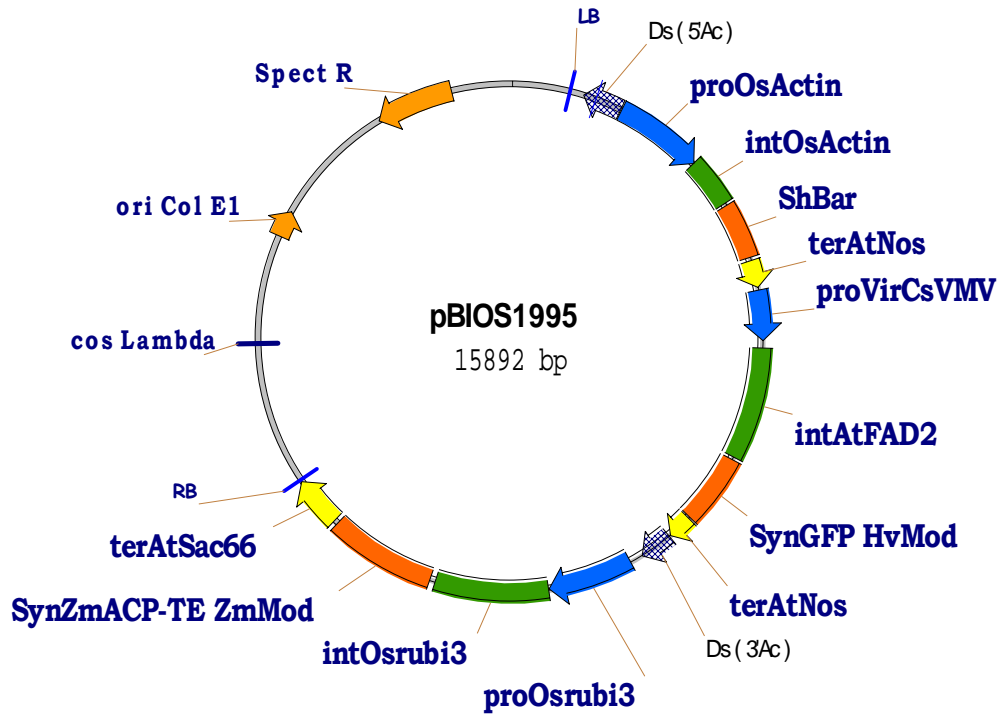
Figure 1A

	251		300
<i>B. distachyon</i>	(239) QYSRLGLVPRRADLDMNQHVNNVTYIGWVLESIPQDIIDTHELQTITLDY		
<i>T. aestivum</i>	(245) QHSRLGLVPRRADLDMNQHVNNVTYIGWVLESIPQDIIDTHELQTITLDY		
<i>O. sativa</i>	(242) QHSRLGLVPRRADLDMNQHVNNVTYIGWVLESIPQDIIDTHELQTITLDY		
<i>S. bicolor</i> FatA1	(251) QYSRLGLVPRRADLDMNQHVNNVTYIGWVLESIPQDIIDTHELQTITLDY		
<i>S. bicolor</i> FatA2	(249) QYSRLGLVPRRADLDMNQHVNNVTYIGWVLESIPQDIIDTHELQTITLDY		
<i>Z. mays</i>	(249) QYSRLGLVPRRADLDMNQHVNNVTYIGWVLESIPQDIIDTHELQTITLDY		
a a conservés	(251) Q SRLGLVPRRADLDMNQHVNNVTYIGWVLESIPQDIIDTHELQTITLDY		
	301		350
<i>B. distachyon</i>	(289) RRECQHDDIVDSLTYVEEGEAKSSNGSAF-AAPHPQECCQFLHCLRFAGG		
<i>T. aestivum</i>	(295) RRECQHDDIVDSLTYIE-GEEINSNGSLF-SAPHPEEQRQFLHCLRFAGA		
<i>O. sativa</i>	(292) RRECQHDDIVDSLTYIEEGEEKSSNGSAF-AAPHPPEEQRQFLHCLRFAGN		
<i>S. bicolor</i> FatA1	(301) RRECQYDDIVDSLTLNVEEGEEKNMNGSAS-AAPHKEERQQFLHCLRFAAN		
<i>S. bicolor</i> FatA2	(299) RRECQHDDIVDSLTYIEEGEEKSMNGSAS-AAPHKEERQQFLHCLRFAAN		
<i>Z. mays</i>	(299) RRECQHDDIVDSLTYVEEGEERSMNGSAS-SVPHTEQRRQFLHCLRFAAN		
a a conservés	(301) RRECQ DDIVSLT E GE NGS PH QFLHCLRFA		
	351	368	% identité %similarité
<i>B. distachyon</i>	(338) GGELNRGRTVWR-KLSR-		78,9 85,2
<i>T. aestivum</i>	(343) GDEINRGRTVWR-KLAR-		81,4 84,7
<i>O. sativa</i>	(341) GNEINRGRTVWR-KLAR-		84,2 87
<i>S. bicolor</i> FatA1	(350) GAEINRGRTVWRKRLAR-		88,5 92,1
<i>S. bicolor</i> FatA2	(348) GDEINRGRTVWR-KLAR-		94,2 95,9
<i>Z. mays</i>	(348) GDEINRGRTVWR-KLAR-		
a a conservés	(351) G E NRGRTVWR KL R		

Figure 1B



A



B

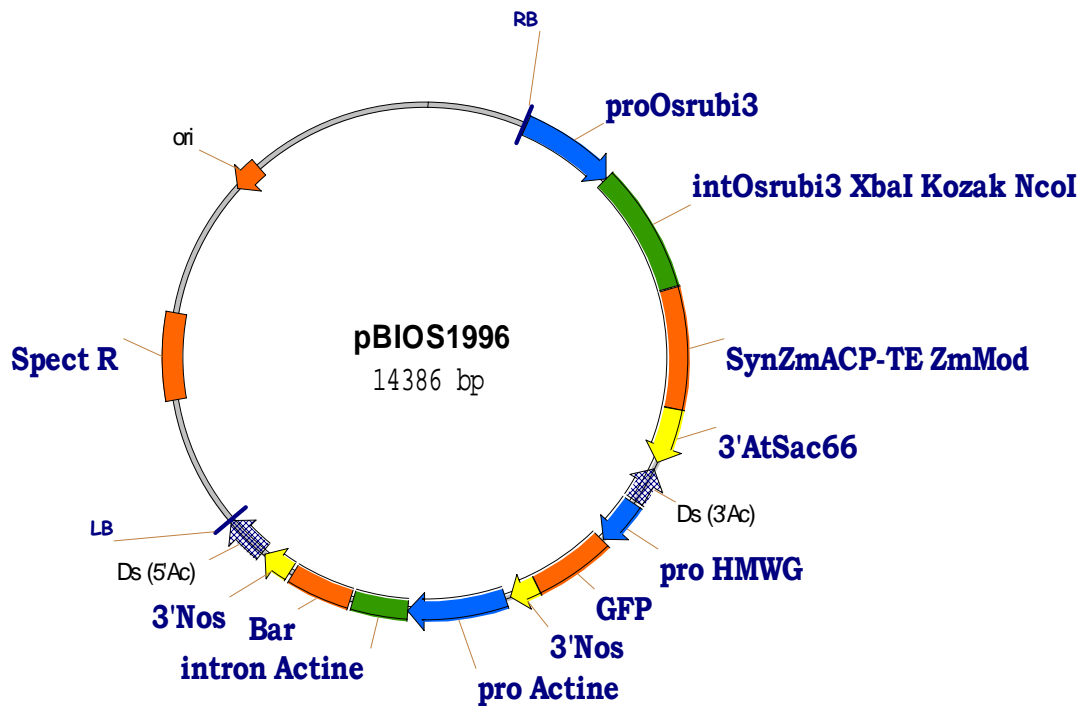
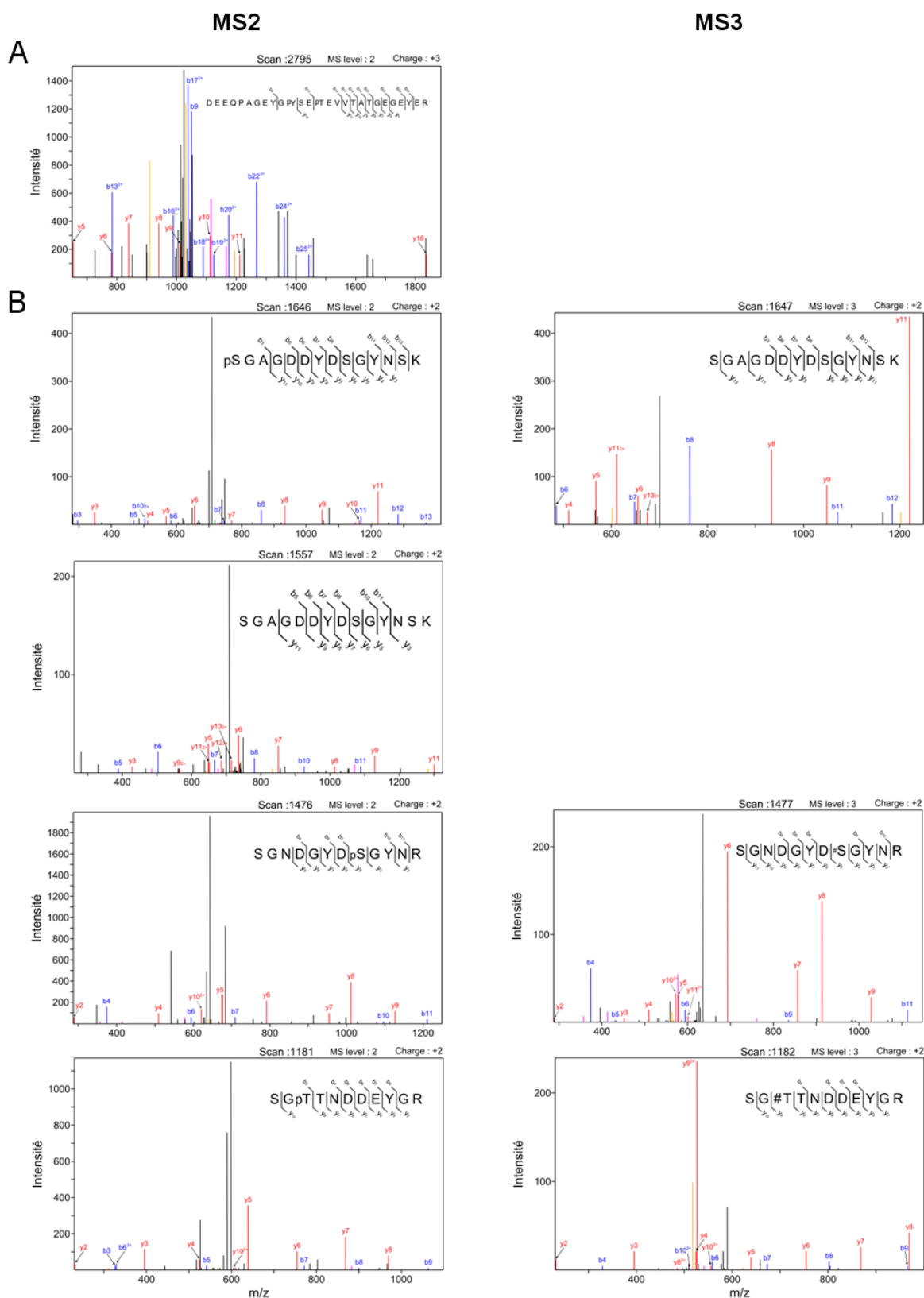


Figure 3

**ANNEXE 3**

**IDENTIFICATION DES SITES DE  
PHOSPHORYLATION DES PROTEINES ZMASR2 ET  
ZMASR3**



**Annexe 3.** Spectres LC-MS/MS ayant permis l'identification des sites de phosphorylation pour les protéines ZmASR2 (A) et ZmASR3 (B) dans un pool d'extrait protéiques de feuilles 4 de plantes cultivées en condition de déficit hydrique. Pour l'ensemble des spectres, les couleurs correspondent aux types d'ions : b en bleu, y en rouge, une perte de -18 (H<sub>2</sub>O) ou de -17 (NH<sub>3</sub>) en rose pour les ions b et en orange pour les ions y.

## Résumé

La recherche de maïs plus tolérants au déficit hydrique est un enjeu fondamental pour la production agricole dans les prochaines décennies. Le but de ce travail a été d'identifier et de caractériser des gènes impliqués dans la variation de caractères complexes affectés par le déficit hydrique chez le maïs.

Nous avons tout d'abord identifié des transcrits et des protéines, dont la teneur variait entre deux mélanges de lignées recombinantes différant pour une région chromosomique influençant la croissance foliaire et la protandrie en condition de déficit hydrique. Parmi les huit gènes candidats cartographiés au niveau de la région d'intérêt, se trouvait le facteur de transcription *ZmMYB31* impliqué dans la biosynthèse de la lignine. Nous avons montré que son expression était corrélée à celle de deux de ses cibles, à la teneur en lignine et à l'expression du gène *ZmFatA* impliqué dans la biosynthèse des acides gras, suggérant un rôle régulateur de la protéine *ZmMYB31* via la synthèse de lignine et de dérivés lipidiques.

Dans un second volet, nous avons montré que la sur-expression du gène candidat *ZmASR1* (*ZmASR1*-OE) chez le maïs maintenait le rendement en condition de déficit hydrique. Des analyses transcriptomiques et protéomiques nous ont permis d'identifier 25 cibles de la protéine *ZmASR1*, dont sept gènes impliqués dans la biosynthèse des acides aminés branchés. Nous avons également montré qu'il existait une étroite corrélation entre 13 métabolites diminués par *ZmASR1*-OE, six étant connus pour être négativement corrélés à la biomasse. Enfin, des résidus phosphorylés ont été identifiés chez les protéines *ZmASR1*, *ZmASR2* et *ZmASR3*, suggérant leur régulation par phosphorylation.

**Mots clés :** maïs, déficit hydrique, gènes candidats, *ZmMYB31*, *ZmASR1*, protéomique, phosphorylation

---

## Abstract

Maize is particularly sensitive to water deficit at reproductive stages. As such, identification of factors that confer tolerance to water deficit would pave the way for increasing agricultural productivity. The aim of this work was to identify and make up the functional characterization of candidate genes for water deficit tolerance in maize.

Firstly, transcriptomic and proteomic analyses of bulked recombinant inbred lines revealed eight differentially expressed genes colocalizing with a chromosomal region exhibiting two QTLs for leaf growth and anthesis-silking interval sensitivities to water deficit. Among them, we identified the transcription factor *ZmMYB31* gene involved in the control of lignin biosynthesis. The expression of *ZmMYB31* was correlated with that of its targets genes *ZmCOMT* and *ZmFAD9*, as well as *ZmFatA* involved in fatty acid biosynthesis. Changes in lignin and fatty acid content allowed us to hypothesize a regulatory role of *ZmMYB31* via lignin and fatty acid-derived metabolites.

Secondly, we showed that transgenic maize plants overexpressing the candidate gene *ZmASR1* (*ZmASR1*-OE) maintained kernel yield under water deficit condition in the field. Transcriptomic and proteomic analyses of *ZmASR1*-OE leaves allowed us to identify 25 direct or indirect target genes of *ZmASR1*, in particular seven genes involved in branched-chain amino acid (BCAA) biosynthesis. We also showed a tight correlation between the level of 13 decreased metabolites in *ZmASR1*-OE leaves, 6 of which being previously shown to be negatively correlated to biomass. Phosphoresidues were also found in *ZmASR1*, *ZmASR2* and *ZmASR3*, suggesting that these proteins are regulated by phosphorylation.

**Keywords:** maize, water deficit, candidate genes, *ZmMYB31*, *ZmASR1*, proteomics, phosphorylation



## Résumé

La recherche de maïs plus tolérants au déficit hydrique est un enjeu fondamental pour la production agricole dans les prochaines décennies. Le but de ce travail a été d'identifier et de caractériser des gènes impliqués dans la variation de caractères complexes affectés par le déficit hydrique chez le maïs.

Nous avons tout d'abord identifié des transcrits et des protéines, dont la teneur variait entre deux mélanges de lignées recombinantes différant pour une région chromosomique influençant la croissance foliaire et la protandrie en condition de déficit hydrique. Parmi les huit gènes candidats cartographiés au niveau de la région d'intérêt, se trouvait le facteur de transcription *ZmMYB31* impliqué dans la biosynthèse de la lignine. Nous avons montré que son expression était corrélée à celle de deux de ses cibles, à la teneur en lignine et à l'expression du gène *ZmFatA* impliqué dans la biosynthèse des acides gras, suggérant un rôle régulateur de la protéine *ZmMYB31* via la synthèse de lignine et de dérivés lipidiques.

Dans un second volet, nous avons montré que la sur-expression du gène candidat *ZmASR1* (*ZmASR1*-OE) chez le maïs maintenait le rendement en condition de déficit hydrique. Des analyses transcriptomiques et protéomiques nous ont permis d'identifier 25 cibles de la protéine *ZmASR1*, dont sept gènes impliqués dans la biosynthèse des acides aminés branchés. Nous avons également montré qu'il existait une étroite corrélation entre 13 métabolites diminués par *ZmASR1*-OE, six étant connus pour être négativement corrélés à la biomasse. Enfin, des résidus phosphorylés ont été identifiés chez les protéines *ZmASR1*, *ZmASR2* et *ZmASR3*, suggérant leur régulation par phosphorylation.

**Mots clés :** maïs, déficit hydrique, gènes candidats, *ZmMYB31*, *ZmASR1*, protéomique, phosphorylation

---

## Abstract

Maize is particularly sensitive to water deficit at reproductive stages. As such, identification of factors that confer tolerance to water deficit would pave the way for increasing agricultural productivity. The aim of this work was to identify and make up the functional characterization of candidate genes for water deficit tolerance in maize.

Firstly, transcriptomic and proteomic analyses of bulked recombinant inbred lines revealed eight differentially expressed genes colocalizing with a chromosomal region exhibiting two QTLs for leaf growth and anthesis-silking interval sensitivities to water deficit. Among them, we identified the transcription factor *ZmMYB31* gene involved in the control of lignin biosynthesis. The expression of *ZmMYB31* was correlated with that of its targets genes *ZmCOMT* and *ZmFAD9*, as well as *ZmFatA* involved in fatty acid biosynthesis. Changes in lignin and fatty acid content allowed us to hypothesize a regulatory role of *ZmMYB31* via lignin and fatty acid-derived metabolites.

Secondly, we showed that transgenic maize plants overexpressing the candidate gene *ZmASR1* (*ZmASR1*-OE) maintained kernel yield under water deficit condition in the field. Transcriptomic and proteomic analyses of *ZmASR1*-OE leaves allowed us to identify 25 direct or indirect target genes of *ZmASR1*, in particular seven genes involved in branched-chain amino acid (BCAA) biosynthesis. We also showed a tight correlation between the level of 13 decreased metabolites in *ZmASR1*-OE leaves, 6 of which being previously shown to be negatively correlated to biomass. Phosphoresidues were also found in *ZmASR1*, *ZmASR2* and *ZmASR3*, suggesting that these proteins are regulated by phosphorylation.

**Keywords:** maize, water deficit, candidate genes, *ZmMYB31*, *ZmASR1*, proteomics, phosphorylation