



HAL
open science

Identification et caractérisation de facteurs de transcription appartenant à la famille des régulateurs de réponse de type B, impliqués dans la réponse à la sécheresse chez le peuplier

Inès Djeghdir

► To cite this version:

Inès Djeghdir. Identification et caractérisation de facteurs de transcription appartenant à la famille des régulateurs de réponse de type B, impliqués dans la réponse à la sécheresse chez le peuplier. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université d'Orléans, 2016. Français. NNT : 2016ORLE2056 . tel-01553123

HAL Id: tel-01553123

<https://theses.hal.science/tel-01553123>

Submitted on 3 Jul 2017

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.

ÉCOLE DOCTORALE SANTE, SCIENCES BIOLOGIQUES ET CHIMIE DU VIVANT

UPRES EA 1207 Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures

INRA USC 1328 Arbres et Réponses aux Contraintes Hydriques et Environnementales

EA 2106 Laboratoire Biomolécules et Biotechnologies Végétales

THÈSE présentée par :
Inès DJEGHDIR

Soutenue le : **15 décembre 2016**

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

Discipline/ Spécialité : **Biologies Moléculaire et Cellulaire Végétales**

Identification et caractérisation de facteurs de transcription appartenant à la famille des régulateurs de réponse de type B, impliqués dans la réponse à la sécheresse chez le peuplier

THÈSE dirigée par :

Sabine CARPIN

Maître de conférences (HDR), Université d'Orléans

THÈSE co-encadrée par :

Audrey OUDIN

Maître de conférences, Université de Tours

RAPPORTEURS :

Azeddine DROUICH

Professeur, Université de Rouen

Jean-Philippe GALAUD

Professeur, Université de Toulouse III

JURY :

Mme Rossitza ATANASSOVA

Professeur, Université de Poitiers

Mme Sabine CARPIN

Maître de conférences (HDR), Université d'Orléans

M. Azeddine DRIOUICH

Professeur, Université de Rouen

M. Jean-Philippe GALAUD

Professeur, Université de Toulouse III

M. Alain LEGRAND

Professeur, Université d'Orléans,

Mme Audrey OUDIN

Maître de conférences, Université de Tours

ÉCOLE DOCTORALE SANTE, SCIENCES BIOLOGIQUES ET CHIMIE DU VIVANT

UPRES EA 1207 Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures

INRA USC 1328 Arbres et Réponses aux Contraintes Hydriques et Environnementales

EA 2106 Laboratoire Biomolécules et Biotechnologies Végétales

THÈSE présentée par :

Inès DJEGHDIR

Soutenue le : **15 décembre 2016**

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

Discipline/ Spécialité : **Biologies Moléculaire et Cellulaire Végétales**

Identification et caractérisation de facteurs de transcription appartenant à la famille des régulateurs de réponse de type B, impliqués dans la réponse à la sécheresse chez le peuplier

THÈSE dirigée par :

Sabine CARPIN

Maître de conférences (HDR), Université d'Orléans

THÈSE co-encadrée par :

Audrey OUDIN

Maître de conférences, Université de Tours

RAPPORTEURS :

Azeddine DROUICH

Professeur, Université de Rouen

Jean-Philippe GALAUD

Professeur, Université de Toulouse III

JURY :

Mme Rossitza ATANASSOVA

Professeur, Université de Poitiers

Mme Sabine CARPIN

Maître de conférences (HDR), Université d'Orléans

M. Azeddine DRIOUICH

Professeur, Université de Rouen

M. Jean-Philippe GALAUD

Professeur, Université de Toulouse III

M. Alain LEGRAND

Professeur, Université d'Orléans,

Mme Audrey OUDIN

Maître de conférences, Université de Tours

REMERCIEMENTS

C'était il y a trois ans et demi. Déjà trois ans et demi que cette aventure à la découverte du phosphorelais multiple du peuplier a débutée. Je me revois encore poser mes affaires comme si c'était hier et me voici sur le départ pour de nouvelles aventures... De cette période, je ressors grandie et pleine de souvenirs (les bons comme les moins bons...). Et sans toutes les personnes que j'ai côtoyées, cette thèse n'aurait pas été la même....

Je tiens à tout d'abord à remercier Messieurs les Professeurs **Azeddine DRIOUICH** et **Jean-Philippe GALAUD** qui ont accepté d'être rapporteurs de ce travail de thèse. Merci également à Monsieur le professeur **Alain LEGRAND**, et Madame la Professeure **Rossitza ATANASSOVA** d'avoir respectivement accepté d'être président et membres de mon jury.

Merci également à ma directrice de thèse, **Sabine CARPIN**, et à ma co-encadrante de thèse, **Audrey OUDIN** pour ces 3 années et demie en votre compagnie. Sur un plan personnel, merci Sabine pour les discussions que nous avons eu et qui m'ont aidée, j'en suis sûre, à arriver au bout de cette thèse la tête haute. Merci également pour ta bonne humeur qui a pu faire un peu contraste avec mes « petites périodes de pessimisme ». D'un point de vue professionnel, je vous remercie toutes les deux pour vos nombreuses idées innovantes (et complémentaires) lorsque la situation semblait un peu compliquée et pour m'avoir appris à être indépendante. Merci Audrey pour avoir toujours veillé à mon bon accueil au sein du BBV.

Merci à l'ensemble des membres du laboratoire LBLGC

Merci à **Franck BRIGNOLAS** pour avoir veillé d'un œil bienveillant sur mon travail malgré ses responsabilités de directeur du laboratoire de l'époque et d'avoir fait son possible pour que je me sente bien accueillie au laboratoire depuis mon arrivée en stage de Master II ce qui a contribué à mon envie de poursuivre en thèse. Je remercie également **Steeve THANY** qui a toujours été un directeur de laboratoire ouvert et attentif. Merci également pour l'immense opportunité de faire mon stage au Canada.

Merci à **Valérie ALTEMAYER** pour m'avoir permis de réaliser mes deux années de monitorat dans de bonnes conditions et d'avoir pris de mes nouvelles lors de la période critique de la troisième année. Un grand merci à **Daniel AUGUIN** pour les nombreuses madeleines chocolatées accompagnées de son petit café et parfois de quelques chocolats (ils étaient fondus ou périmés au final ?). Il y a certaines choses qui me laissent encore perplexe (le Falcon de désinfectant en fait partie bien sûr...) mais parmi ces nombreuses heures en ta compagnie (dans la faille spatiotemporelle), la plupart furent très enrichissantes ! Merci donc pour tes encouragements et surtout pour avoir essayé de nous expliquer (en vain quand même...) un milliard de fois ce qu'était une focale et pourquoi cela était très utile (même si on a forcément l'air un peu... différent ?). Je remercie **Stéphanie BANKHEAD** pour m'avoir gentiment proposé de m'héberger en cas de besoin lors de mes séjours à Tours et pour avoir pris des nouvelles lors de ma rédaction. Merci à **Christiane DEPIERREUX** pour avoir toujours veillé à ce que les TP de 1^{ère} année de Licence se passent bien et pour m'avoir fait partager une partie de son savoir en culture *in vitro*. Merci à **Régis FICHOT** pour ses conseils avisés de dernière minute. Merci à **Daniel HAGEGE** pour m'avoir divulgué son secret concernant le meilleur chemin pour aller à Chartres. Je remercie **François HERICOURT** pour ses conseils variés et pour les (trèèèèès) nombreuses missions « taxi-séquençage » qu'il a toujours effectué avec le sourire... Merci à **Frédéric LAMBLIN** pour sa bonne humeur, ses nombreuses propositions scientifiques et son implication concernant l'aspect culture *in vitro* de ma thèse (je te confie toutes mes bébés-lignées !). Merci également pour tout le travail que tu as accompli afin de faire de la salle de culture *in vitro* un endroit qui soit le plus agréable possible... Merci à **Stéphane MAURY** pour sa bonne humeur communicative du café du matin

et les nombreux conseils de fin de thèse. Merci à **Domenico MORABITO** pour ses horoscopes du midi (Alors... Béyer...). Un merci un peu particulier, attribué à **Aurélien SALLE** et ses encouragements « de champion » qui ont su faire écho en moi (même si je ne comprends toujours pas bien comment). Tu vois j'ai fini par la faire cette thèse...

Merci aux autres membres du laboratoire, **Mathilde BAUDE**, **Sylvain BOURGERIE**, **Alain DELAUNAY**, **Muriel FEINARD-DURANCEAU**, **Christophe HANO**, **Eric LAINE**, **Florie MIARD** et **Cécile VINCENT-BARBAROUX**.

Pour la suite de ces remerciements, je commencerai par le plus respectable, j'ai nommé **Richard BOUCEFFA** (Richou le Fifou, Mique, ...) ! La petite Piness s'en va, mais sache qu'elle ne pourra pas aller bien loin (toi-même tu sais que ça pèse trop lourd pour que je bouge !). Merci d'avoir été la soupape essentielle à cette fin de thèse (ou peut être d'avoir fourni l'ampoule qui m'a permis de m'illuminer de toutes les couleurs, j'hésite encore...). Ces petits (... !) moments à discuter de la focale me suivront encore longtemps je pense. Merci à **Françoise CHEFDOR** et un grand merci à **Laurent JEAN-ALPHONSE** (dit Laurent 1^{er}) pour sa bonne humeur constante et d'avoir été pendant 2 ans et demi un secrétaire au top. Mes remerciements vont également à **Mélanie LARCHER**, qui m'aura été d'une aide non négligeable durant mon séjour au Canada ou bien quand j'ai failli me transformer en mille pattes tellement je prévoyais de manip... Merci également à **Laurent LEGUAY** (dit Laurent 2nd) pour toutes les petites (grandes, bon OK gigantesques...) discussions que nous avons eu à propos de tout et de rien et qui m'ont quand même permis de me réconcilier (un peu...) avec la paperasse (j'y arriverai un jour à faire un papier correct du premier coup !). Merci pour le « bonbon-réconfort » de la fin ! Merci à **Isabelle LE JAN** pour ses discussions végétales entre deux TP de première année de Licence et pour la préparation toujours parfaite des salles dont j'ai eu besoin. Merci également pour m'avoir redonné un peu de pep's (ou de pep comme le dit si bien le journal...) quand le besoin s'en est fait sentir. Je te confie ma petite Laure, je sais que tu en prendras bien soin ! Je remercie **Carine MARTIN** pour tout ce qu'elle a fait pour moi. Tes nombreux cafés, tes carambar caramel de fin de parcours, ton avis pertinent sur des sujets très variés ainsi que ton oreille attentive lorsque le besoin s'en est fait sentir font de toi une personne avec qui j'ai vraiment apprécié de passer du temps. Tes nombreuses expressions toutes plus marrantes les unes que les autres me manqueront... Merci à **Xavier PINEAU** (ou l'homme qui boit le plus de café du campus d'Orléans... et qui a presque réussi à me convertir !). Tu as été d'une grande aide (et de très sage conseil) lorsqu'il a été question d'entretenir (ok, ok, de faire survivre en fait...) ma quantité phénoménale de plantes dans l'open-space. Tu m'as vraiment appris beaucoup, dans de nombreux domaines au détour de conversations passionnantes et passionnées et c'est avec plaisir et une entière confiance que je te confie les deux tortues de ma grand-mère (cela me fera une excellente excuse pour repasser dans le coin !).

Merci à l'ensemble de la team des doctorant-es et post-doctorant-es (ceux qui ont déjà pris leur envol comme ceux qui débutent ou continuent l'aventure). Je ne peux évidemment pas écrire ce paragraphe sans parler de celle qui a vraiment été essentielle en cette dernière année de thèse : **Laure BOUYER**. Tu sais déjà beaucoup de choses mais je ne me lasse pas d'être fière de notre amitié alors tu auras le droit à ton (gros) paragraphe ici. Tu es une personne en or : gentille, souriante, attentive, discrète et surtout tu aimes les bestioles autant que moi. Une spéciale dédicace au chaton a qui nous avons pu donner une nouvelle vie ensemble (et avec Samuel bien sûr !). Merci à **Alison CARTEREAU** et **Anne-Laure LEGAC** et bon courage pour la suite. Un merci également à **Manhattan LEBRUN** pour les discussions matinales et surtout pour son aide précieuse lors de la chasse aux dernières coquilles. Bonne chance pour ce début de thèse à l'italienne. Merci à **Lucja MARKULIN** pour les discussions anti-stress que nous avons pu avoir avant chaque congrès (posters, présentations orales,...) ou séminaires de laboratoire. Je te souhaite le meilleur pour ta troisième année. Merci à **Lucie BERTHEAU** pour avoir contribué à ma décision de faire une thèse (malgré la période un peu délicate qu'est la fin de thèse dans laquelle j'ai débarquée lors de mon Master 2...). Tes nombreux conseils, ta patience, ta gentillesse et ton sens de l'humour ont su égayer mon stage de deuxième année de Master et mon début de thèse. Je te souhaite le meilleur pour la suite. Merci à **Sylvain CHAMAILLARD** pour ses encouragements lors de ma rédaction et tous ses conseils sur l'après-thèse, ce grand flou artistique... Merci également à **France DARDEAU**, exemple parfait de « zen en toutes circonstances » du laboratoire. Merci pour ta

présence lors de certains moments délicats de ma thèse. A biiiiiiig thanks for the « sunshine-girl » of the open-space, **Tonia LOMAGLIO**. You are one of the kindest people I met and I am really proud of our friendship. Even if you came back to Italy, I know we will find a solution to keep the contact. I hope the best for your (already great) scientific career. Je remercie **Nour HATTAB-HAMBLI** pour son sourire permanent, sa gentillesse et sa bonne humeur. Tes compliments m'ont vraiment fait du bien et saches que tu as décroché haut la main le titre de la personne avec les plus beaux yeux du laboratoire ! Merci également à **Safa MANNAI** et **Salma DJEBBI** pour avoir été des membres d'élite de l'open-space. Bon courage à vous les filles, et surtout le meilleur pour ta soutenance Safa !

Un grand merci également aux stagiaires du laboratoire qui ont su égayer mon quotidien, à la paillasse comme dans notre mythique open-space (AKA la serre, China Town, ...). Merci à **Baptise CHÊNE**, mon « petit » grand stagiaire. Avec toutes les « bato-stries » et les « stri-tonnets » que tu as réalisés, tu m'as été d'un grand secours. Et je suis sûre qu'aujourd'hui encore, tu regrettes mes deadlines de la mort. Bonne continuation ! Un merci particulier à **Floran GATHIGNOL** (Florent, Floren, Florians, Florent, Fleaurans... Tu y es presque Sabine !), je ne peux pas tout citer ici (trop grand nombre et surtout la décence.....) mais sache que je n'oublierai pas tous ces fous-rires aux larmes en salle de levure, en 137 ou bien à la fin dans ton « bureau de l'exil ». Je te souhaite plein de belles découvertes au Vietnam. J'en viens naturellement à **Carmelo MACRÌ** (AKA le mec le plus traître de la planète avec une tête d'innocent). Malgré mon sens inné de la langue italienne (pideza), j'aurai au moins appris un mot (à l'utilité certaine...) : Cippola. Merci d'avoir été le meilleur des complices pour jouer des tours à Aurianne. Je n'oublierai pas tes 54 pauses café et 109 pauses clopes (Aurianne t'a trahie ...) dans la journée. Merci également pour toutes ces discussions à propos de notre Sud, elles m'ont souvent apportées du soleil et beaucoup de courage ! Comment oublier également **Aurianne RONDEL** (AKA Eurianne, ou dans l'intimité « Patrick et Michel ») ? Avec toi également il faudrait l'ensemble des pages de cette thèse pour raconter toute l'histoire (à ma sauce bien évidemment...). Sache qu'en écrivant ces lignes (en ce dernier jour de ton stage), je ne peux m'empêcher de lever mon doigt à notre belle amitié (Laure ne te remercie pas !) et de te poser la fameuse question « Un p'tit cookie Patrick ? ». Et je ne pourrais pas finir sans cette belle chanson qui anima nos nombreuses sessions hottes en culture *in vitro* « Michel c'est le Brésil, il danse la samba, il va de ville en ville pour monter des fenêtres. MIIIIIIICHEEEEEEEEEEEEEEEEEEL c'est le Brésil, il va de ville en ville, pour monter des Velux ! » Je sais, ça ne rime pas encore mais j'y travaille. Merci de m'avoir « rendue de l'éclat » (oui, ce sont tes paroles, je t'écoute parfois) quand le besoin se faisait urgemment sentir. J'envie (ou je plains selon les jours...) tes futurs collègues... Merci à **Amandine QUEMENER** (AKA ma demi-stagiaire) pour ton sourire permanent et pour le bon restaurant italien que tu m'as fait connaître. Sache qu'Amande va toujours bien et que je l'emporterai avec moi !

Merci à l'ensemble du laboratoire BBV de Tours

Tout d'abord merci à **Nathalie GUIVARCH** pour m'avoir accueillie avec gentillesse au sein du laboratoire et d'avoir pris le temps de s'intéresser à mon travail malgré son emploi du temps. Merci à **Vincent COURDAVAULT** pour avoir pris le temps de s'intéresser à mon sujet de thèse et d'avoir fait son maximum pour pouvoir mettre la technique BiFC au service de cette thèse. Merci à **Gaëlle GLEVAREC** pour sa bonne humeur permanente et pour avoir mis son expertise de la technique RT-PCR en temps réel à mon service, dès que le besoin s'en faisait sentir.

Un grand merci à **Elsa ALLION**, **Nathalie BLANC**, **Célie MELIN**, **Emeline MARAIS** pour m'avoir accueillie à chaque fois avec gentillesse et bonne humeur. Merci à **Evelyne DANOS** pour avoir pris grand soin de nos cellules du peuplier. Enfin, merci à **Nathalie RICHE** pour toujours avoir facilité mon arrivée au laboratoire.

Et comme précédemment, la team des doctorant-es et post-doctorant-es est à remercier chaleureusement pour tous les bons moments passés ensembles. Merci à **Tatiana DEFOSSE**, **Dimitri DAUDU** (bon courage pour ta soutenance !!) et **Franziska LIESECKE**. Merci à **Cyrielle CORBIN**

(ancienne LBLGC !) pour ta gentillesse et tes nombreux conseils pour la rédaction. Merci à **Emilien FOUREAU** pour sa disponibilité et sa gentillesse.

Merci aux membres de l'Université d'Orléans

En particulier, merci à **Estelle BOULMIER** et **Jenny MORENO** pour les pauses du midi souvent très animées et qui m'ont permis de m'évader à des moments critiques. Merci à Sandrine CARTRON (Podlap') pour sa bonne humeur quotidienne et surtout pour m'avoir prêté une épaule bienveillante...

Merci aux membres de l'INRA d'ARDON

Merci à **Annabelle DEJARDIN** et **Jean-Charles LEPLE** pour avoir pris le temps de répondre à mes questions concernant respectivement des aspects de culture *in vitro* du peuplier et la technique de RT-PCR en temps réel.

Merci notamment à **Marie-Claire LESAGE-DESCAUX**, **Vanina GUERIN** et **Emanuelle MAGNOUX** pour leur disponibilité à toute épreuve pour répondre à mes mails (parfois en catastrophe) et surtout pour l'obtention des très nombreux runs de séquences effectués au cours de ces 3 années et demi.

Special thanks to the Nassuth lab staff

Thanks to the associate professor **Annette NASSUTH** for giving me the opportunity to come in her lab in Guelph, CANADA. From a personal point a view, I would like to thank you to make me discover the beauty of Canada. I spent such a great time visiting cities and museums! Concerning the lab, it was really interesting to learn the new transactivation test and see another model specie.

Thanks to **Bertilla MORONI** to make things easier for me to come. Big thanks **Michael MUCCI** and **Tannis SLIMMON** for the help they gave me in the greenhouse facility. Also thank to **Alison EDGE** and **Christine LEE** for their happiness and their useful advices. Christine thanks too for my first flatsharing, it was really great to be one of your roommates! I will have to come back to eat one of the famous ice-cream from the House Boat

Merci à mes amis et à ma famille

Je souhaite également remercier mes amies, et notamment **Isabelle DARVAUT-HUBERT** (mon lapinou d'amour) qui aura su m'insuffler sa joie de vivre jusqu'à la fin de cette thèse. Un dernier bleuhbleuhbleuh comme j'en ai le secret ne sera surement pas de refus avant de commencer ma soutenance (tu ne peux pas me refuser ça....). Du coup, je remercie également ton gentil mari qui te prête, **Marc DARVAUT-HUBERT** (tu sais que j'en prends soin.... Un peu trop soin oui...). Merci à la mamozelle de la situation, j'ai nommée **Sophie BARBAY**. Ce petit séjour dans le Sud a vraiment été une bouffée d'oxygène avant le grand saut, merci pour ton sourire, ta bonne humeur et ta joie de vivre, je te souhaite de trouver ton bonheur autour du monde, mais reviens moi vite !!!!

Merci à **Arnaud FRIQUET**, à mes côtés depuis plus de 7 ans... Merci pour avoir été compréhensif dans cette dure période qu'est la rédaction (et pour être venu me chercher plus d'une fois à des heures inavouables et m'apporter mon repas au laboratoire aussi...). Je sais que tu tiens une ardoise très précise sur les tâches ménagères que j'ai ratées ces dernières semaines et je m'engage solennellement à la solder au plus vite (hemhemhem...). Merci également à **Serge**, **Odile**, **Romuald** et **Benjamin FRIQUET**, ainsi que **Robine ETANGSALE** ma « belle-famille » qui a également permis mon épanouissement personnel au cours de ces trois années.

Pour terminer, je réserve d'immenses mercis à ma famille en commençant par **Henri** et **Aimée STEIL**, mon Papi et ma Mamie qui ont su m'encourager à l'autre bout de la France. Merci à mon frère, **Sofian DJEGHDIR** (alias Sot le quichon) pour ses intermèdes musicaux et pour être un aîné de chic et de choc ainsi que ma petite sœur **Sonia DJEGHDIR** (aka Crochon) pour ses nombreux encouragements et pour avoir maintenu le lien avec Chouchou. Merci énormément à **Isabelle STEIL**, ma maman et **Amid DJEGHDIR**, mon papa qui m'ont poussé jusqu'à la fin (et même au-delà) sans jamais perdre espoir en moi et pour avoir gardé toute leur patience face à mon moral fluctuant. Merci à ma

ménagerie de boules d'amour d'ici et d'ailleurs, mon bébé **Chouchou** (et ses 3 amis), **Célestin**, **Twix**, **Icare**, **Ulkia** (le Lukia), **Pixel** (mon gros) et ma toutoune **Jipsy** (Tétusse).

Merci enfin à tous ceux que je n'ai pu citer, mais qui ont contribué de manière certaine à l'aboutissement de ces trois années de thèse...

A Pierre-Louis MONCHAUSSE,
Patrick STEIL,
Jean-Louis SCHNEIDER
Et à Ulkia

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	5
TABLE DES MATIERES.....	13
LISTE DES ABREVIATIONS	19
LISTE DES FIGURES	23
LISTE DES TABLEAUX	25
PREAMBULE	27
INTRODUCTION	29
I. Contexte climatique actuel et conséquences sur les plantes.....	31
I.1. Réchauffement climatique.....	31
I.2. Conséquences sur les ressources en eau	31
I.3. Impact sur les plantes et leur réponse face à ces problèmes de sécheresse	32
I.3.a - Stratégies développées	32
I.3.b - L'acide abscissique (ABA) et son rôle dans la réponse des plantes à la sécheresse.....	33
II. Perception et signalisation de la contrainte osmotique.....	36
II.1. Le système à deux composantes (TCS) procaryote	36
II.1.a - Les partenaires du système à deux composantes bactérien.....	37
II.1.b - Fonctionnement classique du TCS bactérien.....	38
II.1.c - Exemples de TCS bactériens génériques	39
II.2. Le Multi Step Phosphorelay System (MSP) eucaryote	40
II.2.a - Perception du changement d'osmolarité chez la levure (<i>S. cerevisiae</i>)	41
II.2.b - Le MSP chez les plantes	42
II.3. Interconnexions entre les voies MSP cytokinines, osmosensing, et ABA	50
III. Le peuplier.....	50
III.1. Le peuplier : un arbre aux intérêts multiples.....	50
III.1.a - Portées économique et écologique du peuplier	51
III.1.b - Intérêts scientifiques du peuplier	52
III.2. Etat des connaissances sur le MSP du peuplier.....	53
IV. Objectif de la thèse.....	54
MATERIELS ET METHODES.....	57
MATERIELS.....	59
I. Matériels biologiques.....	59
I.1. Peuplier	59
I.2. Tabac.....	59
I.3. Pervenche de Madagascar	59

I.4. Souches de bactéries	60
I.5. Souches de levures	60
II. Milieux de culture	60
II.1. Milieux de culture pour végétaux	60
II.2. Milieux de culture de bactéries	61
II.3. Milieux de culture de levures	62
METHODES	65
I. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	65
I.1. PCR classique	65
I.2. PCR sur colonies	65
I.2.a - Levures	65
I.2.b - Bactéries	66
I.3. PCR de séquençage	66
I.4. RT-PCR semi-quantitative et en temps réel	66
I.4.a - Traitement à la désoxyribonucléase I (DNase I) des ARN	66
I.4.b - Transcription inverse des ARN	66
I.4.c - RT-PCR relative	67
I.4.d - RT-PCR en temps réel	68
II. Extraction, purification et analyse des acides nucléiques	69
II.1. Extraction des acides nucléiques	69
II.1.a - Extraction des ARN totaux	69
II.1.b - Extraction d'ADN plasmidique	70
II.1.c - Extraction d'ADN génomique de peuplier	70
II.2. Purification d'ADN	70
II.2.a - Purification d'ADN en solution ou à partir d'un gel d'agarose	70
II.2.b - Purifications de PCR de séquençage	71
II.3. Analyse des acides nucléiques	71
II.3.a - Electrophorèse en gel d'agarose	71
II.3.b - Digestions enzymatiques	71
II.3.c - Dosage des acides nucléiques	72
III. Clonage dans les vecteurs plasmidiques	72
III.1. Clonage de type T-A	72
III.2. Clonage dans les vecteurs de double-hybride	72
III.3. Clonage dans le pGEX-5X-1	74
III.4. Clonage dans les plasmides du système de trans-activation utilisé chez le tabac.	74
III.5. Clonage dans le plasmide pENTR™/D-TOPO®	75
III.6. Recombinaison dans les plasmides du système Gateway®	76
IV. Transformation et croisement du matériel biologique	77
IV.1. Transformation du matériel végétal	77

IV.1.a - Agroinfection des boutures de peuplier	77
IV.1.b - Agroinfection des plants de tabac	77
IV.1.c - Transformation des cellules de Pervenche de Madagascar par biolistique.....	78
IV.2. Transformation de bactéries.....	78
IV.2.a - Transformation par choc thermique.....	79
IV.2.b - Transformation par conjugaison triparentale	79
IV.3. Transformation et croisement de levures.....	80
IV.3.a - Transformation de levures.....	80
IV.3.b - Croisement des levures haploïdes	80
V. Analyses biochimiques.....	81
V.1. Productions et extraction des protéines recombinantes GST-GARP-RR	81
V.1.a - Productions des protéines de fusion chez <i>E.coli</i>	81
V.1.b - Extraction des protéines totales d' <i>E.coli</i>	81
V.1.c - Analyse de la production des protéines recombinantes GST-GARP-RR par électrophorèse SDS-PAGE.....	81
V.2. Test d'interaction des partenaires en levure : technique double-hybride.....	82
V.2.a - Test de croissance sur milieu -LWH	82
V.2.b - Test de coloration X-Gal	82
V.3. Dosage des activités β-glucuronidase et luciférase pour l'analyse des expériences de trans-activation chez <i>C. roseus</i> et <i>N. benthamiana</i>	83
V.3.a - Expression transitoire chez <i>Catharanthus roseus</i>	83
V.3.b - Analyse de l'expression transitoire chez <i>Nicotiana benthamiana</i>	84
V.4. Test de l'activité des promoteurs par utilisation d'un gène rapporteur	85
V.4.a - Récupération des promoteurs.....	85
V.4.b - Analyse des séquences promotrices	85
V.4.c - Activité des gènes rapporteurs.....	86
VI. Analyses informatiques	87
RESULTATS.....	89
Partie I : étude de la régulation des <i>RR-B</i>	91
Introduction générale Partie I.....	93
Chapitre I : étude du profil d'expression des <i>RR-B</i> par RT-PCR en temps réel.....	95
I.1. Introduction.....	95
I.2. Contexte d'étude et objectifs.....	97
I.3. Résultats.....	98
I.4. Discussion	100
Chapitre II : régulation spatio-temporelle de l'expression des <i>RR-B</i> par analyse de l'activité des promoteurs.....	105
II.1. Introduction.....	105
II.2. Contexte d'étude et objectifs.....	105
II.3. Résultats.....	107

II.4.a - Isolement et analyse bio-informatique des promoteurs de <i>HK1a</i> , <i>HK1b</i> , <i>RR13</i> , <i>RR18</i> , <i>RR19</i> et <i>RR22</i> du clone 717-1B4.....	107
II.4.b - Etude de la régulation du promoteur du gène <i>HK1a</i> dans différents organes en condition témoin.....	119
II.4. Discussion	124
Conclusion générale Partie I.....	127
Partie II : caractérisation fonctionnelle de RR-B candidats à une implication dans la voie de signalisation de la contrainte osmotique	129
Introduction générale Partie II	131
Chapitre 1 : étude de la fonctionnalité des RR-B selon leurs différents domaines structuraux	133
Section I - Détermination de la capacité de fixation des RR-B à l'ADN par le biais du domaine GARP	135
Section II - Etude de la capacité de dimérisation des RR-B	145
Chapitre 2 : étude de la fonctionnalité des RR-B par des approches biologiques	163
Section I - Etude de la capacité d'activation de la transcription de promoteurs cibles par les RR13, 18, 19 et 22	165
Section II - Etude de l'impact de l'extinction des <i>RR18</i>, <i>19</i> et <i>22</i>	181
Conclusion générale Partie II.....	187
DISCUSSION ET CONCLUSIONS	189
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	203
ANNEXES.....	227
ANNEXE 1 : MILIEUX DE CULTURES POUR VEGETAUX	229
ANNEXE 2 : SEQUENCES DE DIFFERENTS PARTENAIRES DU MSP POUR LE CLONE 717-1B4 DU GENOTYPE <i>POPULUS TREMULA X P. ALBA</i>	231
ANNEXE 3 : SEQUENCES DES DIFFERENTES AMORCES UTILISEES	235
ANNEXE 4 : CARTES DES PRINCIPAUX PLASMIDES UTILISES.....	237
ANNEXE 5 : ALIGNEMENT DES SEQUENCES RR-B DES GENOTYPES DORSKAMP ET/OU <i>TRICHOCARPA</i> POUR LA TECHNIQUE RT-PCR EN TEMPS REEL.....	241
ANNEXE 6 : RESULTATS DE RT-PCR EN TEMPS REEL.....	245
ANNEXE 7 : CARTOGRAPHIE DES PROMOTEURS ISOLES	251
ANNEXE 8 : STRATEGIE DE CONSTRUCTION POUR L'ETUDE DE DIMERISATION	255
ANNEXE 9 : ALIGNEMENT DES SEQUENCES RR-B DU CLONE 717-1B4 DU GENOTYPE <i>POPULUS TREMULA X P. ALBA</i>	257
ANNEXE 10 : ARTICLE PUBLIE.....	261

LISTE DES ABREVIATIONS

#

2,4-D : acide **2,4-Dichlorophénoxy-acétique**

2ip : 6-(gamma,gamma-dimethylallylamino)purine

4-MU : **4-Méthyl-Umbelliferone**

A

A₂₆₀, A₂₃₀, A₂₃₀ : Absorbance à **260, 280** ou **230** nm

ABA : Acide **ABscissique**

ABF : **ABRE-Binding Factor**

ABI : **ABscisic acid Insensitive**

ABRE : **ABscisic acid Responsive Element**

ADN : Acide **DéoxyriboNucléique**

ADNc : **ADN complémentaire**

ADNg : **ADN génomique**

AHK : *Arabidopsis* **Histidine Kinase**

ApE : **A plasmid Editor**

APS : Ammonium **PerSulfate**

APRR : *Arabidopsis* **Pseudo-RR**

ARCHE : Arbres et Réponses aux Contraintes Hydriques et Environnementales

ARN : Acide **RiboNucléique**

ARNdb : **ARN double brin**

ARNm : **ARN messenger**

ARNt : **ARN de transfert**

B

BAP : **6-BenzylAminoPurine**

BD : **Binding Domain**

BET : Bromure d'**ETHidium**

BiFC : **Bimolecular Fluorescence Complementation**

BLAST : **Basic Local Alignment Search**

BSA : **Bovine Serum Albumin**

bZIP : **basic leucine ZIPper**

C

CA : **Catalytic ATP-binding domain**

CBF : **C-repeat Binding Factor**

CCNUCC : **Convention-Cadre des Nations Unies sur les Changements Climatiques**

CHASE : **Cyclase/Histidine kinase Associated Sensory Extracellular**

ChIP : **ImmunoPrécipitation de la Chromatine**

CK : **CytoKinine**

CKI 1 : **CK Independent 1**

CML : **CalModulin-Like protein**

CMP : **Conference Meeting of the Parties**

CNP : **Conseil National du Peuplier**

CP : **Partie Cytoplasmique**

CRE : **Cytokinin REsponse 1**

CRF : **Cytokinin Response Factor**

CRT : **C-Repeat**

Ct : **Cycle threshold**

CTAB : **Bromure**

d'hexadécylTriméthylAmmonium

cZ : **cis-Zéatine**

D

D : **aspartate**

DHp : **Dimerization Histidine phosphotransfer**

dNTP : **desoxyNucléotides Tri-Phosphate**

Do : **Drop-out**

DTT : **DiThioThreitol**

E

EDTA : **Ethylene Diamine Tetra-acetic Acid**

eGFP : **enhanced GFP**

EMSA : **Electrophoretic Mobility Shift Assay**

F

FAO : **Food and Agriculture Organization**

FCBA : **Forêt Cellulose Bois-construction Ameublement**

FiLUC : **Firefly LUCiferase**

G

GARP : **Golden/ARR/Psr1**

GFP : **Green Fluorescent Protein**

GIEC : **Groupe d'experts Intergouvernemental sur l'Evolution du Climat**

GIS : **Groupement d'Intérêt Scientifique**

GST : **Glutathion S-Transférase**

H

H : **histidine**

HAMP : **Histidine kinases, Adenylate cyclase, Methyl accepting proteins and Phosphatases**

HDS : **HMBPP Synthase**

HMBPP : **4-Hydroxy-3-MéthylBut-2-enyl DIPhosphate**

HOG : **High Osmolarity Glycerol**

hpRNA : **hairpin RNA**

HPt : **Histidine Phosphotransfert protein**

HTH : **Hélice-Tour-Hélice**

I

IM-HK : senseur **HK** IntraMembranaire
INRA : Institut National de la Recherche Agronomique
iP : isoPentényladénine
IPT : Phosphate-IsopentenylTransferases
IPTG : d'Isopropyl β -D-1-ThioGalactoPyranoside

K

KAT1 : **K**⁺ channel in *Arabidopsis thaliana* 1
kDa : kilo Dalton

L

LAR : Luciferase Assay Reagent
LBLGC : Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures
LB : Luria Bertani
LB-A : **LB** *Agrobacterium*
LBA : **LB** Ampicilline
LB-C : **LB** Culture
LBG : **LB** Gentamycine
LBGK : **LB** Gentamycine et Kanamycine
LB-I : **LB** Induction
LBK : **LB** Kanamycine
LB-P : **LB** Production
log : logarithme
LSB : Lysis Sample Buffer

M

MEP : Methyl Erythritol Phosphate
M-MuLV : Moloney Murine Leukemia Virus
MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase
MAPKK : MAP Kinase Kinase
MAPKKK : MAP Kinase Kinase Kinase
MBS : Myb-Binding Site
MCP : Methylated Chemotaxis Protein
MCS : Site Multiple de Clonage
MS ½ : Murashige and Skoog ½
MSP : MultiStep Phosphorelay
MUG : 4-MéthylUmbelliferyl- β -D-Glucuronide

N

N_A : Nombre d'Avogadro
NAA : Acide NaphtalèneAcétique
NEB : New England Biolabs
NLS : Séquence de Localisation Nucléaire
NPK : Azote-Phosphore-Potassium
NTC : No Template Control

O

OMM : Organisation Météorologique Mondiale
OST1 : Open STomata 1

P

PBS : Phosphate Buffered Saline

PCR : Réaction de Polymérisation en Chaîne
PDH1 : Proline DeHydrogenase 1
PEG₆₀₀₀ : PolyEthylène Glycol 6000
pmol : picomole
PlantCARE : Plant Cis-Acting Regulatory Element
PLB : Passive Lysis Buffer
PNUE : Programme des Nations Unies pour l'Environnement
PP2C : Protéine Phosphatase de type 2C
PTGS : Post-Transcriptional Gene Silencing
PYR/PYL/RCAR : PYrabactin Resistant/PYracatin resistant-Like/Regulatory Component of ABA Receptor

R

RACE-PCR : Rapid Amplification of cDNA-Ends by PCR
RiLUC : Renillia Luciferase
RISC : RNA-Induced Silencing Complex
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
RNAi : ARN interférent
RPM : Rotations Par Minutes
RT-PCR : RétroTranscription puis PCR
RT : Reverse Transcriptase
RR : Régulateur de Réponses

S

SANT : SWI3, ADA2, N-CoR and TFIIB
SDS : Sodium DodécylSulfate
SDS-PAGE : SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
SELEX : Evolution Systématique de Ligands par Enrichissement eXponentiel
SLAC1 : Slow Anion Channel associated 1
SND : Secondary wall-Associated NAC Domain
SnRK2 : Sucrose non fermenting kinase-1-Related protein Kinase 2
SOC : Super Optimal broth with Catabolite repression
SRES : Special Report on Emission Scenarios

T

TAE : Tris Acétate EDTA
TE : Tris EDTA
TEMED : N,N,N',N'-TÉtraMéthylÉthylèneDiamine
TGS : Tris-Glycine SDS
T_m : melting Temperature
TDZ : ThiDiaZuron
TCS : Two-Component System
tZ : *trans*-Zéatine

U**U** : Unité**UV** : UltraViolets**V****VIGS** : Virus-Induced Genre Silencing**W****WOL** : **W**Ooden Leg**X****X-Gal** : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-Galactopyranoside**Y****YLS8** : *Yellow Leaf Specific gene 8***YPD** : Yeast Peptone Dextrose**YNB** : Yeast Nitrogen Base

LISTE DES FIGURES

<i>Figure 1 : illustration des prédictions des variations relatives des précipitations mondiales.</i>	32
<i>Figure 2 : illustration de la perception et l'élaboration de réponses des végétaux à un déficit hydrique.</i>	33
<i>Figure 3 : mécanisme cellulaire de perception et de signalisation de l'ABA.</i>	35
<i>Figure 4 : schéma présentant les différents types d'architectures des récepteurs HK observés chez les bactéries.</i>	37
<i>Figure 5 : schéma présentant les différents domaines des RR observés chez les bactéries.</i>	38
<i>Figure 6 : schéma général du fonctionnement du système TCS bactérien.</i>	39
<i>Figure 7 : schéma de deux TCS bactériens génériques, les systèmes EnvZ/OmpR et CheA/CheY.</i>	40
<i>Figure 8 : schéma représentant les différents partenaires intervenants dans les deux voies de signalisation Sln1 et Sho1 impliquées dans l'osmorégulation chez la levure.</i>	42
<i>Figure 9 : schéma des différents domaines présents pour les familles de RR chez Arabidopsis.</i>	45
<i>Figure 10 : analyse des profils d'expression des RR12, 13, 14, 16 et 19 de peuplier par RT-PCR semi-quantitative dans différents organes en condition contrôle ou sous l'impact d'un stress osmotique.</i>	95
<i>Figure 11 : analyse des profils d'expression des RR13 (A), 13, 14, 16 et 18 (B) de peuplier par RT-PCR en temps réel dans différents organes en condition contrôle ou sous l'impact d'une cinétique de stress osmotique.</i>	96
<i>Figure 12 : profil d'expression de l'ensemble des RR-B de peuplier, génotype Dorskamp après 10 et 120 minutes de stress PEG₆₀₀₀ dans les limbes.</i>	99
<i>Figure 13 : profil d'expression du RR13 de peuplier, génotype Dorskamp après 10 et 120 minutes de stress PEG₆₀₀₀ dans les limbes.</i>	100
<i>Figure 14 : analyse part RT-PCR quantitative de l'expression de HK1a dans différents organes de peuplier après croissance en hydroponie en condition témoin et soumises à une cinétique de stress au PEG₆₀₀₀ à 100 g/L.</i>	106
<i>Figure 15 : analyse des motifs cis-régulateurs présents au sein de la séquence promotrice de HK1a et permettant potentiellement la fixation des RR-B.</i>	108
<i>Figure 16 : analyse des motifs cis-régulateurs présents au sein de la séquence promotrice de HK1b et permettant potentiellement la fixation des RR-B.</i>	110
<i>Figure 17 : analyse des motifs cis-régulateurs présents au sein de la séquence promotrice de RR13 et permettant potentiellement la fixation des RR-B.</i>	112
<i>Figure 18 : analyse des motifs cis-régulateurs présents au sein de la séquence promotrice du RR18 et permettant potentiellement la fixation des RR-B.</i>	114
<i>Figure 19 : analyse des motifs cis-régulateurs présents au sein de la séquence promotrice du RR19 et permettant potentiellement la fixation des RR-B.</i>	116
<i>Figure 20 : analyse des motifs cis-régulateurs présents au sein de la séquence promotrice du RR22 et permettant potentiellement la fixation des RR-B.</i>	118
<i>Figure 21 : analyse de l'expression du gène GUS dans une feuille médiane mature ainsi qu'une portion de tige d'un contrôle positif et d'un contrôle négatif sans fixation préalable des tissus.</i>	120
<i>Figure 22 : analyse de l'expression GUS en condition témoin de deux lignées différentes de vitroplants de peuplier transformés par la construction promHK1a-GUS.</i>	121
<i>Figure 23 : analyse de l'expression GUS en condition témoin et sous stress osmotique ou stimulus CK de la lignée 7 de peuplier transformée par la construction promHK1a-GUS.</i>	122
<i>Figure 24 : analyse de l'expression GUS en condition témoin et sous stress osmotique ou stimulus CK de la lignée 21 de peuplier transformée par la construction promHK1a-GUS.</i>	123
<i>Figure 25 : modélisation de la structure du domaine GARP de l'ARR10.</i>	135
<i>Figure 26 : alignement des séquences en acides aminés du domaine GARP de tous les RR-B de peuplier génotype Dorskamp.</i>	137
<i>Figure 27 : analyse de la production des protéines totale et de la surproduction de la protéine de fusion GST-GARP-RR13 en souche d'E.coli BL21 avant induction, 2 heures après induction et 4 heures après induction par ajout d'IPTG 3 mM.</i>	138
<i>Figure 28 : analyse de la production des protéines totale et de la surproduction de la protéine de fusion GST-GARP-RR18 en souche d'E.coli BL21 avant induction, 2 heures après induction et 4 heures après induction par ajout d'IPTG 3 mM.</i>	140
<i>Figure 29 : analyse de la production des protéines totale et de la surproduction des protéines de fusion GST-GARP-RR19 (a.) et GST-GARP-RR22 (b.) en souche d'E.coli BL21 avant induction, 2 heures après induction et 4 heures après induction par ajout d'IPTG 3 mM.</i>	141

<i>Figure 30 : alignement du domaine GARP des RR18, 19 22 et 13 de Populus Dorskamp avec l'ARR18 d'Arabidopsis thaliana.</i>	143
<i>Figure 31 : alignement du domaine GARP de Medicago truncatula, Arabidopsis thaliana et Populus Dorskamp.</i>	143
<i>Figure 32 : schéma des différents domaines composants les RR-B.</i>	145
<i>Figure 33 : structure topologique du domaine receveur (REC) des RR bactériens.</i>	146
<i>Figure 34 : structure cristallisée du domaine receveur du RR bactérien ArcA sous forme d'homodimère.</i>	146
<i>Figure 35 : structure cristallisée du domaine receveur de l'HK d'Arabidopsis CK11.</i>	147
<i>Figure 36 : arbre phylogénétique entre les séquences protéiques pleines longueurs des différents RR-B d'Arabidopsis (en gris) et de Populus (en noir).</i>	148
<i>Figure 37 : alignement des séquences en acides aminés du domaine DDK de tous les RR-B de peuplier génotype Dorskamp.</i>	150
<i>Figure 38 : étude de la capacité de dimérisation de l'ensemble des domaines DDK des RR-B par système double-hybride en levure par analyses de la croissance sur milieu carencé et activité β-galactosidase.</i>	152
<i>Figure 39 : schéma récapitulatif des hétérodimérisations observées entre les paires de RR-B parmi l'ensemble des domaines DDK des RR-B de peuplier.</i>	157
<i>Figure 40 : effet de la surexpression des protéines ARR2 d'Arabidopsis, RR13 et RR18 de peuplier sur le niveau d'expression du gène rapporteur luciférase sous le contrôle du promoteur de l'ARR6 dans les cellules de C. roseus en conditions contrôles.</i>	166
<i>Figure 41 : effet de RR13 sur le niveau d'expression du gène rapporteur sous le contrôle du promoteur de HK1a dans les cellules de C. roseus co-transformées transitoirement.</i>	168
<i>Figure 42 : effet du RR13 de peuplier sur le niveau d'expression du gène rapporteur sous le contrôle du promoteur de l'ARR6 dans les cellules de C. roseus co-transformées transitoirement en présence ou non de cytokinines.</i>	169
<i>Figure 43 : effet de la co-transformation transitoire dans les cellules de C. roseus cultivées en absence ou présence de cytokinines, de différentes quantités de vecteur de surexpression du RR13 de peuplier sur le niveau d'expression du gène rapporteur sous le contrôle du promoteur ARR6.</i>	170
<i>Figure 44 : analyse de la capacité de trans-activation du système contrôle ARR2/promoteur ARR6 comparée aux témoins respectifs en absence et en présence de cytokinines.</i>	171
<i>Figure 45 : vecteurs utilisés pour l'étude de la capacité de trans-activation des facteurs de transcription CBF1 et CBF4 sur la sonde synthétique M2.</i>	173
<i>Figure 46 : analyse de la capacité de trans-activation de l'ensemble des protéines sur la sonde M2 (4xCRT) comparée aux témoins négatif et positif.</i>	174
<i>Figure 47 : analyse de la capacité de trans-activation de l'ensemble des protéines sur le promoteur de HK1a.</i>	175
<i>Figure 48 : analyse de la capacité de trans-activation de l'ensemble des protéines sur le promoteur du RR18.</i>	176
<i>Figure 49 : schéma représentant la dégradation d'un ARN double brin en épingle à cheveux par la machinerie cellulaire et extinction de l'expression du gène cible par destruction de son ARN messager.</i>	181
<i>Figure 50 : analyse des transformants contrôle et RNAi RR18, 19 et 22.</i>	183
<i>Figure 51 : analyse des niveaux d'expression obtenus pour les RR18, 19 et 22 dans deux lignées témoin de transformation.</i>	184
<i>Figure 52 : bilans des profils d'augmentation des transcrits de quelques partenaires du phosphorelai (A.) et du réseau de partenaires et de rétrocontrôles putatifs (B.).</i>	199

LISTE DES TABLEAUX

<i>Tableau 1 : sections botaniques regroupant les différentes espèces du genre Populus et leur répartition géographique.</i>	51
<i>Tableau 2 : composition des différents milieux de croissance des bactéries.</i>	62
<i>Tableau 3 : composition des différents milieux de croissance des levures pour les expériences de double-hybride.</i>	63
<i>Tableau 4 : composition générale d'une PCR.</i>	65
<i>Tableau 5 : stratégie de clonage des domaines DDK des RR-B pour les expériences de double-hybride en levure.</i>	73
<i>Tableau 6 : stratégie de clonage des RR-B pour les expériences de production des protéines de fusion.</i>	74
<i>Tableau 7 : stratégie de construction des plasmides effecteurs et rapporteurs pour les expériences de trans-activation en cellules de tabac.</i>	75
<i>Tableau 8 : stratégie de clonage dans le plasmide pENTR™/D-TOPO® pour les expériences de RNAi et de localisation de l'activité promotrice des partenaires du MSP.</i>	76
<i>Tableau 9 : résumé des différentes cultures réalisées dans le cadre de la conjugaison triparentale.</i>	80
<i>Tableau 10 : composition de la solution d'incubation permettant d'effectuer le test GUS dans des boutures de peuplier.</i>	86
<i>Tableau 11 : bilan de la capacité de dimérisation pour l'ensemble des domaines DDK des RR-B de peuplier.</i>	153
<i>Tableau 12 : bilan de la capacité d'homodimérisation de l'ensemble des domaines DDK des RR-B de peuplier.</i>	154
<i>Tableau 13 : bilan de la capacité d'hétérodimérisation intra-paires obtenue pour l'ensemble des domaines DDK des RR-B de peuplier.</i>	155
<i>Tableau 14 : bilan de la capacité d'hétérodimérisation entre paires, obtenue pour l'ensemble des domaines DDK des RR-B de peuplier.</i>	156
<i>Tableau 15 : bilan des hétérodimérisation inter-paire non observée parmi l'ensemble des domaines DDK des RR-B de peuplier.</i>	157

PREAMBULE

Le **L**aboratoire de **B**iologie des **L**igneux et des **G**randes **C**ultures (**LBLGC**) développe des thèmes de recherche sur la réponse des arbres ou des espèces de grandes cultures telles le lin ou le blé face à des contraintes environnementales.

L'équipe **A**rbre et **R**éponses aux **C**ontraintes **H**ydriques et **E**nvironnementales (**ARCHE**) du LBLGC focalise quant à elle sa thématique de recherche sur l'étude de la réponse du peuplier face à la contrainte hydrique en l'occurrence lors de survenue d'épisodes de sécheresse. Cette thématique est abordée selon plusieurs approches allant de l'écophysiologie à la physiologie moléculaire.

D'un point de vue moléculaire, une des questions abordées concerne le mode de perception de la contrainte hydrique ou sécheresse. En effet, de nombreuses études ont porté jusque-là sur les réponses moléculaires mises en place par les plantes pour répondre efficacement à la sécheresse mais le mode de perception de cette contrainte a pendant longtemps été ignoré. Cependant, la réponse moléculaire mise en place pour permettre aux plantes de faire face à ce stress est conditionnée tout d'abord par la perception de ce stress puis par la transduction du signal de sécheresse.

Ainsi l'équipe dans laquelle a été effectuée cette thèse a focalisé son thème de recherche sur l'étude d'une voie de signalisation permettant au peuplier de percevoir le manque d'eau. L'existence d'une voie de signalisation particulière, comprenant un récepteur appelé osmosenseur a été mise en avant dans les années 1999 *via* le travail de l'équipe Japonaise du Riken ([Urao et al., 1999](#)). Cette voie de signalisation correspond à un système appelé **M**ulti-**S**tep **P**hosphorelais (**MSP**). Ainsi, l'équipe « Signalisation » a donc focalisé sa recherche sur l'identification de partenaires d'un MSP pouvant être impliqués dans la perception de la sécheresse chez le peuplier.

INTRODUCTION

I. Contexte climatique actuel et conséquences sur les plantes

I.1. Réchauffement climatique

Depuis les dernières décennies, un changement du climat à l'échelle mondiale a pu être mis en évidence.

L'observation de ces modifications a conduit à la création de groupements dont le **Groupe d'experts Intergouvernemental sur l'Evolution du Climat (GIEC)** en 1988 par l'**Organisation Météorologique Mondiale (OMM)** et le **Programme des Nations Unies pour l'Environnement (PNUE)**. Ce GIEC correspond à un regroupement d'experts scientifiques ayant pour mission d'étudier l'impact des activités humaines sur le climat et ses changements tout en établissant des scénarios d'évolution de ce climat en fonction des activités humaines. Il s'agit donc d'un outil d'alerte afin de sensibiliser les autorités aux impacts du changement climatique.

Le cinquième rapport d'évaluation publié en 2014 (GIEC, 2014) a focalisé son étude sur les changements climatiques et ses impacts possibles sur les systèmes naturels et humains. Ainsi, en partie du fait des activités humaines (Mitchell *et al.*, 2006), et malgré les tentatives conjointes de nombreux pays pour limiter les causes anthropiques du changement climatique, les populations font face à des anomalies de températures sans précédent à l'échelle mondiale depuis ces trois dernières décennies.

Dans ce contexte, la Conférence de Paris de 2015 sur le climat s'est tenue du 30 novembre au 12 décembre 2015 et a réuni 195 pays. Cet événement était à la fois le siège de la 21^{ème} Conférence des Parties ou **Conference Of the Parties (COP21)** à la **Convention-Cadre des Nations Unies sur les Changements Climatiques (CCNUCC)**. et la 11^{ème} Conférence des Parties siégeant en tant que réunion des parties au protocole de Kyoto ou **Meeting of the Parties to the Protocol (CMP-11)** L'objectif de ce sommet, atteint le 12 décembre 2015, était d'établir un accord international sur le climat, adéquat pour tous les pays, et permettant de limiter la hausse du réchauffement climatique mondial entre 1,5 et 2°C d'ici 2100. La signature de cet accord montre ainsi d'une part la volonté affichée au niveau mondial d'agir ainsi que l'urgence manifeste de la situation.

A l'aube de la COP22, prenant place à Marrakech (Maroc) du 7 au 18 novembre 2016, de nombreuses attentes se sont ainsi sentir concernant l'accord établi. Le prochain rapport du GIEC, présenté en 2018, sera ainsi l'occasion d'appréhender les conséquences d'un réchauffement planétaire supérieur à 1,5°C par rapport aux périodes pré-industrielles.

I.2. Conséquences sur les ressources en eau

Dans ce dernier rapport du GIEC (GIEC, 2014) il apparait du fait de la modification des trajets des tempêtes extratropicales, des changements conséquents dans les caractéristiques des vents, des précipitations et des températures.

Ainsi, de nombreux modèles de projection de plus en plus performants et précis s'étendant jusqu'à la fin du 21^{ème} siècle permettent d'établir que dans beaucoup de régions, les changements des températures impactent sur les précipitations ou la fonte des neiges et des glaces. Ces deux phénomènes sont à leur tour responsable de la perturbation des systèmes hydrologiques, influant sur la qualité et la quantité des ressources hydriques (GIEC 2014). Le rapport prévoit donc un appauvrissement des ressources renouvelables en eau de surface et souterraine dans les décennies à venir (Figure 1). En parallèle, les modifications thermiques observées ces dernières décennies conduisent également à une évaporation plus conséquente de l'eau.

En conclusion, le rapport du GIEC 2014 stipule que les modifications climatiques telles que la raréfaction des ressources en eau notamment, porteront atteinte à la biodiversité et à la sécurité alimentaire par le biais des atteintes impactant les espèces végétales.

Le rapport du **GIEC 2014** prévoit ainsi des risques accrus de disparition d'espèces et plus particulièrement d'espèces végétales qui du fait de leur immobilisme n'ont pas la capacité naturelle de modifier leur répartition géographique en un laps de temps aussi court que ce qui est annoncé. Il est ainsi primordial de pouvoir prédire les conséquences des changements climatiques actuels sur les écosystèmes végétaux afin de mettre en place des stratégies adaptées limitant l'extinction des espèces et le maintien de celles existantes.

Comprendre ainsi comment les plantes perçoivent leur environnement et les changements s'y produisant, notamment les fluctuations de disponibilité en eau, devient en enjeu majeur d'envergure planétaire.

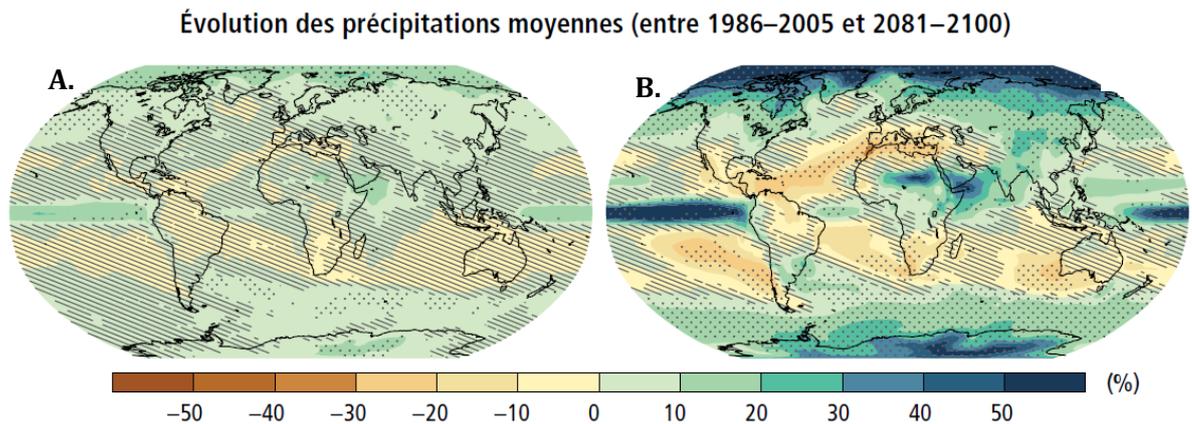


Figure 1 : illustration des prédictions des variations relatives des précipitations mondiales.

*Les prédictions sont réalisées pour la période 2090 – 2099 par rapport à la période 1980 – 1999 pour la période de décembre à février (A) et celle s'étendant de juin à août (B). Les valeurs sont exprimées en pourcentage et correspondent à des moyennes obtenues par analyse du scénario d'émission ou **Special Report on Emission Scenario (SRES) A1B**. Les zones blanches représentent les lieux pour lesquels moins de 66% des modèles concordent dans le signe du changement alors que les zones en pointillés correspondent aux lieux pour lesquels plus de 90% des modèles concordent dans le signe du changement. Figure extraite du **GIEC, 2014**.*

I.3. Impact sur les plantes et leur réponse face à ces problèmes de sécheresse

A l'inverse des animaux, les plantes sont des organismes sessiles qui ne peuvent se mouvoir et qui doivent en conséquence se doter de capacités adaptatives plus développées que les animaux. La contrainte hydrique à l'échelle de la plante correspond à une période durant laquelle la quantité d'eau transpirée par la plante est supérieure à la quantité d'eau absorbée (Bray, 1997).

I.3.a - Stratégies développées

Face à la contrainte hydrique, les plantes disposent de plusieurs stratégies qui sont l'esquive, l'évitement et la tolérance (Kooyers, 2015 ; Khan *et al.*, 2016).

L'esquive est une stratégie visant à adopter un cycle de développement en période non stressante donc en période de disponibilité en eau non limitée. La plante ne se développera pas en période de sécheresse.

L'évitement est une stratégie mise en place par certaines plantes qui vise à éviter que la plante ne soit soumise au manque d'eau, soit donc de diminuer la surface foliaire, et par voie de conséquence limiter la transpiration ou augmenter le système racinaire par exemple. La plante se développera donc en période de sécheresse mais mettra en place des modifications qui lui permettront de ne pas en ressentir les effets.

La tolérance, par contre est une stratégie qui vise à permettre à la plante de se développer en dépit de la contrainte et donc de mettre en place des réponses moléculaires conduisant à des adaptations physiologiques et métaboliques lui permettant de continuer à se développer en dépit de la contrainte. Cette dernière stratégie est de loin la plus répandue dans le règne végétal.

Ainsi, parmi les modifications mises en place par la plante engendrées par le déficit hydrique, on peut constater une diminution de la conductivité hydraulique (Maurel *et al.*, 2010), une fermeture rapide des stomates (Schroeder *et al.*, 2001), un ajustement osmotique par synthèse d'agents osmolytes tels que la proline (Bhaskara 2015) ou des sucres et polyols (Ahanger *et al.*, 2014) (Figure 2). Une modification de la fluidité membranaire de la cellule, dépendante de différents facteurs (Pham Thi, 1984), est également observée (Upchurch, 2008 ; Kumar *et al.*, 2015). Cette modification est en partie expliquée par l'apparition de phénomènes d'inhibition et de dégradation, à l'exemple de l'inhibition de la synthèse des lipides (Monteiro de Paula *et al.* 1993) et la stimulation des activités lipolytiques et péroxidatives (Matos *et al.* 2001 ; Ferrari-Iliou *et al.* 1994). Cette modification de fluidité peut également affecter les membranes de différents organites cellulaires telles que les mitochondries (Zhigacheva *et al.*, 2013) ou bien les thylakoides (Benveniste-Levkovitz *et al.*, 1993). La synthèse d'Acide Abscissique (ABA) a également été constatée (Pelah *et al.*, 1997) et son implication dans la fermeture des stomates est à ce jour avérée (Pei and Kuchitsu, 2005).

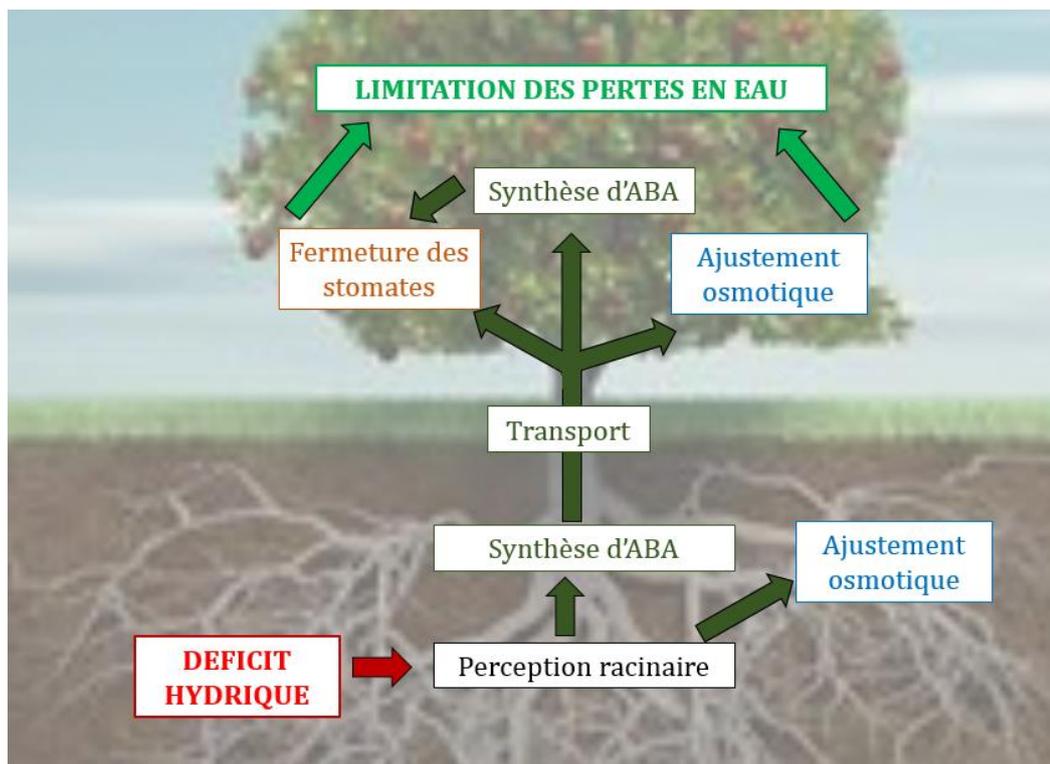


Figure 2 : illustration de la perception et l'élaboration de réponses des végétaux à un déficit hydrique. L'encadré rouge représente la contrainte perçue et le cadre vert la conséquence des ajustements apportés par la plante, représentés par les encadrés verts, bleus et orange.

I.3.b - L'acide abscissique (ABA) et son rôle dans la réponse des plantes à la sécheresse

L'ABA est une hormone de la famille des sesquiterpénoïdes, impliquée à différents stades du développement des végétaux. Sa biosynthèse est localisée au niveau du parenchyme des racines et des feuilles matures, au sein des plastes (Cutler *et al.*, 2010). Ainsi la présence d'ABA est requise dans les phénomènes de dessiccation et de dormance se produisant au sein des graines (Barrero *et al.*, 2005 ;

Fujii and Zhu 2009), lors des étapes de croissance et de développement des jeunes plants et plante adulte mais également lors de son cycle reproductif. L'ABA est également impliqué dans les réponses de la plante à de nombreuses contraintes telles que les changements de salinité, de température ou bien d'osmolarité. Ainsi, son rôle majoritaire serait dédié à la régulation de la balance hydrique de la plante et la tolérance à un stress osmotique (Raghavendra *et al.*, 2010). Lors d'une contrainte hydrique, l'accumulation d'ABA permet alors la fermeture des stomates et induit la régulation de gènes de réponses, tels que des osmoprotectants (Figure 2). Une implication positive ou négative de l'ABA dans le taux de croissance des feuilles (Wilkinson and Davies, 2010) et la conductivité hydrique au sein du réseau racinaire (Maurel *et al.*, 2010) ont également été discutés.

Lors d'une sécheresse, la quantité d'ABA endogène est très rapidement augmentée induisant une fermeture tout aussi rapide des stomates. Cette fermeture stomatique n'est rendue possible que par le biais d'une voie de signalisation de l'ABA permettant l'activation/inactivation de transporteurs ionique conduisant à la fermeture stomatique (Osakabe *et al.*, 2014 ; Fernando and Schoeder *et al.*, 2016). La fermeture stomatique qui en résultera protégera certes la plante d'une évapotranspiration lors de la contrainte mais impactera fortement la productivité par le biais d'une réduction de l'activité photosynthétique. La tolérance de la plante se situera donc dans un équilibre entre réduction des pertes en eau et maintien de la productivité.

Ainsi les études portant sur la voie de signalisation de l'ABA ont permis d'identifier les récepteurs de cette phytohormone et cette voie de signalisation est explicitée dans la figure 3. Les récepteurs nucléocytoplasmiques de l'ABA appartiennent à la famille **PYR/PYL/RCAR** (**PY**rabactin **R**esistant/**PY**rabactin resistant-**L**ike/**R**egulatory **C**omponent of **A**BA **R**eceptor) et à la superfamille **START**-domain. Ces récepteurs sont présents au nombre de 14 (Ma *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2009; Santiago *et al.*, 2009).

En l'absence d'ABA, les **Protéines Phosphatases** de type **2C** (**PP2C**), au nombre de 80 chez *Arabidopsis* dont les protéines **AB**scisic acid **I**nsensitive **1** et **2** (**ABI1** et **2**) (Nishimura *et al.*, 2009), sont responsables de la déphosphorylation des protéines **S**ucrose **n**onfermenting **K**inase-1-**R**elated protein **K**inase **2** (**SnRK2**). Ces protéines kinases sont importantes dans la voie de signalisation ABA car ciblant les gènes dont l'expression est dépendante de l'ABA et des canaux ioniques (Cutler *et al.*, 2010 ; Roychoudhury *et al.*, 2013 ; Mehrotra *et al.*, 2014 ; Cracker and Abeles, 1969 ; Barrero *et al.*, 2005 ; Fujii and Zhu, 2009 ; Raghavendra *et al.*, 2010). Cette déphosphorylation des SnRK2 conduit donc à leur inactivation et par voie de conséquence à l'inactivation des molécules effectrices (régulateurs positifs) de la voie ABA.

La fixation de l'ABA sur ses récepteurs est rendue possible par la présence d'une poche hydrophobe de liaison d'un ligand, de volume suffisant pour englober une molécule entière d'ABA (Umezawa *et al.*, 2010). Ces récepteurs, une fois activés par la fixation de l'ABA, possèdent tous la capacité d'interagir avec les protéines PP2C, conduisant à leur inactivation. Cette inactivation des PP2C conduit alors par contre à l'activation des SnRK2.

Un exemple de l'importance des protéines SnRK2 et plus généralement de la voie de signalisation ABA est le mécanisme du contrôle de la fermeture des stomates, se déroulant au niveau des cellules de garde. Comme précédemment, la liaison de l'ABA au complexe récepteurs **PYR/PYL/RCAR** – protéines **PP2C** conduit à l'inactivation de l'activité phosphatase de ce dernier et par conséquent à l'activation de la protéine kinase SnRK2.6/**O**pen **S**Tomata **1** (**OST1**). Cette protéine agira alors comme régulateur positif de la fermeture stomatique par phosphorylation des canaux ioniques **S**low **A**nion **C**hannel associated **1** (**SLAC1**) conduisant à son activation et l'inhibition du canal à cation **K**⁺ channel in *Arabidopsis thaliana* **1** (**KAT1**). (Vahisalu *et al.*, 2008 ; Geiger *et al.*, 2009 ; Sato *et al.*, 2009). La finalité de la signalisation ABA au niveau des cellules de garde est la réduction de la pression de turgescence au sein de ces cellules par augmentation de la concentration en Ca²⁺ du cytosol

(Fernando *et al.*, 2016) aboutissant après plusieurs étapes à la fermeture stomatique (Schroeder *et al.*, 2001).

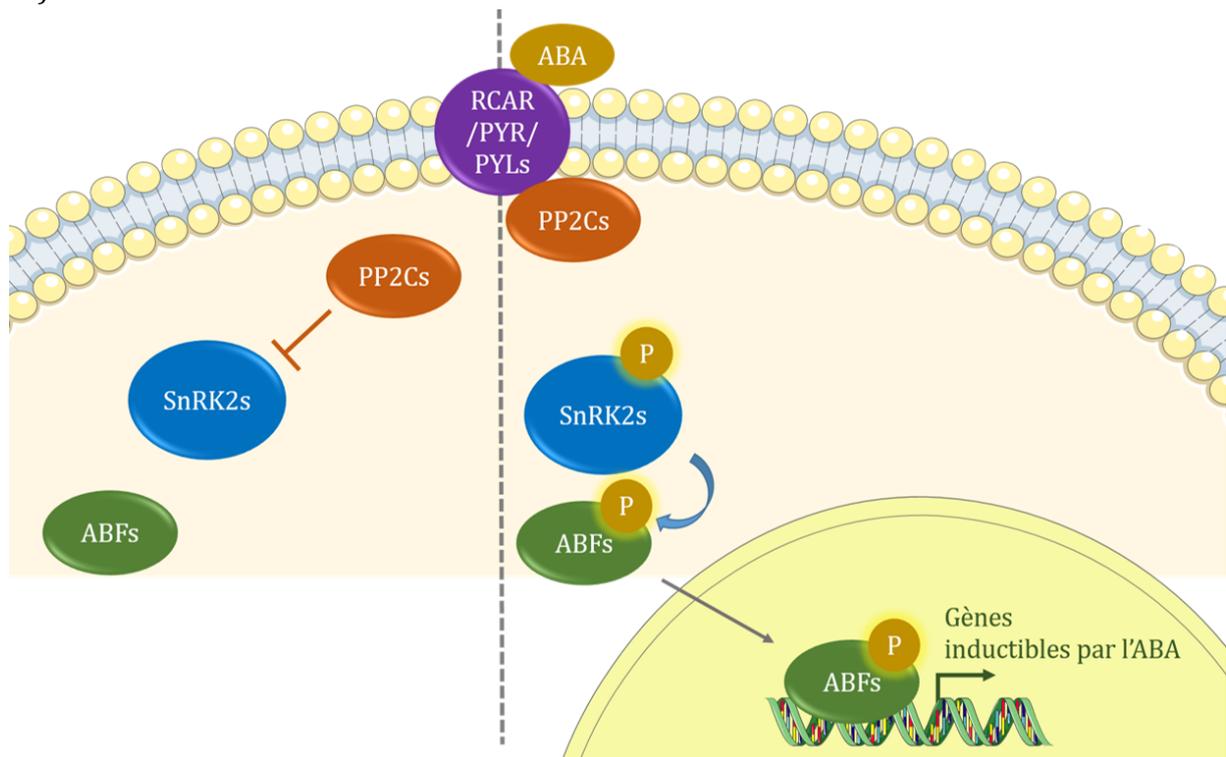


Figure 3 : mécanisme cellulaire de perception et de signalisation de l'ABA.

Le mécanisme est représenté en absence et en présence d'ABA respectivement à gauche et à droite du trait pointillé. Le récepteur de la famille des PYrabactin Resistant/PYrabactin resistant-Like/Regulatory Component of ABA Receptor (RCAR/PYR/PYLs) est représenté en violet. Les protéines à activité phosphatase Phosphatase protein 2C (PP2C) sont représentées en orange, celles à activité kinase Sucrose nonfermenting Kinase-1-Related protein kinase 2 (SnRK2s) sont représentées en bleu, les protéines facteurs de transcription **AB**cissic acid **R**esponsive **E**lement (**ABRE**)-**B**inding **F**actors (**ABF**) sont représentées en vert.

En conclusion, nous pouvons rappeler que l'ABA est une hormone d'importance capitale dans la réponse des plantes à la sécheresse.

Cependant, l'ABA n'est pas la seule hormone importante dans les réponses des plantes à cette contrainte. En effet, des études menées sur des mutants d'*Arabidopsis* pour les trois récepteurs aux cytokinines (CK) nommés *Arabidopsis* Histidine Kinase **AHK2**, **AHK3**, **AHK4**/Cytokinin **R**esponse **1** (**CRE**) /**W**oody **L**eg (**WOL**), révèlent que ces récepteurs seraient des régulateurs négatifs des voies de signalisation sécheresse et ABA (Tran *et al.*, 2007). Il apparaît donc, au vu de cette étude, une interconnexion entre les voies ABA et cytokinines par le biais de leurs voies de signalisation respectives dans le cadre de la réponse des plantes à la sécheresse.

Le dernier élément important mis en avant dans cette étude concerne le rôle important joué par un récepteur de la même nature que ceux dédiés à la perception des cytokinines, le récepteur **AHK1**, possédant un rôle de récepteur de la sécheresse et d'élément clé dans la réponse de la plante face à la sécheresse, de par sa capacité de perception de cette contrainte.

Comprendre les facteurs clés régissant ces équilibres entre voies de signalisation permettra de mieux comprendre les réponses des plantes, voire d'améliorer leur tolérance à cette contrainte. Ainsi la compréhension des mécanismes de perception des signaux à l'origine des voies, à l'exemple de

l'ABA, des cytokinines et de la sécheresse, sont des enjeux scientifiques importants afin de mieux cerner les processus biologiques et physiologiques mis en place par les plantes lors de la sécheresse.

Si la voie de perception des cytokinines est à ce jour mieux comprise, il n'en est pas de même en ce qui concerne la voie de perception de la sécheresse. Comme expliqué précédemment, l'équipe Japonaise du Riken a pu mettre en évidence l'existence d'un récepteur, nommé AHK1 (Urao *et al.*, 1999), appartenant à la même famille de protéine que les récepteurs aux cytokinines, soit des Histidines-Aspartate kinases appartenant à un système de signalisation appelé **Multi-Step Phosphorelais (MSP)**. L'identification de ce récepteur repose sur l'étude des mécanismes de perception de la contrainte osmotique chez des organismes procaryotes et eucaryotes tel que la levure.

Au niveau cellulaire chez les plantes, la sécheresse se traduit par un stress osmotique. Ainsi, comprendre comment un stress osmotique pouvait être perçu chez des bactéries ou des levures pouvait servir de point d'ancrage pour des études chez des organismes pluricellulaires comme les plantes. C'est sur la base de ce postulat que l'équipe du Riken a mis en évidence le récepteur AHK1 et son implication dans la perception de la sécheresse chez *Arabidopsis*.

Comme expliqué en préambule, l'équipe signalisation a donc focalisé sa recherche sur l'identification de partenaires d'un MSP pouvant être impliqué dans la perception de la sécheresse chez le peuplier.

En conséquence, les chapitres suivants décriront :

- les voies de signalisation de la contrainte osmotique chez les procaryotes pour lesquels on parle de **Two-Component System (TCS)**,
- les voies de signalisation chez les eucaryotes (levure et plantes) avec la description du système MSP.

II. Perception et signalisation de la contrainte osmotique

Cette voie de signalisation TCS chez les procaryotes est un système de signalisation composé de 2 partenaires dont un récepteur et une molécule effectrice. Dans le cas des organismes eucaryotes, l'apparition du compartiment nucléaire implique obligatoirement la participation d'une molécule navette entre le récepteur et la molécule effectrice, requalifiant ce système de MSP.

II.1. Le système à deux composantes (TCS) procaryote

Ce système clé de la signalisation procaryote, également appelé His-to-Asp phosphorelay (histidine-to-aspartate phosphorelay) régule de nombreux aspects de la vie bactérienne telle que la formation et le développement de biofilms (Hickman *et al.*, 2005 ; Cotter and Stibitz, 2007 ; Martinez-Wilson *et al.*, 2008 ; Sudhakar *et al.*, 2014), la division cellulaire (Ohta, 1992), la résistance aux antibiotiques (Lin *et al.*, 2015 ; Tatke *et al.*, 2015), la compétence à la transformation et la virulence (Lévesque *et al.*, 2007), l'initiation de la sporulation (Hoch, 1993) ou bien encore les réponses aux stress (Whistler *et al.*, 1998 ; MacRitchie *et al.*, 2008). Il existe ainsi plus de 300 protéines identifiées comme appartenant au système TCS (Ulrich and Zhulin, 2010).

Ce système est composé de deux partenaires (Stock *et al.*, 2000) :

- un récepteur senseur appartenant à la famille des **Histidine Kinase (HK)**
- un **Régulateur de Réponse (RR)**.

De manière générale, les gènes codant les protéines HK et RR impliquées dans un TCS sont regroupés en opéron (Yamamoto *et al.*, 2014). Cette organisation laisserait supposer une régulation facilitée de tous les gènes de l'opéron de manière synchrone lors de la perception de *stimuli*.

II.1.a - Les partenaires du système à deux composants bactérien

II.1.a - i - Les récepteurs HK

Les récepteurs HK peuvent être classés en trois catégories sur la base de leurs domaines et de leur topologie (Mascher, 2006 ; Cheung and Hendrickson 2010) (Figure 4):

- les HK au sein desquelles un domaine senseur extra-cytoplasmique est délimité par deux domaines transmembranaires. C'est la famille la plus vaste, permettant la détection de *stimuli* externes (Figure 4a);
- les HK possédant un domaine senseur cytoplasmique, dédié à la perception de *stimuli* intracellulaires (Figure 4b);
- les HK dépourvus de domaine extracellulaire et possédant des domaines ancrés dans la membrane permettant alors la détection de *stimuli* ayant pour cible la membrane bactérienne (Figure 4c).

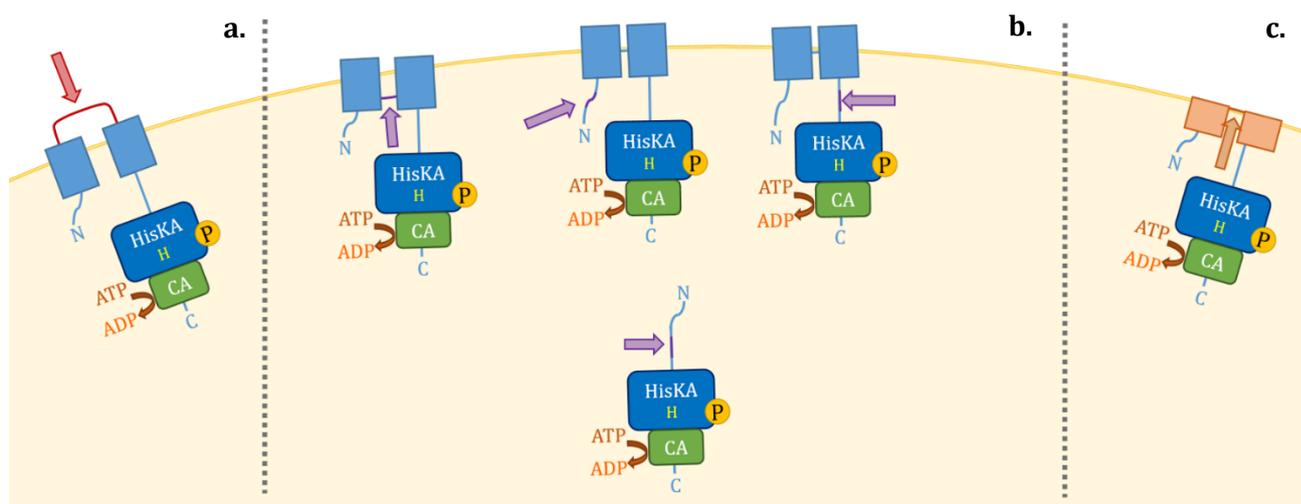


Figure 4 : schéma présentant les différents types d'architectures des récepteurs HK observés chez les bactéries.

HisKA représente le siège de la dimérisation ainsi que le domaine accepteur de phosphate alors que CA représente le domaine catalytique de la protéine responsable de l'hydrolyse de la molécule d'ATP. Les flèches rouges, violettes et orange représentent respectivement un signal extracellulaire, intracellulaire ou lié à la membrane.

Fig 4a et b : les rectangles bleus représentent les domaines transmembranaires.

Fig 4c : les rectangles orange représentent les domaines permettant l'ancrage à la membrane.

Dans la première catégorie, le domaine senseur est localisé en extrémité N-terminale de la protéine. Il est responsable de la perception d'une grande variété de stimuli et est borné par deux domaines transmembranaires dont l'un est relié à la partie C-terminale cytoplasmique (Casino *et al.*, 2009). Dans un tiers des cas, un domaine **HAMP** (présent chez les protéines **H**istidine kinases, **A**denylate cyclases, **M**ethyl accepting proteins and **P**hosphatases) d'environ 50 acides aminés est retrouvé au sein de l'HK. Ce domaine est responsable d'un changement conformationnel à la suite de la liaison d'un ligand et permettrait la transmission de l'information extra-cytoplasmique à la portion catalytique cytoplasmique de la protéine (Matamouros *et al.*, 2015).

Dans la deuxième famille d'HK, les protéines possèdent un domaine senseur cytoplasmique, sont dépourvues de domaines extra-cytoplasmiques et sont ainsi appelées **Intramembrane-sensing HK (IM-HK)**

La dernière famille d'HK concerne les protéines ne possédant pas de portions extracellulaires et qui sont dédiées à la perception de stimuli membranaires. Peu d'études sont cependant réalisées sur ce type de récepteur.

Quel que soit l'HK on retrouve dans la partie C-terminale hautement deux domaines catalytiques de structure conservée dont la présence conditionne l'activité de l'HK (Casino *et al.*, 2014).

- Le premier domaine, nommé **DHp** (**D**imerization **H**istidine **p**hosphotransfer domain) est le siège de la dimérisation de récepteurs. Il contient un résidu histine phosphorylable
- Le second domaine, nommé **CA** (**C**atalytic **A**T**P**-binding domain) est responsable de la liaison d'une molécule d'ATP (Marina *et al.*, 2005 ; Bilwes *et al.*, 2001). De nombreuses études ont démontré une dimérisation de nombreux récepteurs HK bactériens et la capacité d'un monomère à phosphoryler en *trans* l'autre monomère (Wolanin *et al.*, 2002).

II.1.a - ii - Les RR

Les études menées sur les partenaires des HK précédentes, les RR, ont permis de mettre en évidence des rôles dans des processus variés mais une structure relativement conservée. Ces protéines possèdent ainsi en extrémité N-terminale un domaine receveur de phosphate conservé d'environ 120 acides aminés, le domaine REC, et une extrémité C-terminale effectrice plus variable (Gao *et al.*, 2009 ; Galperin 2009 ; 2010). Lorsque le domaine effecteur possède une capacité de liaison à l'**A**cide **D**ésoxyribo**N**ucléique (**ADN**), trois grandes familles ont été décrites selon la structure des membres caractéristiques les composants : les familles OmpR/PhoB, NtrC et NarL/FixJ (Gao *et al.*, 2007). C'est le domaine REC, site de la phosphorylation de la protéine par le biais d'un aspartate conservé, qui permettra ainsi de moduler l'activité de la partie effectrice du RR (*Figure 5*).

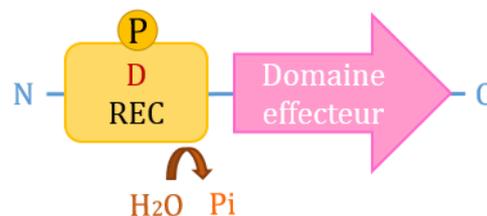


Figure 5 : schéma présentant les différents domaines des RR observés chez les bactéries.

REC représente le domaine accepteur de phosphate à activité catalytique. D représente le résidu aspartate consensus.

II.1.b - Fonctionnement classique du TCS bactérien

Lors de la perception d'un signal extracellulaire par le récepteur HK homodimérique, une autophosphorylation de ce dernier s'opère. Cette étape, liée à l'utilisation d'ATP au niveau du domaine CA de l'HK, conduit à la formation d'un groupement phosphoryl riche en énergie.

Ce groupement est ensuite transféré au niveau du résidu aspartate conservé du régulateur de réponse. Une fois phosphorylé, ce dernier pourra alors agir par liaison à l'ADN ou à l'**A**cide **R**ibo**N**ucléique (**ARN**) (Gao and Stock, 2009 ; Galperin, 2010), être engagé dans une réaction enzymatique (Simms *et al.*, 1985) ou un complexe protéique (Gao *et al.*, 2007) (*Figure 6*). Les RR pourront être autodéphosphorylés ou déphosphorylés par le biais de l'HK (Stock *et al.*, 2000). Malgré les similarités de séquences entre RR, il semblerait que dans la plupart des cas une spécificité d'interaction a pu être observée et que chaque HK ne soit ainsi associé qu'à 1 ou 2 RR (Laub and Goulian, 2007) permettant d'aboutir à une interprétation correcte du signal en termes de réponses.

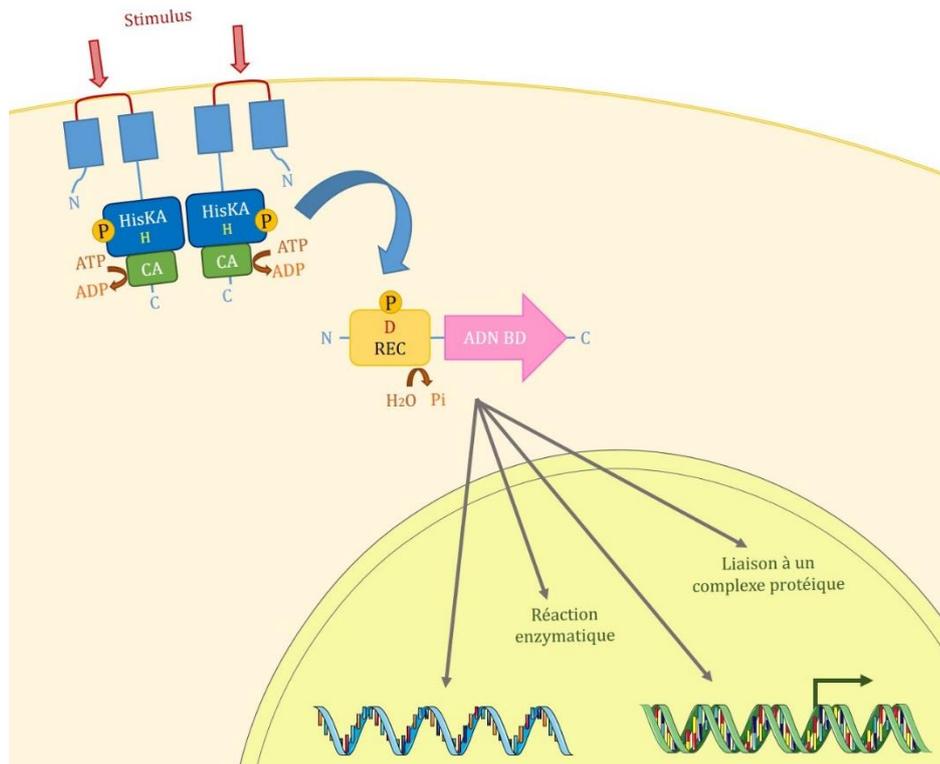


Figure 6 : schéma général du fonctionnement du système TCS bactérien.

Le domaine ADN **BD** correspond au domaine ADN **B**inding **D**omain capable d'interaction avec l'ADN. Les lettres **H** et **D** correspondent respectivement aux résidus histidine et aspartate phosphorylables conservés au sein de l'**KH** et du **RR**.

II.1.c - Exemples de TCS bactériens génériques

Parmi les nombreux partenaires de TCS identifiés chez *Escherichia coli*, les systèmes relativement canoniques EnvZ-OmpR et CheA-CheY, liés respectivement aux réponses à un stimulus osmotique et au contrôle de la mobilité bactérienne sont extrêmement bien détaillés dans la littérature. EnvZ et CheA correspondent aux récepteurs histidine aspartate kinases, alors qu'OmpR et CheY sont des RR (Figure 7).

II.1.c - i - Perception de l'osmolarité du milieu extérieur : la voie de signalisation EnvZ/OmpR chez *Escherichia coli*

Ce système est composé du récepteur HK EnvZ et du RR OmpR (Figure 7). En fonction de l'osmolarité du milieu extracellulaire, l'HK EnvZ pourra s'autophosphoryler en *trans* et transmettre le phosphate à OmpR. Dans le cas d'une hyper-osmolarité, celui-ci permettra l'expression du gène OmpC alors qu'une hypo-osmolarité conduira à l'expression du gène OmpF. Ces deux gènes codent pour des porines dont le diamètre diffère, permettant de modifier le flux de diffusion des osmolytes à travers la membrane plasmique.

II.1.c - ii - Contrôle de la mobilité : la voie de signalisation CheA/CheY chez *Escherichia coli*

Dans ce système, l'HK CheA pourra phosphoryler les RR CheY et CheB (Figure 7). A l'inverse d'EnvZ, CheA ne possède pas de domaine senseur et nécessite une protéine **Methylated Chemotaxis Protein (MCP)** afin de percevoir un changement de la composition ou du gradient chimique de l'environnement extracellulaire de la bactérie. La protéine CheW sera ensuite responsable de transmettre ce signal à l'HK (Bourret and Stock, 2002). Lors de la phosphorylation de CheY, une interaction avec les flagelles moteurs de la bactérie s'effectue, permettant ainsi la mobilité bactérienne.

Un rétrocontrôle est effectué par le biais des protéines CheZ et CheB capables respectivement de déphosphoryler CheY et de retirer le groupement méthyle de la protéine MCP.

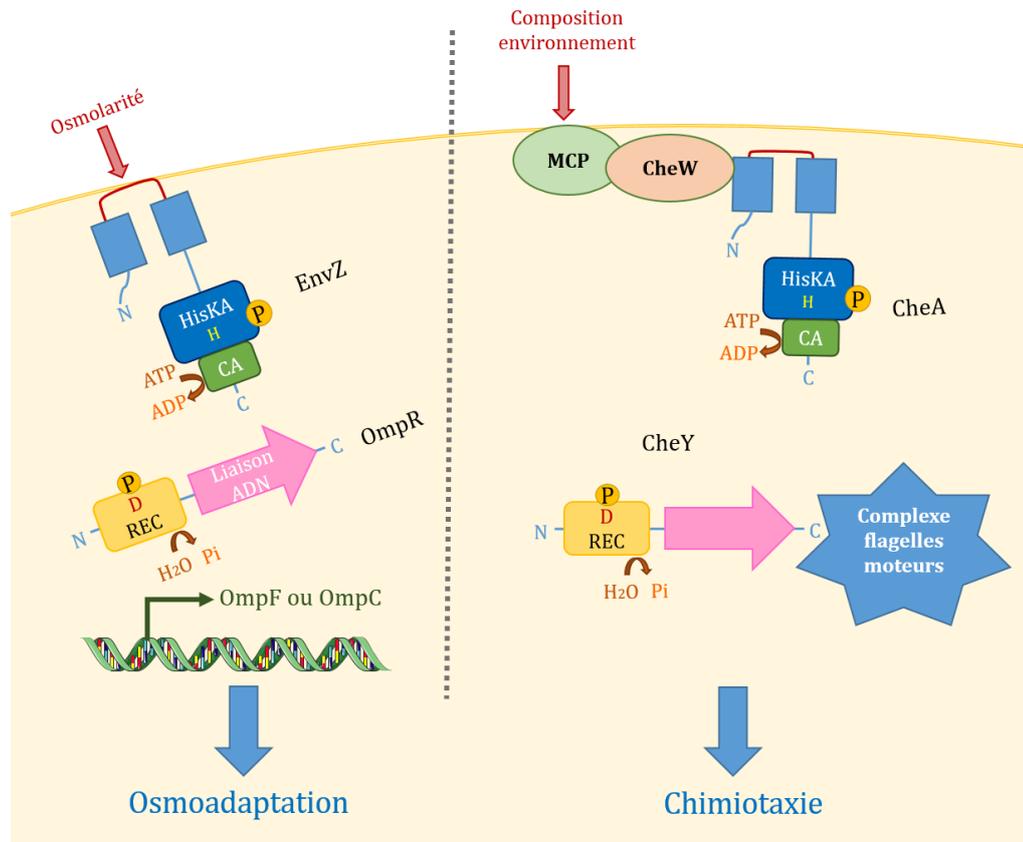


Figure 7 : schéma de deux TCS bactériens génériques, les systèmes EnvZ/OmpR et CheA/CheY. La protéine Methylated Chemotaxis portein (MCP) est représentée en vert.

II.2. Le Multi Step Phosphorelay System (MSP) eucaryote

Le MSP eucaryote est impliqué dans de nombreux processus chez les champignons, algues et plantes mais absent du règne animal (Schaller *et al.*, 2011). Ainsi, ce système a probablement été transmis depuis les bactéries vers les eucaryotes par transfert latéral de gènes. La compartimentalisation (apparition du noyau) ayant induit quelques modifications.

- Tout d'abord, le récepteur HK est qualifié d'hybride car il comporte un domaine structural supplémentaire par rapport aux récepteurs HK bactériens. En effet, en plus du domaine transmetteur de phosphate, un domaine semblable au domaine REC des RR y est retrouvé (Santos and Shiozaki, 2001 ; Schaller *et al.*, 2011), contenant comme expliqué précédemment un résidu aspartate conservé.
- La deuxième différence majeure vis-à-vis du TCS bactérien est la présence systématique des protéines appelées **H**istidine **P**hosphotransfer **p**rotein (**HPT**), partenaires intermédiaires entre le récepteur HK et le RR.
- Il est également à noter que la plupart des systèmes eucaryotes sont composés au minimum de deux types de RR, respectivement nucléaire et cytoplasmique (Fassler and West 2010).

Le MSP impliqué dans la perception de la contrainte osmotique ayant été le plus étudié est celui de la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

II.2.a - Perception du changement d'osmolarité chez la levure (*S. cerevisiae*)

Ce MSP contrôle une voie de signalisation de type cascade MAP Kinase appelée voie **H**igh-**o**smolarity **G**lycerol (**HOG**). Cette voie permet une régulation de la synthèse du glycérol, osmolyte permettant à la cellule de s'adapter aux situations d'hyper-osmolarité du milieu extérieur (Saito and Posas, 2012).

En situation d'hyper-osmolarité du milieu extracellulaire, le maintien de l'intégrité cellulaire doit être assuré. Cela s'effectue par le biais d'une osmorégulation, (contrôle actif de la balance cellulaire en eau). due à la production et l'accumulation de glycérol, osmoprotectant à effet létal en condition physiologique (Hohmann *et al.*, 2007).

Cette production de glycérol est partiellement contrôlée par la voie de signalisation HOG qui, par le biais de la phosphorylation de la protéine Hog1, (Duch *et al.*, 2012), permet l'activation de celle-ci. Cette protéine pourra ainsi prendre part à différents types de mécanismes au sein de la cellule dont la régulation des teneurs en glycérol intracellulaire. L'activation de la voie HOG se fait par le biais de deux voies distinctes, les voies Sln1 et Sho1, aboutissant toutes deux à l'activation de la protéine Hog1 (Maeda *et al.*, 1994 ; 1995). Seule Sln1 appartenant à un MSP, c'est donc cette voie de signalisation que nous aborderons plus en détail (*Figure 8*).

II.2.a - i - le MSP de levure contrôlée par Sln1

Le phosphorelais multiple Sln1-Ypd1-Ssk1 est composé du récepteur histidine kinase hybride, Sln1, de la protéine HPt, Ypd1 et du RR Ssk1.

Le récepteur hybride Sln1 possède deux domaines transmembranaires délimitant un domaine extracellulaire, et sa localisation au niveau de radeaux lipidiques présents au niveau la membrane plasmique a été établie (Maeda *et al.*, 1994 ; Posas *et al.*, 1996 ; Tanigawa *et al.*, 2012). Des hypothèses stipulent ainsi que Sln1 serait capable de percevoir les changements d'osmolarité grâce à des changements structuraux des radeaux lipidiques pouvant être dus aux fluctuations de pression osmotique (Tanigawa *et al.*, 2012).

Le second partenaire de cette voie est la protéine Ypd1. Ce partenaire est essentiel pour la transmission du signal de l'HK membranaire au RR Ssk1, permettant la survie de la cellule (Fassler and West, 2013).

Les mutations touchant ces deux gènes, Sln1 et Ypd1, s'avèrent être létales pour les levures car conduisant à l'activation constitutive de la voie HOG par absence de phosphorylation de Ssk1. (Maeda *et al.*, 1994 ; Posas *et al.*, 1996).

En condition physiologique, le récepteur Sln1 posséderait ainsi une activité kinase basale permettant la survie des levures par inactivation de la voie HOG et donc absence de production de glycérol. Cette activité kinase est rendue possible par la dimérisation du récepteur (Ostrander and Gorman, 1999 ; Tao *et al.*, 2002) et la phosphorylation en *trans* de chaque monomère. Le récepteur phosphorylé transmettra alors le groupement phosphate à Ypd1 puis à Ssk1 (Posas *et al.*, 1996).

La phosphorylation de Ssk1 aboutit à l'inactivation de cette dernière, et par voie de conséquence à l'inactivation également de la voie **M**itogen **A**ctivated **P**rotein **K**inase (**MAPK**) HOG responsable de la production de glycérol.

Les mutations touchant ces deux gènes, Sln1 et Ypd1, s'avèrent être létales pour les levures car conduisant à l'activation constitutive de la voie HOG par absence de phosphorylation de Ssk1. (Maeda *et al.*, 1994 ; Posas *et al.*, 1996).

Lors de la perception d'une hyper-osmolarité du milieu extracellulaire, l'autophosphorylation du récepteur Sln1 est réduite voire absente, conduisant à une accumulation de la protéine Ssk1 non

phosphorylée et par conséquent active. Cette protéine pourra alors se fixer aux premières **MAP Kinase Kinase Kinase (MAPKKK)** de la voie HOG qui sont les protéines Ssk2/Ssk22. Ces protéines kinases activeront alors par phosphorylation la seconde **MAP Kinase Kinase (MAPKK)** de la voie Psb2, qui elle-même activera la MAPK Hog1 (Maeda *et al.*, 1994 ; Posas *et al.*, 1996).

Un second RR, Skn7, peut être activé par la protéine Ypd1 mais le choix du partenaire se fera selon l'osmolarité du milieu extérieur et, lors d'une contrainte osmotique, c'est le RR Ssk1 qui sera recruté par Ypd1 dans la voie de signalisation.

II.2.a - ii - La voie de signalisation contrôlée par Sho1

Cette voie constitue un partenariat entre de nombreuses protéines. La perception de la contrainte osmotique semble s'effectuer par le biais de deux osmosenseurs putatifs localisés au niveau de la membrane, Msb2 et Hkr1 associés à la protéine Sho1. Concernant cette dernière protéine, un rôle d'osmosenseur a été avancé (Maeda *et al.*, 1995) mais celle-ci semblerait plutôt permettre le recrutement de nombreuses protéines au niveau de la surface cellulaire, dont Psb2. Lors d'un choc hyper-osmotique la MAPKK Ste11 est phosphorylée par les kinases Ste20 et/ou Cla4 et Psb2 se retrouve recrutée au niveau de Sho1, Ste20 et Cla4.

Ste11 phosphorylée est alors capable de phosphoryler Psb2 qui pourra phosphoryler Hog1 (Figure 8).

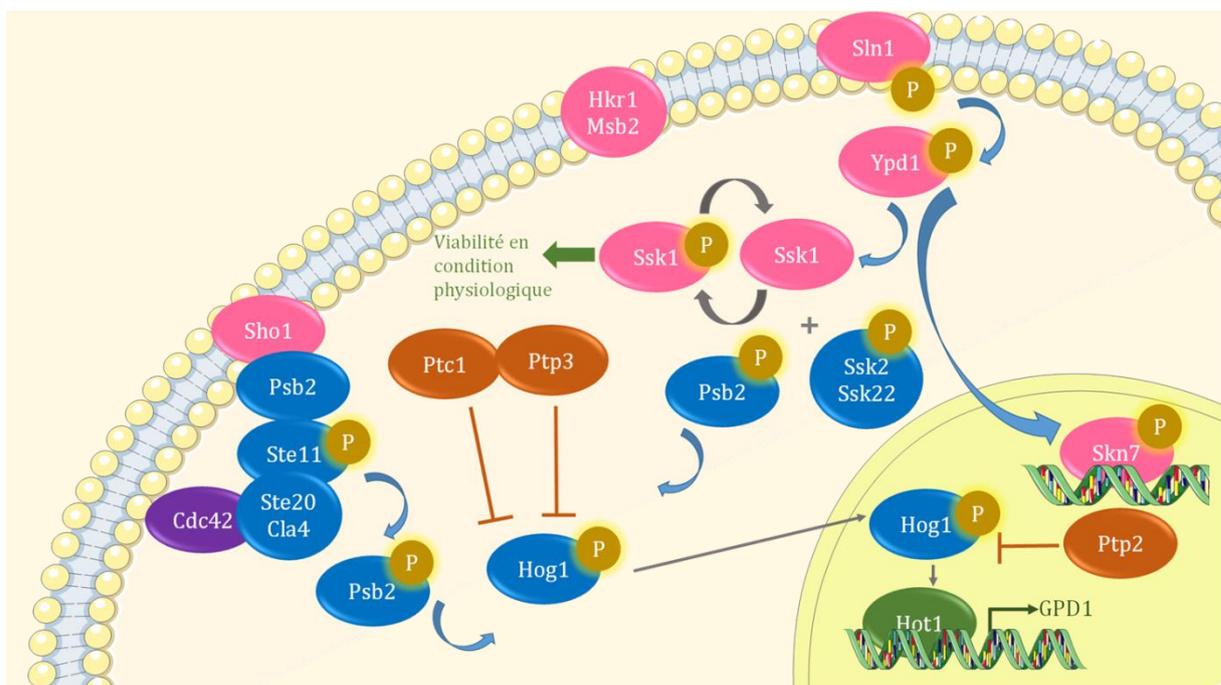


Figure 8 : schéma représentant les différents partenaires intervenants dans les deux voies de signalisation Sln1 et Sho1 impliquées dans l'osmorégulation chez la levure.

Les senseurs membranaires ainsi que les HPT et les RR sont en rose, les protéines kinases sont en bleu, les protéines en orange correspondent aux protéines à activité phosphatase et enfin les facteurs de transcription sont en vert et la protéine Cdc42 est en violet.

II.2.b - Le MSP chez les plantes

Le premier MSP végétal a été décrit chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, et depuis quelques années, le MSP d'autres espèces végétales telles que *Physcomitrella patens* (Ishida *et al.*, 2010), *Zea mays* (Wrang *et al.*, 2014), *Oriza sativa* (Pareek *et al.*, 2006), *Catharanthus roseus* (Papon *et al.*, 2006), *Lotus japonicus* (Ishida *et al.*, 2009), *Glycine max* (Mochida *et al.*, 2010), *Populus* (Chefdor *et al.*, 2006 ; Ramirez-Carvajal *et al.*, 2008 ; Bertheau *et al.*, 2012 ; 2013 ; 2015 ; Héricourt *et al.*, 2013 ; 2016, soumis) et tout récemment celui du fraisier des bois, *Fragaria vesca* (Yang *et al.*, 2016) ont été analysés

en détail. Ce travail d'analyse concerne majoritairement les voies de signalisation de deux phytohormones : les cytokinines et l'éthylène. Le lien entre cytokinines et stress hydrique ayant été démontré et explicité précédemment, nous ne développerons dans les chapitres suivants que les MSP impliqués dans la signalisation cytokinines et stress osmotique, osmosensing, chez *Arabidopsis thaliana*.

II.2.b - i - MSP impliqué dans la signalisation des cytokinines

Les cytokinines sont des molécules dérivées d'une adénine substituée en N⁶ et possédant une chaîne latérale isoprénolide (zéatine, isopentényladenine,...) ou aromatique (N⁶-benzyladenine, kinetine, ...). La conformation et la structure de cette chaîne latérale influence de manière notable les activités biologiques et les fonctions des cytokinines. En effet, une différence d'activité biologique est observable entre les deux conformations possibles de la zéatine : la *cis* ou la **trans**-zeatin (respectivement **cZ** et **tZ**), puisque la cZ, cytokinine majoritaire chez le maïs et le riz par exemple, possède une activité biologique moins importante que la tZ (Schmitz and Skoog, 1972; Kaminek *et al.*, 1987). La synthèse des cytokinines isoprénolides a été décrite dans la littérature et est catalysée par des adenosine Phosphate-IsopentenylTransferases (IPT) (Kakimoto, 2001).

La distribution dans les différents organes végétaux est également étudiée et il a été montré par exemple que la tZ serait plus distribuée au niveau de la sève brute alors que l'isoPentényladenine (iP) est retrouvée de manière majoritaire dans la sève élaborée (Lomin *et al.*, 2012).

L'origine des cytokinines aromatiques reste par contre très peu étudiée de nos jours.

Des études permettant de démontrer leur rôle prépondérant de régulateur de la différenciation cellulaire ont donc été menées, mettant en évidence l'implication des cytokinines dans de nombreux processus tels que l'activité méristématique caulinaire et racinaire, impactant la formation des feuilles et des racines (Werner *et al.*, 2003). Ce sont des phytohormones particulièrement importantes dans le développement des plantes. Plus récemment, le rôle des cytokinines dans la réponse des plantes aux stress environnements dont la sécheresse a été démontré (Ha *et al.*, 2012).

Les récepteurs aux cytokinines

Les récepteurs aux cytokinines AHK2, AHK3 et AHK4/CRE1/WOL ont pu être mis en évidence par différentes études en 2001 et ont servi de base à de nombreuses études fonctionnelles et structurales (Inoue *et al.*, 2001; Ueguchi *et al.*, 2001; Yamada *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2001 ; Horák *et al.*, 2011). Ceux-ci possèdent un domaine de perception du stimulus appelé domaine **CHASE** (Cyclase/Histidine-kinase Associated Sensory Extracellular domain). Il est présent chez certaines HK transmembranaires (HK, diguanylate- et adenylyl cyclases) des procaryotes et des plantes (Mougel and Zhulin, 2001). Le rôle de ce domaine dans la fixation des cytokinines a été mis en évidence en 2001 (Anantharaman and Aravind, 2001; Mougel and Zhulin, 2001) et les acides aminés potentiellement impliqués dans cette fixation ont par la suite été étudiés (Heyl *et al.*, 2007) menant finalement à la résolution de la structure de ce domaine en liaison avec des CK (Hothorn *et al.*, 2011)

Le récepteur, appelé Cytokinine Indépendant **1** (**CKI1**), est paradoxalement un récepteur incapable de fixer les CK (Yamada *et al.*, 2001) puisqu'il ne possède pas de domaine CHASE. Il est cependant impliqué dans des processus biologiques et physiologiques liés aux cytokinines (Kakimoto, 1996). L'expression de CKI1 a été observée au niveau des fleurs, des siliques et au sein de la tige (Hejátko *et al.*, 2009 ; Deng *et al.*, 2010) suggérant un rôle de ce récepteur dans le développement au sein des pousses aériennes chez *Arabidopsis* (Pischke *et al.*, 2002 ; Hejátko *et al.*, 2003 ; 2009 ; Deng *et al.*, 2010).

L'expression des récepteurs AHK2, AHK3 et AHK4 semble se produire dans tous les tissus mais il est cependant à noter que, conformément au rôle établi des CK dans le développement de la plante, l'expression majoritaire des récepteurs au CK se situe au niveau des tissus méristématiques. AHK2 et

AHK3 seraient également majoritairement présents au niveau des pousses aériennes alors que l'expression de AHK4 aurait été plus observée au niveau racinaire (Ueguchi *et al.*, 2001; Higuchi *et al.*, 2004). La localisation intracellulaire a été récemment établie au niveau du réticulum endoplasmique par des études de fractions membranaires, par construction de protéines de fusions couplées à la **Green Fluorescent Protein (GFP)** ainsi que par des études de reconstitution de fluorescence biomoléculaire ou **Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC)** (Wulfetange *et al.*, 2011; Caesar *et al.*, 2011). Si ces récepteurs se localisent majoritairement au niveau du réticulum, une petite fraction de ces récepteurs peut également être retrouvée au niveau de la membrane plasmique.

Les différentes cytokinines existantes semblent posséder des affinités de fixation distinctes selon le récepteur considéré pouvant être mis en relation avec une potentielle co-existence ligand-récepteur au sein de la plante et suggérant des rôles physiologiques différents. Par exemple, l'iP sera fixée de manière très affine par AHK2 et AHK4, la dihydrozeatine (**DZ**) sera, elle, préférentiellement fixée par AHK3 et la tZ possèdera une affinité plus ubiquitaire vis-à-vis des récepteurs (Spíchal *et al.*, 2004; Stolz *et al.*, 2011; Romanov *et al.*, 2006).

Ainsi, au niveau mécanistique, la fixation des cytokinines à l'HK provoquerait un changement conformationnel conduisant à l'autophosphorylation du récepteur au niveau de l'histidine conservée du domaine Dhp (Miwa *et al.*, 2007; Hothorn *et al.*, 2011). Au sein de la portion cytoplasmique des HK, la fonction clé des résidus phosphorylables histidine (Mähönen *et al.*, 2006) et aspartate conservés a été montrée par mutation, conduisant à la perte de fonction des HK mutées (Inoue *et al.*, 2001). La capacité d'homodimérisation et d'hétérodimerisation des HK a pu être observée selon différentes modalités. AHK2, AHK3 et AHK4 sont ainsi capables de former des homodimères *in vitro* lorsque leur **Partie Cytoplasmique (CP)** est utilisée (Dortay *et al.*, 2006) et *in planta* en utilisant les protéines entières (Wulfetange *et al.*, 2011; Caesar *et al.*, 2011). L'hétérodimerisation des CP de AHK2 et AHK3 (Dortay *et al.*, 2006) ainsi que des CP et protéines entières de AHK3 et AHK4 ont également été observées (Dortay *et al.*, 2006; Caesar *et al.*, 2011).

Les protéines HPT

Ces protéines navettes, AHP, sont présentes au nombre de 5 chez *Arabidopsis* (Suzuki *et al.*, 1998, 2000) et possèdent une localisation nucléo-cytoplasmique (Dortay *et al.*, 2008; Punwani *et al.*, 2010; Punwani and Kieber, 2010) qui semblerait indépendante des signaux perçus (Punwani *et al.*, 2010; Punwani and Kieber, 2010; Jeon and Kim, 2013).

La structure des HPT a pu être élucidée par étude cristallographique et rayon X (Sugawara *et al.*, 2005a, 2005b) et un résidu histidine conservé est retrouvé au sein de la séquence. Une sixième protéine AHP a également été décrite comme possédant un résidu asparagine à la position du résidu histidine conservé. Cette protéine a donc été qualifiée de pseudo-HPT (Suzuki *et al.*, 2000). Au même titre que les récepteurs, la capacité des AHP à former des homo- et/ou hétérodimères a été validée chez la levure (Dortay *et al.*, 2006) et *in planta* (Punwani *et al.*, 2010).

Une distribution tissu-spécifique de certaines AHP, AHP1, 2, 4 et 6, ou plus ubiquitaire concernant AHP3 et 5, a pu être observée, laissant présager d'une spécificité de fonction des premières (Suzuki *et al.*, 1998; 2000; Tanaka *et al.*, 2004; Mähönen *et al.*, 2006). La transcription des gènes *AHP1*, 2, 3 et 4 (mais pas *AHP5*) est positivement régulée par apport de CK exogènes ou par induction des CK endogènes (Hradilová *et al.*, 2007).

Dans le cas de la signalisation cytokinines, des études ont été effectuées, permettant d'établir leur rôle de régulateur positif de la signalisation CK (Mähönen *et al.*, 2000; Hutchison *et al.*, 2006; Suzuki *et al.*, 2002).

Le rôle des AHP2, 3 et 5 comme régulateurs négatifs de la réponse au stress hydrique a également été mis en évidence par réalisation de mutants simples ou multiples perte de fonction pour une de ces AHP (Nishiyama *et al.*, 2013). Cette régulation négative met en évidence des attributions indirectes des protéines HPT : servir de point de contrôle supplémentaire à la régulation d'une voie de signalisation donnée notamment par action de phosphatases spécifiques ou bien permettre la communication de plusieurs voies de signalisations (Urao *et al.*, 2000).

Des études d'interaction entre récepteurs aux CK et les AHP ont été menées et ont permis de montrer des interactions avec les AHP1, 2, 3 et 5 pour les trois récepteurs, *a minima* dans le système levure (Suzuki *et al.*, 2000 ; Dortay *et al.*, 2006).

On constate ainsi que le réseau interactionnel des AHP est large, puisque ces protéines dont la fonction est d'interagir à la fois avec les HK et les RR se révèlent capables d'interagir avec la quasi-totalité de ces deux partenaires (Scharein *et al.*, 2008 ; Urao *et al.*, 2000 ; Dortay *et al.*, 2006 ; Suzuki *et al.*, 2000 ; Mira-Rodado *et al.*, 2012 ; Bauer *et al.*, 2013 ; Pekárová *et al.*, 2011; Dortay *et al.*, 2008; Horák *et al.*, 2008 ; Lohrmann *et al.*, 2001 ; Imamura *et al.*, 1999 ; Veerabagu *et al.*, 2012). Cependant, dans la littérature, des cas de spécificités d'interaction et de différences d'affinités selon les partenaires envisagés ont pu être établis (Urao *et al.*, 2000 ; Pekárová *et al.*, 2011 ; Verma *et al.*, 2015).

Les RR

Dans le génome d'*Arabidopsis*, 23 gènes codant pour des ARRs sont retrouvés (Schaller *et al.*, 2008).

Ces protéines possèdent généralement un motif conservé appelé motif DDK comprenant deux résidus aspartate (D), dont le deuxième est le résidu phosphoaccepteur du groupement phosphoryle provenant de l'HPT (Suzuki *et al.*, 1998; D'agostino *et al.*, 2000 ; Imamura *et al.*, 2001; 2003; Kiba *et al.*, 2004; Mähönen *et al.*, 2006), et un résidu lysine (K) conservés. Les RR sont répartis en plusieurs groupes selon leur structure et leurs fonctions putatives (*Figure 9*).

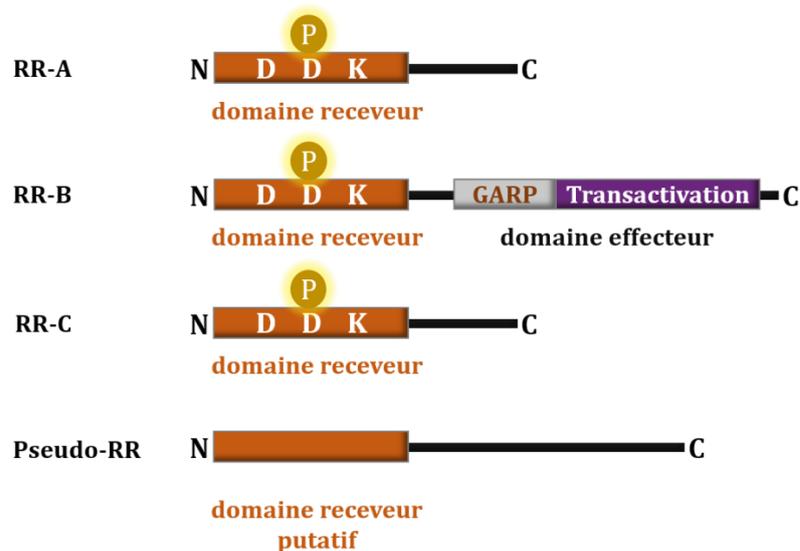


Figure 9 : schéma des différents domaines présents pour les familles de RR chez Arabidopsis.

D et *K* représentent respectivement les résidus aspartate et lysine consensus, *GARP* (Golden/ARR/Psr1) représente le domaine permettant la liaison à l'ADN et *Trans-activation* le domaine riche en prolines et en glutamines responsable de l'activation de la transcription.

- Les RR-A -

Chez *Arabidopsis*, les ARR-A sont codés par 10 gènes (ARR3 à 9 et 15 à 17) regroupés par paires (To *et al.*, 2004).

Leur structure est composée d'un domaine receveur de phosphate consensus à leur extrémité N-terminale et une extrémité C-terminale de taille réduite comparée à celle des RR-B (Imamura *et al.*, 1999). Cette structure est par conséquent fortement similaire au RR bactérien CheY dépourvu de domaine effecteur (D'Agostino and Kieber, 1999).

Leur expression est induite par les cytokinines (D'Agostino *et al.*, 2000 ; Hwang and Sheen, 2001) En effet, l'expression physiologique des différentes protéines RR-A varie au niveau des différents tissus de la plante mais en présence de CK, tous des RR-A voient leur expression augmenter au niveau de l'ensemble des tissus, mais de manière privilégiée au niveau racinaire (To *et al.*, 2004), de manière rapide et non homogène selon le RR considéré (Taniguchi *et al.*, 1998; D'Agostino *et al.*, 2000; Rashotte *et al.*, 2003). Par le biais de cette régulation, ces protéines exercent un rétrocontrôle négatif sur la voie de signalisation des cytokinines (Hwang and Sheen, 2001; Sakai *et al.*, 2001). En effet, certaines études rapportent un mécanisme transcriptionnel indépendant de la synthèse *de novo* de protéines, laissant à penser que les RR-A seraient des gènes de réponse primaires au CK (Brandstatter and Kieber, 1998; D'Agostino *et al.*, 2000).

- Les RR-B -

Les ARR-B, présents au nombre de 11 chez *Arabidopsis* (ARR 1 et 2, 10 à 14 et 18 à 21), ne sont pas induits par les cytokinines (D'Agostino *et al.*, 2000 ; Hwang and Sheen, 2001).

La structure cristallographique du domaine receveur d'un RR-B bactérien a pu être résolue et une topologie composée de 5 feuillets β entourés de 5 hélices α a été décrite (Hosoda *et al.*, 2002).

Ces protéines de localisation nucléaire (Sakai *et al.*, 2000 ; Imamura *et al.*, 2001 ; Mason *et al.*, 2004 ; Dortay *et al.*, 2008 ; Veerabagu *et al.*, 2012) possèdent à leur extrémité N-terminale le domaine receveur de phosphate consensus. En l'absence de celui-ci ou lors de la mutation de l'aspartate central de ce domaine en un résidu mimant une phosphorylation constitutive, une activité constitutive indépendante de l'apport de cytokinines du domaine effecteur a pu être observée (Sakai *et al.*, 2001; Imamura *et al.*, 2003; Tajima *et al.*, 2004) suggérant un possible rétrocontrôle négatif du domaine receveur sur le domaine effecteur (Sakai *et al.*, 2000), cet effet étant probablement supprimé *via* la phosphorylation du résidu aspartate.

Un domaine Golden/ARR/Psr1 (**GARP**), domaine Myb-like de liaison à l'ADN, ainsi qu'un domaine de *trans-activation* sont présents à l'extrémité C-terminale des RR-B (Hwang and Sheen, 2001 ; Gupta and Rashotte, 2012).

De par la présence de ces différents domaines fonctionnels et sur la base de tests de liaisons à l'ADN, d'immunoprécipitation de la **chromatine (ChIP)** et de tests de *trans-activation*, la fonction de facteur de transcription des RR-B a pu être mise en évidence. Les ARR-B sont en effet capables de se fixer sur la séquence consensus (G/A)GAT(T/C). De manière intéressante, cette séquence est présente au sein des promoteurs de certains RR-A (Rashotte *et al.*, 2003) validant l'hypothèse d'une régulation, *a minima* partielle, des RR-A par les RR-B dans la voie de signalisation liée aux cytokinines (Hwang and Sheen 2001 ; Sakai *et al.*, 2001). Cette régulation pourrait provenir d'une potentielle existence d'une compétition entre les RR-A et les RR-B pour l'acquisition du phosphate cédé par l'HPt.

Par étude de similarités au sein du domaine receveur de phosphate, trois sous-familles de RR-B ont pu être déterminées (Mason *et al.*, 2004).

La sous-famille I est la plus représentée et comporte les ARR1 et 2, 10 à 12 14 et 18. Des études de la localisation de ces protéines ont été menées et ont permis de mettre en évidence une expression dans les feuilles (à l'exception de l'ARR18), les fleurs et les siliques de l'ensembles des membres de ce groupe, ainsi qu'une expression supplémentaire dans les racines et les tiges pour les ARR1, 2, 10, 11, et 12.

Les ARR1, 10, 11, 12 et 18 ont d'ores et déjà été identifiés comme impliqués dans les réponses aux CK (Hwang and Sheen, 2001 ; Sakai *et al.*, 2001 ; Imamura *et al.*, 2003 ; Yokoyama *et al.*, 2006 ; Ishida *et al.*, 2008 ; Veerabagu *et al.*, 2012 ; Nguyen *et al.*, 2016) et l' ARR18 et le seul membre parmi tous a avoir été formellement identifié comme impliqué dans la réponse à la sécheresse (Veerabagu *et al.*, 2014). Dans le cas de l'implication des RR-B dans d'autres voies de signalisation, l'ARR2 a été suggéré comme pouvant participer à la signalisation de l'éthylène (Hass *et al.*, 2004).

La sous-famille II contient les ARR13 et 21, possédant la même localisation de leurs séquences introniques dans la partie C terminale de la protéine (Mason *et al.*, 2004). Par une étude de fusion au gène rapporteur *GUS*, il a été montré une expression de l'ARR13 dans les feuilles jeunes et matures ainsi que dans le tissu vasculaire (Mason *et al.*, 2004). Une approche par étude des niveaux de transcrits par **Rétro**Transcription puis **PCR (RT-PCR)** a permis d'établir la présence de l'ARR21 au niveau des fleurs et des siliques (Mason *et al.*, 2004 ; Tajima *et al.*, 2004).

La sous-famille III comporte les ARR19 et 20. Il a pu être montré une expression de l'ARR19 dans les siliques par RT-PCR et, par la même approche que précédemment, dans les trichomes (Mason *et al.*, 2004 ; Tajima *et al.*, 2004). Une expression de l'ARR20 dans les pistils matures, les tissus vasculaires et le méristème apical a également été mise en lumière (Mason *et al.*, 2004 ; Tajima *et al.*, 2004)..

D'un point de vue mécanistique, les RR-B étant des facteurs de transcription, leur capacité de dimérisation a été étudiée. Une homodimérisation du RR14 (Dortay *et al.*, 2006) et du RR18 (Veerabagu *et al.*, 2012) ont été observées en levure et en plante. Une hétérodimérisation entre l'ARR14 et l'ARR2 a également été observée (Dortay *et al.*, 2006) mais seulement par la technique *in vitro* « Glutathion **S**-Transférase (**GST**)-pull down »

Au niveau du MSP, la capacité d'interaction des RR-B avec les différentes HPT ont été testées dans différents systèmes biologiques et par plusieurs techniques et ont permis de mettre en évidence des interactions avec les AHP1, 2, 3 et 5 (Imamura *et al.*, 1999; Dortay *et al.*, 2006; 2008; Veerabagu *et al.*, 2012).

- Les RR-C -

Le groupe des ARR-C est représenté par les RR22 et 24 chez *Arabidopsis* (Pils and Heyl, 2009). De structure similaire aux RR-A, l'expression des RR-C n'est cependant pas induite par les cytokinines (Kiba *et al.*, 2004 ; Mizuno, 2004 ; Gattolin *et al.*, 2006 ; Horàk *et al.*, 2008) ce qui a conduit à leur séparation récente du groupe des RR-A auquel ils étaient rattaché par le passé. La séquence générale en acides aminés du domaine receveur de ces protéines est cependant différente de celles des ARR-A et ARR-B, ce qui suggère un rôle différent de cette famille d'ARR, et elle se rapproche plus du domaine receveur des AHKs (Kiba *et al.* 2004 ; Schaller *et al.* 2008). Une hypothèse serait que les RR-C seraient des récepteurs dégénérés possédant une évolution différente de celle des ARR-A et B (Gruhn *et al.*, 2014).

Les transcrits de ces deux RR seraient principalement présents au niveau des fleurs et des siliques, indiquant un rôle de ces RR dans le développement (Kiba *et al.*, 2004 ; Mizuno, 2004 ; Gattolin *et al.*, 2006 ; Horàk *et al.*, 2008).

- Les Pseudo-RR -

Il existe également des **Pseudo-RR**, nommés **APRR**, chez *Arabidopsis*. Ceux-ci ne possèdent pas de domaine receveur de phosphate canonique (Makino *et al.*, 2000). En effet, le résidu aspartate phosphorylable et normalement conservé est remplacé par un résidu glutamate, glutamine ou asparagine au sein de ces RR (Hwang *et al.*, 2002). Au sein de ces protéines, de localisation nucléaire putative (Makino *et al.*, 2000), PRR3, 5, 7 et 9 ont déjà été identifiés comme impliqués dans le mécanisme moléculaire de l'horloge circadienne (Makino *et al.* 2000 ; Matsushika *et al.* 2002 ; Strayer *et al.* 2000 ; Eriksson *et al.* 2003 ; Farré *et al.* 2005 ; 2007 ; Nakamichi *et al.* 2005a, 2005b ; Matsushika *et al.*, 2007a ; 2007b ; Mizuno *et al.*, 2014).

II.2.b - ii - MSP impliqué dans la signalisation de la sécheresse ou stress osmotique : Osmosensing

Le récepteur

Sur la base du modèle de voie de signalisation permettant la perception de la contrainte osmotique chez la levure, l'existence d'un récepteur de type HK homologue à l'osmosenseur de levure Sln1 a été démontrée (Urao *et al.*, 1999). Ce récepteur a été nommé AHK1 et son rôle en tant qu'osmosenseur a été établi par le biais de sa capacité à compléter une souche de levure déficiente pour les récepteurs Sln1 et Sho1 (*sln1Δ sho1Δ*), normalement sensible à une hyper osmolarité du milieu de culture (Urao *et al.*, 1999). *In planta*, le rôle de récepteur de la sécheresse a également pu être mis en évidence (Tran *et al.*, 2007). Lors de cette étude, la surexpression de cette protéine a permis d'apporter une meilleure tolérance des mutants à une contrainte hydrique. Cette étude est confortée par le fait que des mutants déficients pour le gène *ahk1* se révèlent plus sensibles lors de l'application d'une contrainte hydrique (Wohlbach *et al.*, 2008) et saline (Tran *et al.*, 2007). Cependant le rôle d'osmosenseur d'AHK1 a été remis en cause par l'étude de Kumar *et collaborateurs* en 2013 car il semblerait que l'expression de gènes liés à la synthèse d'agents osmolytes ne soit pas contrôlée par ce récepteur. Les auteurs concluent néanmoins que même si leur étude démontre que AHK1 ne serait selon eux pas un osmosenseur au sens de la régulation de gènes liés à la régulation osmotique, AHK1 serait tout de même impliqué dans le contrôle de l'état hydrique des plantes notamment par le biais de la régulation de la densité stomatique.

Au niveau structurel, la présence de deux domaines transmembranaires permet d'attester de la localisation membranaire de cette protéine (Caesar *et al.*, 2011).

L'analyse de l'expression des transcrits de ce récepteur montre que ce gène s'exprime majoritairement au niveau racinaire (Urao *et al.*, 1999) et se trouve modulée par de nombreux stress (déshydratation, NaCl, et froid) (Urao *et al.*, 1999; Tran *et al.*, 2007).

Les HPTs

Chez *Arabidopsis*, des études d'interactions menées entre AHK1 et les protéines AHP1, 2 et 3 n'ont montré d'interaction qu'entre AHK1 et AHP2 (Urao *et al.*, 2000). Cette étude a ainsi pu mettre en évidence une spécificité d'interaction du récepteur AHK1 vis-à-vis d'une seule protéine navette au contraire des récepteurs aux CK, affichant une plus large spécificité d'interaction. Cependant, l'étude n'ayant pas englobé les deux autres AHP (AHP4 et 5) présentes chez *Arabidopsis*, ces conclusions sont

donc toutefois à moduler. Il résulte de ces données qu'AHP2 pourrait correspondre à l'HPT navette entre AHK1 et des RR lors de la signalisation sécheresse. Par contre, les travaux de [Nishiyama et collaborateurs](#) en 2013 sur des mutants n'exprimant pas les AHP2, 3 et 5 aboutissent à la mise en évidence que ces AHP agissaient comme des régulateurs négatifs de la réponse des plantes à la sécheresse.

Ces résultats confortent l'implication de ces HPT dans la voie de signalisation CK mais posent la question du rôle d'AHP2 en tant que protéine navette de la voie de signalisation de la sécheresse. Ce point chez *Arabidopsis* reste encore en suspens.

Les RR-B

Dans le cadre de l'identification de la voie de type MSP impliquée dans la signalisation de la sécheresse chez *Arabidopsis*, des études ont été menées afin d'identifier les RR-B pouvant être sous le contrôle de AHK1. Même si à ce jour, ces études sont très peu nombreuses, certaines ont pu aboutir à la mise en évidence de l'implication de certains RR comme important dans la réponse à cette contrainte.

D'une part, des RR agissant comme régulateurs positifs de la réponse au stress osmotique ont pu être identifiés à l'instar de l'ARR18, particulièrement étudié. L'analyse des taux d'expression de ce RR ont montré une forte augmentation après application de PolyÉthylène Glycol 6000 (PEG₆₀₀₀) à 10%, démontrant que ce RR est un régulateur positif de la réponse ([Veerabagu et al., 2014](#)). Cette étude a également permis de montrer une capacité d'action de ce RR-B sur le promoteur du gène de l'enzyme *Proline Dehydrogenase 1 (PDH1)*, la proline étant connue pour être un métabolite sollicité en réponse à la contrainte osmotique ([Yoshida et al., 1997](#)).

D'autre part, d'autres RR ont par contre été identifiés comme régulateurs négatifs. Ces RR, ARR1, 10 et 12, ont été isolés initialement en tant que facteurs de transcription impliqués dans la régulation positive de gènes liés aux CK ([Yokoyama et al., 2006](#) ; [Ishida et al., 2008](#) ; [Nguyen et al., 2016](#)). Des études menées sur des triples mutants de ces ARR a conduit à la mise en évidence de la fonction de régulateurs négatifs de la réponse à la sécheresse pour ces RR ([Nguyen et al., 2016](#)).

Les RR-C

Comme mentionné plus haut, on dénombre 2 ARR-C chez *Arabidopsis* (ARR22 et 24). Une étude assez récente réalisée à partir de plants d'*Arabidopsis* surexprimant l'ARR22 a permis de démontrer le rôle positif joué par cet ARR dans la tolérance des plantes à la sécheresse *via* une protection de la membrane plasmique. Cet ARR aurait donc un rôle important dans le maintien de l'intégrité membranaire et son activité phosphatase mise en évidence au cours de cette étude en serait responsable ([Kang et al., 2013](#)).

Les Pseudo-RR

Chez *Arabidopsis* comme chez les autres espèces végétales, le rôle des PRR est très peu connu. Les protéines CalModuline-Like (CML) sont des protéines qui, pour certaines, ont été identifiées comme pouvant être impliquées dans la tolérance des plantes à la sécheresse comme c'est le cas de CML9 ([Magnan et al., 2008](#)). Lors d'une étude d'interactome pour CML9, [Perochon et collaborateurs](#) ont mis en évidence en 2010 une interaction particulière avec PRR2, un Pseudo-RR d'*Arabidopsis*. Cette capacité d'interaction entre CML9 et PRR2 permet d'entrevoir une relation entre les voies de signalisation calcique et MSP dans le cas de la tolérance à la sécheresse.

La régulation du gène codant ce PRR par la sécheresse vient conforter cette hypothèse d'un rôle possible de ce PRR dans la réponse et la tolérance des plantes à la sécheresse.

II.3. Interconnexions entre les voies MSP cytokinines, osmosensing, et ABA

Lors de la vie de la plante et comme précédemment évoqué, des interconnexions s'effectuent entre différentes voies de signalisation afin de permettre l'apport d'une réponse la plus adaptée possible à un stimulus perçu. Un exemple de cette interaction est la capacité de régulation médiée par l'ABA de la croissance des racines en condition de stress osmotique. En effet, il a été récemment montré que lors de la perception d'un stress osmotique au niveau de ce tissu, les réponses à l'ABA se trouvent décuplées et permettent une modulation des voies de signalisation des CK, des auxines et de l'éthylène (Rowe *et al.*, 2016).

Dans l'étude de Tran et collaborateurs en 2007, les points suivants ont été clairement établis :

AHK1 agit comme un régulateur positif dans la signalisation du stress osmotique/sécheresse. Des plants surexprimant AHK1 sont plus tolérants et des plants mutants ne l'exprimant sont plus sensibles. L'insensibilité de ces mutants à l'ABA indique qu'AHK1 est un régulateur positif de la voie de signalisation ABA. Les résultats de cette étude sont corroborés par ceux obtenus par Kumar et collaborateur en 2013.

AHK2, 3 et 4 agissent comme des régulateurs négatifs dans la signalisation du stress osmotique/sécheresse. Des plants mutants n'exprimant plus ces récepteurs s'avèrent être plus tolérants à la sécheresse. De même, l'hypersensibilité de ces mutants pour l'ABA démontre que ces récepteurs sont des régulateurs négatifs de la voie de signalisation ABA.

En conclusion, l'ensemble des études menées à ce jour permettent d'établir qu'il existe de nombreuses communications entre les différentes voies de signalisation pour assurer l'ensemble des fonctions de la plante, en particulier en ce qui concerne les voies MSP et ABA. Décrypter les voies de signalisations constitue un enjeu majeur dans l'optique de comprendre les mécanismes de tolérance des plantes à la sécheresse et d'améliorer la résistance de celles-ci aux stress subis.

III. Le peuplier

III.1. Le peuplier : un arbre aux intérêts multiples

Appartenant, au même titre que le saule et l'osier, à la famille des Salicacées mais au genre *Populus*, le peuplier est une plante pérenne largement distribuée dans l'hémisphère nord et, de par son importance agricole au niveau mondial, il est également retrouvé dans l'hémisphère sud (Dickmann and Kuzovkina, 2008).

Six sections taxonomiques peuvent être établies sur la base de critères écologiques et morphologiques différents (*Tableau 1*).

Section	Aire géographique
Abaso	Mexique
Turanga	Bassin Méditerranéen
Leucoides	Sud-est de l'Amérique du Nord et en Extrême-Orient
Aigeiros (peupliers noirs)	Zone tempérée de l'hémisphère Nord
Tacamahaca (mûriers)	Asie, Amérique du Nord
Populus	Hémisphère Nord

Tableau 1 : Sections botaniques regroupant les différentes espèces du genre *Populus* et leur répartition géographique.

Le peuplier est un arbre dioïque à feuilles caduques, à croissance et à maturité sexuelle rapides par rapport à la majorité des arbres. Sa floraison se déroule de mars à avril, sous forme de chatons pendants, pollinisés majoritairement par le vent et de manière moins importante par l'eau sur une distance maximale de quelques kilomètres (Imbert and Lefèvre, 2003 ; Rathmacher *et al.*, 2010). Les individus mâles possèdent des fleurs comportant de nombreuses étamines dont l'anthere est rougeâtre, alors que les individus femelles possèdent des ovaires uniloculaires à deux, trois ou plus rarement quatre carpelles. La fructification s'effectue par le biais d'une capsule contenant des graines d'aspect cotonneux. Après un transport par l'air ou l'eau, les graines pourront ensuite germer en quelques heures ou quelques jours, sous réserve de conditions de températures favorables et de présence de sédiments frais et humides tels que le limon, ou le sable présent en bord de rivière. En sus de cette reproduction sexuée naturelle, il est possible de recourir au bouturage dans les exploitations.

Une forte consommation en eau lui est néanmoins généralement nécessaire dans ces différentes zones géographiques afin d'assurer sa croissance rapide, permettant la formation de ripisylves ou forêts alluviales.

Le peuplier possède des caractéristiques naturelles d'intérêt. Tout d'abord, sa croissance est rapide, permettant une forte productivité de cet arbre. Cependant, cette croissance est inféodée à la présence d'eau comme explicité précédemment. De plus, de nombreuses possibilités de propagation sont disponibles, telles que le drageonnage ou le bouturage, méthodes très accessibles. Enfin la présence d'une grande variabilité génétique, probablement due à la forte répartition terrestre de cet arbre, représente une possibilité de sélection d'un large éventail de caractères d'intérêt pour la populiculture.

III.1.a - Portées économique et écologique du peuplier

Le peuplier possède de nombreux caractères d'intérêt écologiques et économiques. D'un point de vue écologique, il participe par le biais de son réseau racinaire développé au maintien des reliefs des zones alluviales et à la dépuración en nutriments excédentaires de ces zones. De plus, de par son système racinaire développé et sa forte production de biomasse, le peuplier semble pourvu d'une grande capacité de phytoremédiation à spectre large. Il a par exemple été montré que le peuplier était capable d'extraire du sol le chlorpyrifos (Lee *et al.*, 2012), un insecticide organophosphoré très largement utilisé et responsable de la mort de nombreux organismes animaux et terrestres dont l'Homme. D'autres études ont permis de mettre en évidence les capacités phytoremédiatrices et/ou phytostabilisatrices du peuplier vis-à-vis des métaux lourds tels que le cuivre, le cadmium ou bien le

zinc (Durand *et al.*, 2010a ; 2010b ; 2011 ; Guerra *et al.*, 2011 ; Cocozza *et al.*, 2015 ; Lomaglio *et al.*, 2015).

D'un point de vue économique, le peuplier tient une place de choix puisque après la Chine qui compte 4.3 million d'hectares de production, la France est le second pays producteur de peuplier dans le monde (240000 hectares). En France, les trois territoires populicoles les plus importants sont la Picardie et le Bassin Parisien, la région Poitou-Charentes et le bassin Aquitain, et la région Centre et la basse vallée de la Loire. L'intérêt économique important de la populiculture au niveau mondial a ainsi mené à la création de nombreuses institutions telles que la Commission du Peuplier en 1942, la Commission Internationale du Peuplier en 1947 visant à promouvoir la culture et la conservation du Peuplier et regroupées par la **FAO** (pour **F**ood and **A**griculture **O**rganization of the United Nations ou Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture), l'association Pro-Populus, association européenne du peuplier permettant de mettre en relation les différents acteurs industriels ou enfin en 2001, le **G**roupement d'**I**ntérêt **S**cientifique (**GIS**) regroupant l'institut technologique **FCBA** (**F**orêt **C**ellulose **B**ois-construction **A**meublement), l'**IR**STEA (Institut **N**ational de **R**echerche en **S**ciences et **T**echnologies pour l'**E**nvironnement et l'**A**griculture) et l'**IN**RA (Institut **N**ational de la **R**echerche **A**gronomique), permettant de fédérer les études d'amélioration génétique du peuplier.

Son usage est adopté à la fois dans les industries du déroulage comprenant elle-même les emballages légers ainsi que le contreplaqué et le déroulage pour contreplaqué mais également lors de la production de pâte à papier, dans le domaine de la combustion, et le sciage (composé de la formation de palettes, caisseries et literies).

La forte utilisation du bois de peuplier dans l'industrie a permis la création de nombreux cultivars, ajoutant à une diversité d'espèces naturelles importante due à une facilité naturelle de croisements inter-espèces. Ces croisements ont ainsi permis de favoriser des cultivars plus tolérants à la sécheresse, (Brignolas *et al.*, 2000) aux pathogènes telle que la rouille foliaire (Duplessis *et al.*, 2009) ou au gel (Menon *et al.*, 2015).

La ressource en bois de peuplier est cependant aujourd'hui fragilisée par plusieurs facteurs dont font partie les changements environnementaux précédemment évoqués. En effet, à l'échelle de la France, les événements de sécheresses et de canicules observés ces 20 dernières années (dont l'épisode de 2003 fait partie) ont été corrélés avec l'apparition dans les peupleraies de phénomènes d'affaiblissement de l'arbre ainsi que des retards de croissance (Belrose *et al.*, 2004). De plus, d'après la **synthèse du rapport du Conseil National du Peuplier (CNP) de mars 2016**, depuis une vingtaine d'année et pour des raisons variées, le rythme de reboisement a évolué de 2,3 millions de réimplants par an au début des années 1990 à moins de 600000 plants par an en 2013. Cette baisse très significative occasionne de nombreuses inquiétudes sur le maintien futur de l'approvisionnement des industries de transformation.

De par sa forte dépendance aux ressources hydriques dans le contexte des changements climatiques, le peuplier est ainsi une espèce particulièrement touchée par les modifications de disponibilité en eau attendues dans les années à venir. En raison des nombreux enjeux économiques liés à cette espèce, la communauté scientifique s'est particulièrement intéressée au peuplier au point d'en faire un modèle d'étude.

III.1.b - Intérêts scientifiques du peuplier

En raison de l'intérêt porté ainsi à cette espèce, tant d'un point de vue écologique qu'économique, et dans l'objectif de pouvoir donner aux populiculteurs des outils afin de faire face aux contraintes hydriques plus pressantes, le séquençage du génome du peuplier a en conséquence été

réalisé en 2006 (Tuskan *et al.*, 2006). L'espèce *P. trichocarpa* a été choisie et plus particulièrement l'individu femelle Nisqualli-1 (Torr. & Gray).

Comparativement au génome de *Zea mays* ou de *Pinus taeda* (Dickmann and Kuzovkina, 2008) le génome du peuplier est de taille relativement réduite et les cellules contiennent classiquement $2n = 38$ chromosomes. De manière plus rare, des exemples de triploïdie ont été observés (Johnsson, 1942).

Ainsi, depuis le séquençage de son génome, troisième espèce végétale à bénéficier de ce progrès après *Arabidopsis* et *Oriza sativa*, il est possible d'étudier le mécanisme de nombreux processus biologiques (tels que l'établissement ou le développement du système racinaire, l'entrée en dormance des bourgeons, la résistance à des pathogènes,...). Certains de ces processus sont spécifiques des plantes ligneuses (à l'exemple de la lignification), ou suspectés comme modifiés par rapport au modèle des plantes herbacées tel qu'*Arabidopsis*, (à l'exemple de la résistance à la sécheresse). Ces phénomènes pourraient partiellement être expliqués par les phénomènes de duplications de gènes ou de recombinaison pour ces deux espèces (Singh *et al.*, 2016).

Ensuite, sa propagation par bouturage et sa croissance rapide représentent des atouts pour les études en laboratoire ou en serre. De plus, la création de peupliers transgéniques est facilitée par la possibilité de transformation par *Agrobacterium* (Leple *et al.*, 1992 ; Busov *et al.*, 2005). Enfin la capacité de régénération *in vitro* ainsi que la croissance en hydroponie (Morabito *et al.*, 2006) sont autant d'atouts qui renforcent le peuplier en tant que plante modèle.

D'un point de vue écologique, économique et scientifique, il paraît donc important d'étudier les contraintes auxquelles sont soumises les plantes et plus particulièrement le peuplier, et les stratégies mises en place en réponse afin de faire face à ces contraintes.

III.2. Etat des connaissances sur le MSP du peuplier

Au sein du LBLGC, l'équipe ARCHE centre la majorité de ses travaux sur l'étude de la réponse du peuplier lors de variations de la disponibilité en eau. Pour traiter cette problématique, différentes approches complémentaires sont ainsi abordées allant de l'écophysiologie à la physiologie moléculaire. D'un point de vue moléculaire, une des thématiques abordées par l'axe « Signalisation » est ainsi l'étude de la voie de perception et de transduction de la contrainte hydrique chez le peuplier. Vis-à-vis des connaissances déjà établies chez les autres espèces, dont *Arabidopsis* sur ce type de signalisation, le laboratoire a ainsi entrepris l'étude du MSP de peuplier.

D'un point de vue moléculaire, comme précédemment expliqué, la mise en place d'une réponse adaptée à toute contrainte est conditionnée par une perception de celle-ci et un relai efficace du signal engendré. Concernant la perception de la contrainte hydrique, l'identification en 1999 par Urao *et collaborateurs* chez *Arabidopsis* d'une protéine, AHK1, appartenant à un système de type MSP faisant office d'osmosenseur, a conduit l'équipe à se focaliser sur l'étude de l'implication d'un tel phosphorelais dans la perception de la sécheresse chez le peuplier.

Ainsi, un récepteur nommé HK1, possédant une forte identité de séquence protéique avec AHK1 d'*Arabidopsis*, a tout d'abord pu être isolé à partir d'ADN complémentaire (ADNc) provenant du génotype Dorskamp (*Populus deltoïdes* (Bartr.) Marsh x *P nigra* L.) (Chefdor *et al.*, 2006). La capacité de dimérisation de ce récepteur a pu être démontrée en levure (Hericourt *et al.*, 2013) et *in planta* (Bertheau *et al.*, 2013). Une étude de l'expression du gène *HK1* en condition témoin et après application d'un stress osmotique a permis d'établir la présence de ce récepteur en condition témoin,

ainsi qu'une augmentation du niveau de transcrits après 5 minutes d'application de la contrainte au niveau racinaire (Chefdor *et al.*, 2006).

Deux arguments supplémentaires en faveur de la fonction d'osmosenseur de ce récepteur en levure ont pu être amenés au laboratoire (Héricourt *et al.*, 2013). Tout d'abord, la capacité de complémentation de la voie MSP chez des levures déficientes pour les récepteurs Sln1 et Sho1 par insertion de la protéine de peuplier HK1 a permis la survie de celles-ci dans des conditions d'hyperosmolarité. Ensuite, la détection de la protéine Hog1 phosphorylée, signe d'une voie de signalisation fonctionnelle a pu être réalisée.

Récemment, un paralogue du gène *HK1*, nommée *HK1b* par analogie au premier, *HK1a*, a été isolé à partir du génotype Dorskamp. Celui-ci partage 96,35% d'identité de séquence avec *HK1a*. Des études sont actuellement menées afin de rechercher une possible implication de ce récepteur dans la perception et la signalisation de la contrainte osmotique, à l'instar de *HK1a* (Héricourt *et al.*, 2016, soumis)

Les protéines HPT, seconds partenaires de cette voie, dont 10 gènes ont été identifiés *in silico* chez le peuplier ont pu être isolées (Héricourt *et al.*, 2013). Des études d'interactions par technique double-hybride en levure ont été effectuées afin de déterminer parmi les 10 protéines HPT, celles qui pourraient être des partenaires du récepteur HK1. Ce test a pu mettre en évidence un partenariat privilégié entre HK1 et 2 protéines HPT, HPT2 et HPT9 (Héricourt *et al.*, 2013). La présence dans les racines, les tiges, pétioles et limbes foliaires des messagers codant *HK1* ainsi que ces 2 protéines HPT a permis de conforter la pertinence de ce partenariat. Des interactions mineures ont été observées entre HK1 et HPT7. La présence des messagers codant HPT7 majoritairement dans les racines ont conduit à la conclusion que la protéine HPT7 pouvait être considérée comme un partenaire majoritairement impliqué dans une signalisation racinaire. Par contre, la présence uniquement détectée dans les feuilles des messagers codant la protéine HPT10 n'a pu permettre de valider les interactions entre HK1 et cette protéine que dans cet organe faisant de cette protéine HPT un partenaire très minoritaire dans cette voie de signalisation, ou se produisant de façon tissu spécifique.

Les derniers partenaires de cette voie les RR. Comme décrit dans le chapitre II.2.b, on distingue 4 catégories de RR chez les plantes. Dans le peuplier génotype Dorskamp sur lequel se sont portés les travaux au sein de l'équipe, 10 ADNc codant des RR-A ont pu être isolés (RR1 à 8 et 10 à 11). Dans le cas des RR-B, des études *in silico* chez *Populus trichocarpa* ont permis de mettre en évidence la présence de 11 gènes codant ces RR-B (Ramírez-Carvajal *et al.*, 2008 ; Singh and Kumar, 2012). Chez le génotype Dorskamp, 9 ADNc codant des RR-B ont été isolés : les RR12 à 16, 18 et 19, 21 et 22 (Bertheau *et al.*, 2012 ; 2015). Des études d'interaction par technique double-hybride ont été menées entre ces RR-B et les protéines HPT2, 9 et 7, partenaires interagissant majoritairement avec HK1a. Cette étude a mené à la conclusion que tous les RR-B isolés au laboratoire pouvaient interagir avec les protéines HPT étudiées. Cependant, seuls 6 RR-B (RR12, 13, 14, 16, 18 et 19) ont présenté des profils d'expression de leur messagers co-localisant avec ceux codant les 3 protéines HPT étudiées (Bertheau *et al.*, 2013 ; 2015) ne validant ainsi que ces derniers en tant que partenaires potentiels de la voie de signalisation.

A ce jour, un réseau de partenaire a donc pu être établi, mettant en jeu HK1a, les protéines HPT2, 7 et 9, ainsi que les RR-B12, 13, 14, 16, 18 et 19.

IV. Objectif de la thèse

Les RR-B appartenant à la catégorie des facteurs de transcription, ils seront donc responsables de la régulation de gènes de réponse. Dans le cadre de la contrainte hydrique, ces protéines sont donc

des cibles moléculaires particulièrement importantes dans la réponse de la plante lors de la contrainte. Dans le contexte de l'étude visant à étudier la voie de signalisation de type MSP induisant une réponse du peuplier face à la contrainte hydrique, la caractérisation des RR de type B s'avère être une étape clé. Le travail de thèse effectué fait suite au travail évoqué précédemment et porte donc sur l'identification et la caractérisation de facteurs de transcription appartenant à la famille des Régulateurs de Réponse de type B impliqués dans la réponse à la sécheresse chez le peuplier.

Afin de répondre à cette problématique, différents objectifs ont été déterminés et ont permis de structurer mon travail de thèse en deux parties.

La première partie de ce travail visait à déterminer quels RR-B pouvaient être impliqués dans la réponse à la sécheresse au travers d'une analyse de leur régulation génique. Cet objectif a été abordé :

- d'une part grâce à une étude de la régulation de l'expression des gènes codant l'ensemble des RR-B de peuplier dans différents organes soumis ou non à une contrainte osmotique à l'aide de la technique de RT-PCR en temps réel,
- d'autre part *via* une analyse *in planta* de l'expression des gènes codant pour certains RR-B et autres partenaires de la voie par étude de leur promoteur.

Ce premier travail sera ainsi découpé en deux chapitres dont le premier a conduit à une publication et le second correspond à un article en préparation.

La seconde partie de ce travail s'intéressait plus en détail à la caractérisation fonctionnelle des RR-B candidats en vue de déterminer leur implication dans la voie de signalisation de la contrainte osmotique. Cette caractérisation a été menée par deux approches complémentaires.

Le premier chapitre est focalisé sur l'étude du RR-B selon ses différents domaines fonctionnels et sera découpé en deux sections. Ainsi :

- la capacité de fixation au niveau de motifs ADN précis de ces protéines par le biais du domaine GARP, élément fondamental des RR-B, a été envisagée par une technique de gel retard,
- la capacité de dimérisation de ces facteurs de transcription a pu être étudiée par des expériences de double-hybride en levure portant sur le domaine DDK seul de ces protéines.

Le second chapitre de ce travail consiste en l'étude de la fonctionnalité biologique des RR-B. Ainsi :

- la portée fonctionnelle de ces protéines a été abordée par deux techniques de *trans*-activation *in planta*. Cette approche permet d'obtenir des pistes sur les cibles pouvant être affectées par les RR-B,
- la fonctionnalité biologique des RR-B a été étudiée par une approche perte de fonction, reposant sur l'usage de la technique **ARN interférent (RNAi)**,

L'étude de la fonctionnalité des RR-B sera ainsi décomposée en deux chapitres, eux-mêmes subdivisés en deux sections dans ce manuscrit, dont deux correspondent à des articles en préparation.

MATERIELS ET METHODES

MATERIELS

I. Matériels biologiques

I.1. Peuplier

Le clone 717-1B4 *Populus tremula* x *P. alba* est un hybride interspécifique femelle initialement créé par l'INRA afin de tester deux phénomènes. D'une part l'influence d'une modification qualitative et quantitative de la lignine a été réalisée par diminution du niveau d'expression de deux enzymes intervenant dans le processus de biosynthèse des lignines. D'autre part, l'induction de la stérilité chez un clone femelle a été obtenue par insertion d'un ADNc sens ou anti sens d'un gène floral homéotique de peuplier impliqué dans la transition d'un méristème inflorescentiel en un méristème floral. Ce génotype possède l'avantage d'être efficacement manipulable *in vitro* lors de transformations par *Agrobacterium tumefaciens*.

Le génotype Dorskamp, *Populus deltoïdes* (Bartr.) Marsh x *P. nigra* L., a été créé à l'institut de Dorskamp de Wageningen aux Pays-Bas. Ce génotype est utilisé au laboratoire sur la base de la caractérisation préalable de son niveau de tolérance à la sécheresse (Brignolas *et al.*, 2000) et de sa possible culture en milieu hydroponique (Caruso *et al.*, 2002).

Les nombreuses expériences réalisées au cours de cette thèse ont nécessité l'ensemble des parties de ces modèles (plante entière, tissus indifférenciés, feuilles, ...).

I.2. Tabac

Le tabac appartient à la famille des Solanacées et au genre *Nicotiana*. Dans le domaine scientifique, deux espèces sont utilisées : *N. benthamiana*, espèce de tabac indigène en provenance d'Australie et majoritairement utilisée en tant que modèle biologique, et *N. tabacum*, espèce à visée première commerciale créée *a posteriori*. Le rôle modèle de *N. benthamiana*, notamment lors des études des relations plantes-pathogènes, peut s'expliquer de par sa capacité à être efficacement infectée par de nombreux agents de nature différente (virus, bactéries, oomycètes, etc...) (Goodin *et al.*, 2008). De plus, cette espèce est largement utilisée à des fins biotechnologiques pour la production industrielle de protéines recombinantes et pour l'étude de l'expression transitoire par agroinfiltration. C'est dans cette finalité que cette plante est utilisée au sein du laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire de l'université de Guelph (Canada) afin de démontrer la capacité de *trans*-activation de gènes cibles par des facteurs de transcription par utilisation d'un système récemment mis au point (Nassuth *et al.*, 2014).

Ces expériences de *trans*-activation ont été réalisées sur des feuilles matures de plants de tabac.

I.3. Pervenche de Madagascar

La pervenche de Madagascar (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don) est une plante pérenne appartenant à la famille des Apocynacées. Une de ses applications les plus connues concerne le domaine médical, puisque ses parties aériennes contiennent de nombreuses molécules à visée thérapeutique (Ferrerres *et al.*, 2008 ; Pereira *et al.*, 2010) telles que la vincristine et la vinblastine, antimitotiques utilisés dans le traitement de certains cancers par chimiothérapie. Cette plante a été utilisée pour de nombreuses études dont une analyse de différents cultivars vis-à-vis de leur acclimatation à une sécheresse et aux niveaux d'alcaloïdes produits (Virk and Singh 1990).

Au laboratoire BBV de Tours, l'aspect traitant de la production d'alcaloïde par cette plante est abordé et l'analyse de la voie métabolique à l'origine de cette production est considérée. Lors de notre étude, des suspensions cellulaires non chlorophylliennes de la souche C20D, dérivant de la souche C20

ont été utilisées pour des expériences de *trans*-activation de gènes cibles *in planta* après transformation par biolistique (Guirimand *et al.*, 2009) en utilisant le système tri-partite. Cette souche permet lors d'un apport en cytokinines d'activer les voies de réponses à cette phytohormone.

I.4. Souches de bactéries

La souche *E. coli* DH5 α (New England Biolabs) de génotype *fhuA2* Δ (*argF-lacZ*)U169 *phoA* *glnV44* Φ 80 Δ (*lacZ*)M15 *gyrA96* *recA1* *relA1* *endA1* *thi-1* *hsdR17* a été utilisée lors des transformations bactériennes permettant d'obtenir des plasmides en grande quantité.

La souche *E. coli* BL21 (New England Biolabs) de génotype, F-, *ompT*, *hsdSB*, (*rB*-, *mB*-), *dcm*, *gal*, λ (DE3) a été utilisée lors des tests de production de protéines recombinantes GST-GARP-RR18, 19 et 22.

La souche *E. coli* TOP10 de génotype F- *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *araD139* Δ (*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* (Str^R) *endA1* *nupG* a été utilisée afin d'effectuer des transformations avec le plasmide pENTR™/D-TOPO®.

La souche *A. tumefaciens* C58 contenant le plasmide pMP90 (pTiC58 Δ T-DNA) a été utilisée lors des transformations *in vitro* de boutures de peuplier 717-1B4.

La souche *A. tumefaciens* EHA 105 contient le plasmide pEHA105 (pTiBo542 Δ T-DNA) et a été utilisée afin d'infiltrer les feuilles de tabac avec les constructions permettant les expériences de *trans*-activation par système utilisé chez cette plante.

I.5. Souches de levures

Les souches L40 Δ de génotype MATa *ade2-101* *his3-200* *leu2-3,112* *trp1-901* *ura3-52* *LYS2::*(*lexA* op)x4-HIS3 *URA3::*(*lexA* op)x8-*lacZ* *gal4* Δ et Y187 de génotype MAT α *ura3-52* *his3-200* *ade2-101* *trp1-901* *leu2-3,112* *gal4* Δ *met-* *gal80* Δ *MEL1* *URA3::GAL1*_{UAS}-*GAL1*_{TATA}-*lacZ* ont été utilisées lors des techniques de double-hybride en levure.

II. Milieux de culture

II.1. Milieux de culture pour végétaux

Le milieu de culture utilisé pour la culture de la souche de *C. roseus* C20D est un milieu de base de Gamborg (1968), modifié par ajout de saccharose à concentration finale de 58 mM, acide 2,4-Dichlorophénoxy-acétique (2,4-D) à concentration finale de 4,5 μ M et kinétine à concentration finale de 0,28 μ M. Cette culture s'effectue en fiole de 50 mL sous agitation permanente à 100 Rotations Par Minutes (RPM) à 25°C en obscurité. La fréquence de repiquage de cette souche est d'une semaine. Ainsi, 50 mL de suspension initiale permet d'inoculer 450 mL de milieu de culture, répartis ensuite en fioles comme explicité précédemment.

Le milieu de culture utilisé pour réaliser la transformation de plants de peupliers par *Agrobacterium*, de la callogénèse à la régénération de vitroplants complets, est le milieu de Murashige & Skoog (1962), appelé MBase par la suite (Tableau S1 ANNEXE 1). Il est supplémenté par ajout d'auxines et de cytokines, respectivement via l'ajout d'acide naphthalèneacétique (ou NaphthalèneAcétic Acid NAA) à concentration finale 0,01 μ M et de 6-(gamma,gamma-Dimethylallylamino)purine (2ip) à concentration finale de 5 nM. Ce milieu sera par la suite appelé milieu M1 (ANNEXE 1) et sera utilisé lors de la préparation des explants, ainsi que lors de l'incubation des explants avec la souche d'*Agrobacterium* en vue de la transformation.

A l'issue de la transformation par *Agrobacterium*, le milieu M1 précédent a été supplémenté par de la kanamycine, du céfotaxime et de la ticarcilline et sera par la suite appelé milieu M2 (ANNEXE 1). Ce

milieu est destiné à favoriser la callogénèse puis la croissance des cals maintenus en obscurité. Ces derniers sont repiqués sur ce milieu toutes les deux à trois semaines.

Afin de procéder à la régénération de plants à partir de cals transformés, une initiation du débourement est réalisée par repiquage à la lumière (134 $\mu\text{mol}/\text{sec}/\text{m}$ pendant 16 heures par jour) des plants sur des boîtes contenant un milieu M2 où les concentrations en antibiotiques sont diminuées et où l'ajout de **ThiDiaZuron (TDZ)** à concentration finale de 0,1 μM a été effectué. L'élongation des pousses formées est ensuite favorisée par transfert des plants sur le même milieu que précédemment mais présenté en pots afin de maximiser le volume et l'air disponibles pour la croissance de la plante et ne contenant que 0,01 μM de TDZ. Ces deux milieux sont respectivement appelés M3 et M3E pour M3Elongation (*ANNEXE 1*).

Lorsque les pousses présentent une croissance de la tige suffisante, celles-ci sont extraites du milieu M3E, les tiges sont séparées des cals et placées sur un milieu **Murashige and Skoog** au $\frac{1}{2}$ (**MS $\frac{1}{2}$**) disposé en tube et permettant l'enracinement des plants (*ANNEXE 1*).

Pour la plante modèle *N. benthamiana*, les graines ont été éparpillées à la surface d'un pot contenant le terreau Sunshine Mix 4 Aggregate Plus Soil (Sun Gro Horticulture, Vancouver, British Columbia) généreusement irrigué. Le pot a été couvert par du film alimentaire et placé en chambre de culture Conviron walk-in, en environnement contrôlé selon un rythme nyctéméral long (16 heures à 22°C et avec apport de lumière à 120 $\mu\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ à partir de 6 heures du matin suivies par 8 heures d'obscurité à 20°C à partir de 22 heures). Les pots sont arrosés trois fois par semaine dont une fois avec apport de fertilisants Azote-Phosphore-Potassium (**NPK**) 18-9-18. Après environ 10 jours, les graines commencent à germer et le film alimentaire peut être retiré progressivement. La 3^{ème} feuille (1^{ère} vraie feuille) doit être visualisable après environ 12 jours, marquant le moment de transplant des jeunes pousses en pots individuels contenant le même terreau que précédemment.

Les plants en pots individuels sont arrosés selon la même fréquence et la même modalité que précédemment et peuvent être agroinfiltrés au stade 6 à 8 feuilles, correspondant environ à 4 semaines de culture.

II.2. Milieux de culture de bactéries

Les souches *E. coli* sont mises en cultures solides à 37°C sur milieu **Luria Bertani (LB)** agar supplémenté en antibiotiques adéquats (**LBA** lors d'ajout d'Ampicilline, **LBK** lors de l'ajout de Kanamycine, **LBG** lors d'ajout de Gentamicyne, **LBGK** lors de l'ajout des deux antibiotiques précédents) pendant une nuit. Les cultures liquides sont réalisées en milieu **Super Optimal broth with Catabolite repression (SOC)** pendant 1 heure à 37°C sous agitation à 250 RPM dans le cas des transformations ou bien 2 à 3 heures dans du milieu **LB-P** (pour **P**roduction) puis 4 heures après ajout de 3 mM d'Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (**IPTG**) dans le milieu LB précédent lors des productions de protéines de fusion GST-GARP-RR (*Tableau 2*).

Dans le cas de la conjugaison triparentale, permettant d'obtenir une souche d'*Agrobacterium* contenant la construction d'intérêt bordée par les séquences permettant le transfert dans le génome végétal, ou bien lors de la préculture des souches obtenues, le milieu **LB-C** (pour **C**onjugaison) solide utilisé tient compte de la résistance aux antibiotiques apporté par chacun des partenaires. La sélection sera donc effectuée sur un milieu contenant de la rifampicine pour la résistance de la souche vide, de la gentamicine pour maintenir la présence du plasmide pMP90 et enfin de la spectinomycine, permettant la sélection des constructions à intégrer dans le génome végétal. Les bactéries seront incubées pendant 48 heures à 20°C.

Lors des expériences d'expression transitoire permettant les tests de *trans*-activation en plants de tabac, les souches d'*Agrobacterium* servant pour l'agroinfiltration des plants et contenant les

différents partenaires à tester sont mises en culture sur milieu **LB-A** tabac (pour *Agrobacterium*) solide afin de propager les souches, sur le milieu **LB-C** tabac (pour Culture) liquide contenant 40 μM d'acétosyringone et enfin sur le milieu **LB-I** tabac (pour Induction) liquide contenant 150 μM d'acétosyringone .

	LB (1L)	LB-P (1L)	LB-C (1L)	LB-T (1L)	LB -A tabac (1L)	LB-C Tabac (1L)	LB-I Tabac (1L)	SOC (1L)
Extrait de levure (g)	5	5	5	5	5	5	5	5
Tryptones (g)	10	10	10	10	10	10	10	20
NaCl (g)	5	5	5	5	5	5	5	1,80
Glucose	/	2 %	/	/	/	/	/	/
KCl (mM)	/	/	/	/	/	/	/	2,5
MgCl ₂ (mM)	/	/	/	/	/	/	/	10
MgSO ₄ (mM)	/	/	/	/	/	/	/	10
Ampicilline ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	/	50	/	/	/	/	/	/
Kanamycine ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	/	25	/	50	50	50	50	/
Rifampicine ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	/	/	50	10	10	10	10	/
Gentamycine ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	/	/	25	/	/	/	/	/
Spectinomycine ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	/	/	50	/	/	/	/	/
Agar (si milieu solide) (g/L)	15	/	15	15	/	/	/	/
Acétosyringone (μM)	/	/	/	/	/	40	150	/

Tableau 2 : Composition des différents milieux de croissance des bactéries.

LB correspond au milieu Luria Bertani de base, *LB-P* au milieu de production des domaines GARP des RR-B par les bactéries *E. coli*, *LB-C* au milieu permettant la conjugaison triparentale des souches d'*Agrobacterium*, *LB-T* au milieu utilisé pour la croissance des *Agrobacterium* pour l'expérience de trans-activation du tabac.

II.3. Milieux de culture de levures

Les souches de levure L40 Δ et Y187 servant pour les expériences de double-hybride sont cultivées pendant 3 à 4 jours à 30°C. Avant transformation, cette culture s'effectue sur milieu riche non sélectif Yeast Peptone Dextrose (YPD) (*Tableau 3*), une fois la transformation des souches L40 Δ et Y187 effectuée respectivement avec les plasmides pLex et pGAD, les levures sont étalées

respectivement sur milieu dépourvu de triptophane (-W) ou de leucine (-L), permettant de tester l'incorporation de chaque plasmide.

Lors du croisement des deux souches afin d'obtenir des levures diploïdes, le milieu -LW est utilisé. Enfin lors du test d'interaction des deux partenaires, les levures sont déposées sur le milieu sélectif -LWH.

	Yeast Peptone Dextrose (YPD)	-L	-W	-LW	-LWH
Extrait de levure	10 g/L				
Peptone	20 g/L				
Glucose	20 g/L	20 g/L	20 g/L	20 g/L	20 g/L
Agar	20 g/L	20 g/L	20 g/L	20 g/L	20 g/L
YNB		1,7 g/L	1,7 g/L	1,7 g/L	1,7 g/L
Ammonium sulfate		5 g/L	5 g/L	5 g/L	5 g/L
Do -L		0,56 g/L			
Do -W			0,56 g/L		
Do -LW				0,52 g/L	
Do -LWH					0,48 g/L

Tableau 3 : Composition des différents milieux de croissance des levures pour les expériences de double-hybride. YNB pour Yeast Nitrogen Base, Do pour Drop-out, -L, -W, -H respectivement pour carence en leucine, triptophane, histidine.

METHODES

I. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

I.1. PCR classique

La technique PCR associée à l'utilisation d'une polymérase haute-fidélité, la Q5® High-Fidelity DNA polymerase (New England Biolabs), a été utilisée pour amplifier tous les inserts ayant servis aux clonages moléculaires des domaines GARP des RR18, 19 et 22 pour les tests d'expression, ainsi que pour l'ensemble des clonages des domaines DDK des RR-B disponibles au laboratoire à l'exception du RR13 pour les tests d'interaction par double-hybride en levure et de certains des RR-B pour les tests de BiFC.

D'autre part, la PCR a permis la récupération de séquences des promoteurs HK1a, HK1b, RR13, 18, 19, et 22 et des séquences 3'UTR des RR18, 19 et 22 du génotype 717-1B4 (ANNEXE 2). La Q5® High-Fidelity DNA polymerase possède une capacité d'élongation de 1 kb par 30 secondes à 72 °C. Cette technique a également été utilisée dans le cadre de PCR de plus faible fidélité, à l'aide de la Gotaq® DNA polymerase (Promega) afin de vérifier la présence des plasmides d'intérêt au sein des levures et bactéries transformées. La Gotaq® DNA polymerase (Promega) possède une capacité d'élongation de 1 kb par minute à 72°C. La composition générale d'une PCR est détaillée dans le tableau 4.

Composants	Volumes	Concentration initiale	Concentration finale
ADN matrice	variable	variable	50 ng
Amorce sens	1 µL	10 µM	0,2 µM
Amorce antisens	1 µL	10 µM	0,2 µM
Mélange de dNTP	1 µL	10 mM	0,2 mM
Enzyme ADN polymerase	0,3 µL (GoTaq) ou 0,5 µL (Q5)	5 U/µL (GoTaq) 2 U/µL (Q5)	1,5 U (Gotaq) ou 1 U (Q5)
H ₂ O	qsp 50 µL		

Tableau 4 : Composition générale d'une PCR. dNTPs pour désoxynucléotides.

I.2. PCR sur colonies

Afin de valider la présence des ADNc introduits par transformation des levures ou bactéries, une PCR sur colonie est effectuée. Après une étape de dénaturation initiale de temps et température variables selon la souche transformée, 30 cycles sont effectués comme suit : une dénaturation de temps et température variables selon la souche transformée, une hybridation des amorces pendant une minute à la température adéquate spécifique des amorces utilisées (**melting Temperature** ou **T_m**), une élongation à 72°C pendant le temps adéquat à raison de 1 kb/minute pour la Gotaq®. Une élongation finale de 5 minutes à 72°C est réalisée puis les tubes sont stockés à 12°C.

I.2.a - Levures

Le but est de valider la présence des ADNc des différents DDK des RR-B au sein de chaque souche de levure haploïde ou la présence de la construction pYX-212 contenant le récepteur HK de pommier à

tester en complément fonctionnelle après transformation. Afin d'extraire l'ADN présent dans les levures, une étape de lyse préalable à la PCR est nécessaire. Celle-ci est réalisée par resuspension des levures dans 10 µL de NaOH 0,02M, incubation pendant 5 minutes à 95°C puis stockage des tubes dans la glace. La PCR sera ensuite effectuée à partir de 2 µL de la solution précédente comme matrice en utilisant la GoTaq® polymérase et les amorces spécifiques des plasmides appât pLex (LexA5 et LexA3) et proie pGAD (ACT5 et ACT3). L'étape de dénaturation initiale est effectuée à 98°C puis 30 cycles composés d'une étape de dénaturation à 98°C, suivie des étapes classiques explicitées précédemment.

I.2.b - Bactéries

Lors de la PCR sur colonie de bactéries, l'étape initiale de dénaturation s'effectue pendant 2 minutes à 96°C. S'en suivent 30 cycles composés d'une étape de dénaturation à 96°C, suivie des étapes classiques explicitées précédemment.

I.3. PCR de séquençage

Cette technique est basée sur la méthode de Sanger qui utilise d'une part une matrice ADN à 1 µg/µL, une amorce unique universelle ou spécifique (*Tableaux S3 et S4 ANNEXE 3*) à 250 nM, 4 terminateurs de la réaction de polymérisation coupés à des fluorochromes spécifiques qui pourront être détectés par le séquenceur et une polymérase, ces deux derniers éléments étant fournis dans le kit Big Dye® Terminator v3.1 Cycle sequencing kit (Applied Biosystems). Les instructions du fournisseur ont été suivies et le programme PCR est le suivant : 2 minutes à 95°C, 10 secondes à 96°C, 15 secondes à la température d'hybridation des amorces, 4 minutes à 60°C, répétés sur 30 cycles. La réaction est ensuite stockée à 4°C jusqu'à la purification des produits de séquençage obtenus, dont la procédure est explicitée dans la partie Méthodes, chapitre II.2.b de ce manuscrit.

I.4. RT-PCR semi-quantitative et en temps réel

Lors de l'utilisation de cette technique, une matrice de 4 µg d'ARN totaux provenant de calcs de peuplier 717-1B4 en condition témoin pour les tests de présence de transcrits des lignées RNAi ou bien 2 µg d'ARN totaux provenant de différents organes de peuplier pour les tests préliminaires des amorces de RT-PCR en temps réel permettant d'effectuer la cinétique d'expression des RR-B ont été utilisés. Dans les deux cas, une élimination préalable à la rétrotranscription des contaminations ADN résiduelles a été réalisée.

I.4.a - Traitement à la déoxyribonucléase I (DNase I) des ARN

Ce traitement a été effectué à l'aide d'1 Unité (U) de DNase I (ThermoFisher Scientific) mise en présence de la solution d'ARN, du tampon 10X de la DNase I dépourvu de RNases à concentration finale 1X (10 mM Tris, pH 7,5 ; 2,5 mM MgCl₂ ; 0,5 mM CaCl₂) dans un volume final de 10 µL en eau dépourvue de RNases pendant 30 minutes à 37°C puis une inactivation de l'enzyme est effectuée par ajout d'Éthylène Diamine Tetra-acetic Acid (EDTA) à 2,5 mM ainsi qu'une incubation à 65°C pendant 10 minutes.

I.4.b - Transcription inverse des ARN

Pour les tests de présence de transcrits des lignées RNAi et l'étude des niveaux d'expression des RR-B selon une cinétique de contrainte osmotique, le kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis (ThermoFisher Scientific) a ensuite été utilisé après ajout de 4 µg d'ARN totaux provenant du broyage de calcs témoins de peuplier 717-1B4 ou 2 µg d'ARN totaux provenant de différents organes de peuplier, et traitement DNase comme explicité précédemment, en suivant les données du fabricant. Le kit utilisé contient une enzyme Reverse Transcriptase (RT) de type Moloney Murine Leukemia Virus (M-MuLV) et un inhibiteur de RNases le ThermoScientific RiboLock RNase Inhibitor. 0,5 µg d'oligo(dT)₁₈ sont ajoutés puis les tubes sont agités doucement et centrifugés. Après incubation à

65°C pendant 5 minutes, les tubes sont refroidis dans la glace, centrifugés et maintenus en glace. Les réactifs sont ensuite ajoutés dans l'ordre suivant : 4 µL de tampon de réaction 5X à concentration finale 1X (50 mM Tris-HCl pH 8,3 ; 25 mM KCl, 4 mM MgCl₂), 0,5 µL (20 U) de ThermoScientific RiboLock RNase Inhibitor, 2 µL de mix dNTPs à 10 mM chacun (Cf = 1 mM) puis 1 µL (200 U) de RevertAid Reverse Transcriptase dans un volume final de 20 µL. Le mélange est homogénéisé doucement puis brièvement centrifugé. La réaction se déroule pendant 1 heure à 42°C puis est arrêtée par incubation des tubes à 70°C pendant 10 minutes. Les ADNc obtenus sont conservés à -20°C.

I.4.c - RT-PCR relative

Cette technique a été utilisée d'une part dans le cadre de l'étude d'expression des RR-B lors d'une cinétique de stress et d'autre part afin de vérifier l'extinction des transcrits des RR-B ciblés lors de la technique d'extinction RNAi. Dans les deux cas de figure, 40 cycles de PCR sont effectués selon un programme classique de PCR tel que présenté en partie Méthode, chapitre I.1 de ce manuscrit.

Etude de l'expression des RR-B

Afin de vérifier d'une part la validité des amorces de RT-PCR en temps réel utilisées et d'autre part obtenir une cinétique préalable d'expression des RR-B lors d'une cinétique de stress, la technique RT-PCR relative a été utilisée.

En effet, l'utilisation préalable des amorces de RT-PCR en temps réel permet de déterminer la présence de sous-produits de PCR dont la taille divergerait grandement par rapport à la taille théorique attendue. D'autre part, la RT-PCR relative permet d'obtenir des produits PCR qui pourront être quantifiés afin de réaliser une étude d'efficacité des amorces dont la procédure est développée dans la partie Méthodes, chapitre I.4.d de ce manuscrit.

Lors de cette étude, deux matrices ADNc différentes ont été utilisées afin de cibler la majorité des conditions d'expression. Les limbes ont été choisis ainsi que le temps 10 minutes de contrainte, correspondant à un temps précoce déjà établi dans la littérature (Bertheau *et al.*, 2012), ainsi que le temps 120 minutes, temps plus tardif pouvant potentiellement permettre l'expression de *RR-B* non détectés précédemment, à l'instar de ce qui a été obtenu précédemment pour le *RR18* (Bertheau *et al.*, 2015). Ces deux matrices ont été diluées au 1/5^{ème} afin de se placer dans des conditions compatibles avec l'utilisation de la technique RT-PCR en temps réel. Les amorces utilisées sont celles destinées aux expériences de RT-PCR en temps réel et, lorsqu'aucune amplification était détectée, les amorces permettant l'amplification de la totalité de la séquence des RR-B et utilisées lors de la précédente étude d'expression des transcrits des *RR-B* (Bertheau *et al.*, 2012). Les résultats ont été analysés par électrophorèse en gel d'agarose à 1 % comme développé en partie Méthodes, chapitre II.3.a.

Vérification de l'extinction des transcrits des RR-B ciblés par la stratégie RNAi

Cette étude, réalisée sur du matériel végétal transformé pour permettre l'extinction ciblé d'un ou plusieurs RR-B a pour objectif de s'assurer que seule l'expression du *RR-B* ciblé a effectivement été éteinte. Notre étude s'est focalisée sur l'extinction de la famille des *RR18*, *19* et *22* par extinction simple de l'expression de chaque *RR* ainsi que par une stratégie d'extinction groupée de l'expression des *RR18* et *19*.

Préalablement à l'étude des lignées transgéniques en elles-mêmes, la mise au point des conditions de RT-PCR relative a été effectuée sur deux lignées témoin, transformées par la construction pH8-CAD (ANNEXE 4). Ainsi, après broyage de cals chlorophylliens provenant de ces lignées et disposés sur le milieu de régénération M3, des extractions d'ARN totaux ainsi que des rétrotranscriptions à partir de 4 µg de ces ARN totaux ont été réalisées comme évoqué respectivement dans la partie Méthodes, chapitres II.1.a et I.4.b de ce manuscrit. Les ADNc ont ensuite été soumis à une PCR en point final, de programme identique à celui explicité précédemment et utilisant les

amorces spécifique à chaque *RR* (Tableau S4 ANNEXE 3). Les résultats ont été analysés par électrophorèse en gel d'agarose à 1,2% comme développé en partie Méthodes, chapitre II.3.a.

I.4.d - RT-PCR en temps réel

Cette technique a été utilisée afin de réaliser l'étude des niveaux d'expression des *RR-B* en condition témoin et après une cinétique de stress osmotique. Le matériel végétal est le même que celui utilisé lors de l'étude des niveaux d'expression des *RR13* et *18* réalisée par Bertheau et collaborateurs en 2015. Les analyses des sept autres *RR-B* ont été réalisées dans les mêmes conditions, avec ces deux *RR-B* en tant que témoins d'expression et le gène *Yellow Leaf Specific gene 8 (YLS8)*, numéro d'accès AT5g08290) comme gène de ménage.

Les expériences de RT PCR en temps réel ont été réalisées au laboratoire BBV de Tours, à l'aide de la technologie SYBR-Green®, intercalant non spécifique de l'ADN, présente dans le kit SsoAdvanced™ SYBR® Green (Bio-Rad).

Avant de pouvoir réaliser l'ensemble de l'analyse des transcrits de chaque *RR-B* sur la cinétique de temps de contrainte dans l'ensemble des organes testés, un test de l'efficacité des amorces a été réalisé afin de s'assurer de la fiabilité des résultats ultérieurs quant à la production d'un seul produit PCR et de l'efficacité de production de ce produit PCR.

Pour chaque modalité d'analyse de l'expression des *RR-B* selon la cinétique de contrainte ou de test de l'efficacité des amorces, respectivement trois et deux réplicats sont réalisés. L'ensemble des réactions a été élaborée dans un volume réactionnel final de 15 µL en plaque de 96 puits. Les matrices ADNc sont déposées à raison de 160 ng (6 µL d'ADNc dilué 12 fois) et les amorces spécifiques à raison de 0,5 µM final. Le mélange SsoAdvanced™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad) contenant l'enzyme polymérase, le tampon de réaction ainsi que le SYBR Green® est ajouté à raison de 7,5 µL par puit. Pour chaque modalité, un contrôle négatif sans ADNc ou **No Template Control (NTC)**, également réalisé en triplicat ou duplicat, est réalisé afin de s'assurer de l'absence de contaminations.

Le thermocycleur utilisé est le CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) associé au programme PCR suivant : 1 cycle de 30 secondes à 95°C, puis 40 cycles de 5 secondes à 95°C et 20 secondes à 60°C. A la fin du programme, une vérification de la spécificité de la réaction est réalisée par une augmentation de la température de 65°C à 95°C par pas de 0,5°C par seconde, permettant d'établir une courbe de dissociation.

L'analyse est ensuite effectuée à l'aide du logiciel Bio-Rad CFX Manager 3.0. Ce logiciel permet d'obtenir la valeur des **threshold Cycle (Ct)**, déterminée au niveau de la phase exponentielle, à l'intersection de la ligne délimitant le bruit de fond avec la courbe de fluorescence. Cette valeur permet ensuite de calculer l'expression relative de chaque gène par l'utilisation de la méthode de quantification relative par analyse des $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Cette méthode se réalise en trois étapes. La normalisation de l'expression est tout d'abord réalisée par rapport à l'expression du contrôle par la relation $\Delta Ct = Ct_{\text{gène cible}} - Ct_{\text{contrôle endogène}}$ puis par rapport au standard grâce à la relation $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{échantillon}} - \Delta Ct_{\text{standard}}$. Ce standard est déterminé par choix d'une condition de référence parmi toutes celles testées. La détermination de la variation du nombre de copie du gène cible est alors obtenue par le calcul suivant : $\text{variation} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Test de l'efficacité des amorces de RT-PCR en temps réel

Après l'utilisation de la technique RT-PCR relative, les produits PCR obtenus pour chaque *RR* où une amplification a été observée sont quantifiés visuellement par rapport au marqueur de taille Smart Ladder MW-1700-10 (Eurogentec) après électrophorèse sur gel d'agarose à 1%. Cette quantification, associée à la taille théorique attendue pour chaque amplicon, nous permet ensuite de déterminer le nombre de moles présentes pour chaque réaction. Cette détermination a été

réalisée à l'aide de l'outil internet DNA Calculator retrouvé dans la catégorie « dsDNA : Micrograms to Picomoles Converter » appartenant au programme Biomath Calculator (Promega) (<http://www.promega.com/a/apps/biomath/index.html?calc=ugpmols>) d'après la formule suivante : $\text{pmol ADN} = \mu\text{g d'ADN} \times (\text{pmol}/600 \text{ pg}) \times (10^6 \text{ pg}/1 \mu\text{g}) \times 1/n$, où le rapport (pmol/600 pg) représente le poids moyen d'une paire de nucléotides et n le nombre de nucléotides.

Une fois le nombre de moles présentes pour chaque réaction déterminé, le nombre de molécules d'ADN retrouvées dans chaque réaction est calculé à l'aide d'un produit en croix et de la relation existant entre le nombre de moles et le nombre de molécules d'ADN, symbolisée par le Nombre d'Avogadro ($N_A : 6,22 \times 10^{11}$ molécules d'ADN = 1 picomole (pmol)).

La quantité de molécules d'ADN étant connue pour chaque amplification PCR, la réalisation d'une gamme de dilutions successives allant de 10^2 à 10^6 molécules d'ADN est réalisée et ces solutions seront utilisées comme matrices des tests de l'efficacité des amorces.

Lors de la réalisation des réactions de RT-PCR en temps réel pour le test de l'efficacité des amorces, la dilution des matrices ainsi que le programme utilisé sont les mêmes qu'évoqué précédemment.

Pour chaque dilution, la valeur de Ct est déterminée et l'ensemble des valeurs obtenues permet de tracer un graphe mettant en relation la valeur de Ct en fonction du logarithme (**log**) du nombre de molécules. De la droite obtenue est extrait le coefficient de corrélation (R^2) permettant d'évaluer la qualité de l'expérience, ainsi que l'équation de la droite de formule générale $y = ax + b$, où y représente les valeurs en ordonnée, a représente la pente de la droite, x représente les valeurs en abscisse et b représente la valeur de l'ordonnée à l'origine. La pente de la droite sera utilisée afin de calculer le pourcentage d'efficacité des amorces, selon la relation suivante : $\text{efficacité} = (10^{(-1/\text{facteur})} - 1) * 100$, où facteur représente la valeur de la pente de la droite. Le facteur de la pente doit ainsi être compris entre 3,32 (pour une efficacité de 100%) et 3,7 (pour une efficacité de 86%) afin que les amorces puissent être utilisées en RT-PCR en temps réel.

Etude des niveaux d'expression des RR-B

Comme évoqué précédemment, l'analyse de l'expression des RR-B en condition témoin et après application d'une cinétique de contrainte osmotique a été réalisée dans les racines, les tiges, les pétioles et limbes de boutures de peuplier en milieu de culture hydroponique (Bertheau *et al.*, 2015). L'analyse a donc porté sur 7 RR-B pour lesquels 9 temps de contraintes ont été testés au niveau de 4 organes différents. Les amorces utilisées sont listées dans le *Tableau S4* en ANNEXE 3 de ce manuscrit.

II. Extraction, purification et analyse des acides nucléiques

II.1. Extraction des acides nucléiques

II.1.a - Extraction des ARN totaux

Cette étape a été réalisé dans le cas de l'analyse des niveaux d'extinction de transcrits des lignées RNAi de peuplier 717-1B4 pour les *RR18*, *19* et *22*. Le kit NucleoSpin RNA Plant (Magerey-Nagel) a été utilisé en suivant les instructions du fournisseur et à partir de 100 mg de matériel végétal broyé provenant de cals témoins de transformation. L'étape de lyse initiale a été réalisée par mélange de poudres obtenues après broyage avec le tampon RAP fourni auquel 3,5 μL de β -mercaptoéthanol ont été ajoutés. L'étape d'éluion des ARN a été réalisée par ajout de 40 μL d'eau dépourvu de RNases.

II.1.b - Extraction d'ADN plasmidique

Ces extractions sont réalisées à partir de cultures de bactéries *E.coli* préalablement transformées par les plasmides d'intérêt et mises en culture sur une nuit à 37°C sous agitation de 250 RPM. Les cultures sont ensuite transférées dans un microtube de 2 mL puis centrifugées à température ambiante pendant 2 minutes à 13000 RPM. Le culot est resuspendu au vortex dans 200 µL de solution I (25 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA pH 8, 0,1 mg/mL RNase). La lyse alcaline des cellules est réalisée par ajout de 200 µL de solution II (0,2 mM NaOH, 1% Sodium Dodécylsulfate (SDS)) et homogénéisation des tubes, puis 200 µL de solution III (11,5% acide acétique, 3 M acétate de potassium) sont rajoutés afin de dissocier les ADN plasmidiques et génomiques puis les tubes sont réhomogénéisés par retournement. Les débris cellulaires sont ensuite précipités par centrifugation pendant 10 minutes à 4°C à 13000 RPM et les surnageants contenant l'ADN plasmidique sont récupérés dans de nouveaux microtubes de 1,5 mL. Après précipitation de l'ADN plasmidique par ajout de 500 µL d'isopropanol et centrifugation pendant 15 minutes à 4°C et 13000 RPM, les culots obtenus sont finalement lavés par ajout de 500 µL d'éthanol à 70% (v/v), séchés à l'aide du miVac DNA concentrator (Genevac) puis par incubation à 37°C pendant 5 minutes. La resuspension des ADN est réalisée à température ambiante par ajout de 50 µL d'eau ultrapure.

II.1.c - Extraction d'ADN génomique de peuplier

L'extraction d'ADN génomique (ADNg) de peuplier a été réalisée sur le génotype 717-1B4 afin de permettre la récupération des séquences promotrices de différents partenaires de la voie de signalisation étudiée au laboratoire.

Un gramme de matière fraîche est broyé dans l'azote liquide et la poudre obtenue est mélangée avec 6 mL de tampon d'extraction (1,4M NaCl, 20 mM EDTA pH8, 100 mM Tris pH8 et 2% Bromure d'hexadécylTriméthylAmmonium (CTAB)) préalablement chauffé à 60°C. Les tubes sont homogénéisés par inversion puis 50 µL de β-mercaptoéthanol ont été ajoutés. Le mélange est incubé pendant 30 minutes à 60°C sous agitation douce et constante.

Du chloroforme est ajouté à raison de 6 mL par tube puis les tubes sont homogénéisés par inversion douce pendant 5 minutes. Après une centrifugation de 10 minutes à 5500 RPM, la phase aqueuse est récupérée.

Un volume d'isopropanol égal au volume de la phase aqueuse est ajouté et l'ensemble est mélangé par inversion douce. L'ADN précipité est récupéré par usage d'une baguette en verre ou d'un cône en plastique et est resuspendu dans un volume d'éthanol à 70% dépendant de la quantité estimée d'ADN (de 500 µL à 1,5 mL).

Les tubes sont incubés à température ambiante 15 minutes puis centrifugés pendant 5 minutes à 8000 RPM. Le culot est séché au MiVac puis par incubation à 37°C pendant 5 minutes puis resuspendu dans 500 µL de tampon 10 mM Tris pH8, 1mM EDTA (TE) après des étapes de chauffage successives à 50°C permettant d'améliorer la resolubilisation du culot. L'ADNg obtenu est aliquoté et conservé à -20°C.

II.2. Purification d'ADN

II.2.a - Purification d'ADN en solution ou à partir d'un gel d'agarose

Lors d'un clonage moléculaire, les partenaires à cloner précédemment préparés doivent être récupérés. Ces partenaires peuvent inclure des produits PCR ou bien des résultats de digestions enzymatiques. Ces types d'ADN peuvent provenir de sources différentes.

En effet, les ADN peuvent être préalablement analysés à l'aide d'une électrophorèse en gel d'agarose afin de déterminer la présence éventuelle d'amplifications aspécifiques dans le cas de l'ADN obtenu par amplification PCR ou bien discriminer le fragment d'ADN digéré vis-à-vis d'ADN non digéré ou non désiré pour la suite du clonage (vecteur vide ou reliquat de site multiple de clonage par

exemple) dans le cas de l'ADN obtenu par digestion enzymatique. Les ADN peuvent également être purifiés directement dans le tampon réactionnel de la PCR lorsque la réaction PCR est caractérisée comme ne produisant qu'un produit unique ou bien dans le tampon de digestion lorsqu'une digestion enzymatique séquentielle est réalisée par exemple.

Les produits d'ADN issus d'amplification ou de digestion enzymatique sont purifiés soit directement soit après excision de la bande d'intérêt visualisée sur un gel d'agarose à l'aide du kit NucleoSpin gel and PCR clean-up (Macherey-Nagel) en suivant les instructions du fournisseur. Les étapes optionnelles sont incluses. Ainsi, l'élution est réalisée par ajout de 40 µL de tampon NE préalablement chauffé à 70°C et appliqué en deux volumes de 20 µL sur la colonne et par deux séries de centrifugation, la première à 100 g et la deuxième à 11000 g.

II.2.b - Purifications de PCR de séquençage

Les amplicons obtenus par PCR de séquençage évoquée dans le paragraphe Méthodes, chapitre I.3 de ce manuscrit sont précipités par ajout de 80 µL d'éthanol à 80% et centrifugation à 13000 RPM pendant 15 minutes à 4°C. Les surnageants sont éliminés et les culots lavés par ajout de 150 µL d'éthanol à 70% puis les tubes sont centrifugés à 13000 RPM pendant 5 minutes à 4°C. Les ADN sont finalement repris dans 25 µL d'eau ultrapure.

La lecture des séquences d'ADN réalisées s'effectue à l'INRA d'Ardon, par le biais du séquenceur ABI 3500 Genetic Analyzer et l'analyse est effectuée à l'aide du logiciel BioEdit® (Hall, 1999).

II.3. Analyse des acides nucléiques

II.3.a - Electrophorèse en gel d'agarose

Cette étape a pris part au sein de nombreuses expérimentations, puisqu'elle nous a permis d'apprécier la pureté des ADN et l'intégrité des ARN extraits ou bien de visualiser la présence de produits PCR ou d'ADN digéré ou bien encore d'estimer visuellement la taille ou la quantité d'un ADN produit par PCR.

L'électrophorèse s'effectue après dépôt des échantillons soit directement après la PCR lors de l'utilisation de la Gotaq® et de son tampon coloré comprenant un agent de charge associé à deux sondes colorées soit par ajout d'un tampon de charge 6X à concentration finale 1X (30% glycérol ; 0,25% de bleu de bromophénol) et le marqueur de taille utilisé est le SmartLadder MW-1700-10 (Eurogentec). Le pourcentage des gels utilisés varie de 0,8 % à 1,2 % (m/v) selon le pouvoir discriminant souhaité et la migration s'effectue dans du tampon TAE 1X (40 mM Tris-Acétate, 1 mM EDTA) à 100 ou 50V, de voltage dépendant de la volonté de récupérer le fragment d'ADN ou pas. La révélation des acides nucléiques s'effectue sous lumière à émission d'Ultraviolets (UV) après incubation du gel pendant 15 minutes dans une solution de Bromure d'Ethidium (BET) à 0,1 µg/mL.

II.3.b - Digestions enzymatiques

A l'exception de la réaction de dégradation des ADN par action d'une DNase I, réalisée dans les expériences de rétrotranscription des ARN en ADNc et provenant du fournisseur ThermoFisher Scientifics (DNase I et TurboDNase), l'ensemble des digestions enzymatiques ont été effectuées avec des enzymes de restrictions provenant de New England Biolabs (NEB). Ces dernières ont permis soit de libérer un insert ou linéariser un vecteur en vue d'un clonage moléculaire, soit de vérifier l'orientation d'un clonage par digestion orientée.

La réaction de dégradation des ADN par action d'une DNase I est développée dans la partie I.4.a de ce manuscrit). Les réactions enzymatiques mettant en jeu les enzymes NEB sont réalisées à partir de 500 ng à 6 µg d'ADN plasmidique mis en contact avec 5 à 10 U d'enzymes et du tampon réactionnel 1X adéquat fourni avec l'enzyme à concentration 10X. Les digestions sont effectuées à 37°C

pendant une durée variant de 3 heures à une nuit dans un volume final de 20 à 50 μL et les produits de digestion sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose.

II.3.c - Dosage des acides nucléiques

La concentration des acides nucléiques a été déterminée par dosage spectrophotométrique à l'aide du NanoDrop® ND 1000 (Thermo Scientific). Cet appareil permet d'une part de déterminer l'absorbance des échantillons à **260 nm** (A_{260}), zone d'absorbance des acides nucléiques, mais également à **280 nm** (A_{280}), correspondant à la zone d'absorption des protéines et à **230 nm** (A_{230}), zone d'absorption de différentes molécules chimiques pouvant être contenues dans les kits utilisés. Le logiciel associé à l'appareil permet le calcul des rapports A_{260}/A_{280} et A_{260}/A_{230} permettant d'évaluer la pureté des échantillons.

III. Clonage dans les vecteurs plasmidiques

III.1. Clonage de type T-A

Cette stratégie de clonage utilise l'activité déoxynucléotidyl terminal transférase de la Taq polymérase. L'enzyme ajoute une adénine supplémentaire à l'extrémité des produits amplifiés. Le vecteur de clonage, sous forme linéarisé, possède quant à lui une thymine supplémentaire à ses extrémités permettant une hybridation avec les extrémités cohésives complémentaires de l'insert. Lorsque les fragments étaient amplifiés à l'aide d'une ADN polymérase haute-fidélité (Q5) ne possédant pas l'activité déoxynucléotidyl terminal transférase précédente, l'étape supplémentaire de rajout de cette base, appelée A-tailing, est nécessaire. Celle-ci se réalise par incubation pendant 30 minutes à 70°C de 6,8 μL de produit PCR avec 0,2 mM de dATP, 5 U de Gotaq® et 2 μL de tampon de réaction à concentration finale 1X dans un volume réactionnel de 10 μL .

Dans notre cas, le kit pGEM®-T Easy Vector System II (Promega) a été utilisé pour réaliser la majorité des sous-clonages nécessaires aux clonages réalisés lors des différentes études de ce manuscrit et a ainsi été la base de nombreuses réactions de séquençages, réalisés avec les amorces universelles M13F et M13R (*Tableau S3 ANNEXE 3*).

La ligation est réalisée à un ratio molaire 1 : 3 vecteur : insert dans un volume réactionnel de 10 μL comprenant un volume d'insert déterminé par calcul, 1 μL (50 ng) de vecteur, 5 μL de tampon de ligation Rapid Ligation Buffer 2X et 3 U de T4 ligase, tous les trois fournis dans le kit. Le volume d'insert est déterminé par le calcul suivant : $\text{ng insert} = \frac{(\text{ng vecteur} \times \text{taille insert})}{\text{taille vecteur}}$, où la taille de l'insert et du vecteur sont exprimés en kb. La réaction est finalement incubée à 4°C pendant une nuit avant d'être utilisée pour une transformation bactérienne. Les colonies ayant intégré le plasmide pourront être sélectionnée d'une part grâce à la résistance à l'ampicilline apportée par le vecteur et d'autre part grâce au crible blanc/bleu rendu possible par ajout de 0,5 mM d'IPTG, de 0,2 mM du substrat de l'enzyme β -galactosidase, le 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside (X-gal) sur les boîtes de milieu LB solide et par la présence du gène *LacZ* dans le plasmide.

III.2. Clonage dans les vecteurs de double-hybride

Les vecteur pLex (pBTM116) et pGADT7 (Clontech) ont été utilisé lors de notre étude de la capacité de dimérisation des RR-B. La séquence des domaines DDK de chaque RR à l'exception du DDK du RR13, déjà construit au laboratoire (*Thèse L. Bertheau, 2013*), a été clonée en amont du site de liaison à l'ADN contenu dans le pLex et du site de *trans*-activation contenu dans le pGAD. Ce clonage a été effectué par l'incorporation au niveau des amorces de sites enzymatiques compatibles avec les sites multiples de clonage (ou **Multi Cloning Site MCS**) présent dans ces deux plasmides et absents des séquences des domaines DDK à amplifier (*Tableau 5*).

L'amplification PCR a été réalisée à l'aide de la Q5 et de matrices ADN contenant la séquence complète des RR-B. Un sous-clonage a ensuite été réalisé dans le plasmide pGEM®-T comme explicité précédemment ainsi qu'une sélection des bactéries recombinantes sur milieu LB supplémenté en ampicilline. Une PCR de séquençage a finalement été effectuée afin de vérifier la conformité de la séquence obtenue. Les inserts ainsi que les deux vecteurs de double-hybride ont ensuite été digérés par les enzymes de restrictions adéquates et la ligation a été effectuée. Cette réaction est réalisée dans un volume réactionnel de 10 µL et met en présence un volume d'insert déterminé par le calcul précédent, 50 ng de plasmide linéarisé, 10 U de T4 DNA ligase (New England Biolabs) et 1 µL de tampon de réaction à concentration finale 1X. La réaction est incubée à 25°C sur la nuit avant d'être utilisée lors d'une transformation bactérienne. La vérification de la présence des plasmides a été vérifiée par sélection ampicilline et le contrôle de la présence des inserts au sein des deux plasmides a été réalisée par PCR sur colonies grâce à l'utilisation des couples d'amorces universelles LexA5/LexA3 et T7prom/ACT3 respectivement pour le pLex et le pGAD (*Tableau S3 ANNEXE 3*). Ces mêmes amorces ont été utilisées pour réaliser des PCR de séquençage afin de vérifier le respect du cadre de lecture lors des clonages. Les plasmides ont finalement été utilisés lors de transformation des souches de levures L40Δ et Y187, et la présence des plasmides a été vérifiée comme précédemment.

DDK de RR	Site de clonage		Amorces utilisées (5'-3')	Tm
	pLex	pGAD		
12	<i>XmaI/SalI</i>	<i>XmaI/XhoI</i>	CGCGCCCGGGGATGATGAATCTTGCTAACTGC ATCGCGTCGACTTATTGCTCCAAATCCCTCCATTC	58°C
14	<i>XmaI/SalI</i>	<i>XmaI/XhoI</i>	CGCGCCCGGGGATGGAAAATAATGGTTTCTCTTCTCC ATCGCGTCGACTTAAGTTTCAATGTCTCTTACCTCATG	66°C
15	<i>XmaI/SalI</i>	<i>XmaI/XhoI</i>	CGCGCCCGGGGATGGCTGCTTTGCAGCGAGT ATCGCGTCGACTTAATGTTCTTGTCTTTGTTCTCA	58°C
16	<i>XmaI/SalI</i>	<i>XmaI/XhoI</i>	CGCGCCCGGGGATGGCTGCTTTGCAGCGAGTGG ATCGCGTCGACTTAATGTTCTTGTCTTTGTTTTTCATTCC	68°C
18	<i>XmaI/SalI</i>	<i>XmaI/XhoI</i>	TCCCCCGGGGATGGCTGTAGACGACCAAAG ATCGCGTCGACTTACCTGTTTTGGTCCCTCGGGATAC	60°C
19	<i>XmaI/SalI</i>	<i>XmaI/XhoI</i>	CGCGCCCGGGGATGACCGTAGAGGACCAAAGG ATCGCGTCGACTTACCCGTTCTGGTCTGGGGATA ATCGCCTCGAGTTACCCGTTCTGGTCTGGGGATA	64°C
21	<i>XmaI/SalI</i>	<i>XmaI/XhoI</i>	CGCGCCCGGGGATGGAGAATGGTTTCTCCTCTCC ATCGCGTCGACTTAAATTTCAATATCTCTTACCTCGTG	64°C
22	<i>XmaI/SalI</i>	<i>XmaI/XhoI</i>	CGCGCCCGGGGATGACTGTAGAACAGGGGAT ATCGCGTCGACTTAGCTGTTTCTGTCTTTGTTATC	58°C

Tableau 5 : Stratégie de clonage des domaines DDK des RR-B pour les expériences de double-hybride en levure. Les nucléotides en vert représentent les sites de restriction XmaI (CCCGGG), SalI (GTCGAC) et XhoI (CTCGAG). Les nucléotides en bleu et en rouge représentent respectivement les codons d'initiation et d'arrêt de la traduction.

III.3. Clonage dans le pGEX-5X-1

Le clonage des domaines GARP des RR18, 19 et 22 dans le plasmide pGEX-5X-1 (GE Healthcare) a été nécessaire afin d'effectuer les étapes de production de protéines de fusion GST-GARP-RR permettant de réaliser des expériences de gel retard. Ce clonage enzymatique a été effectué après ajout par PCR des sites de restriction aux domaines GARP et sous-clonage dans le plasmide pGEM®-T pour séquençage. Les amorces spécifiques utilisées pour les clonages sont regroupées dans le tableau 7. Le contrôle de la présence du vecteur est assurée par une sélection des bactéries sur milieu LB supplémenté en ampicilline, la présence des inserts au sein de ce plasmide est testée par PCR sur colonie à l'aide du couple d'amorces pGEX5/pGEX3 (*Tableau S3 ANNEXE 3*) et la conformité des séquences obtenues est contrôlée par PCR de séquençage réalisée avec les amorces précédentes.

GARP du RR	Site de clonage	Amorces utilisées (5'-3')	Tm
18	<i>EcoRI/NotI</i>	ATCCGGAATTCAAACGTAAGGACCAAGATGATGAGG ATCCGGCGGCCGCTCAGTTTCTCCACTACTTAGTCTTTTC	62°C
19	<i>EcoRI/NotI</i>	ATCCGGAATTCATGAAGAAGCCTCGAGTTGTTTGG ATCCGGCGGCCGCTCAACAACCTTAGTCTTTTGAGGTAAG	66°C
22	<i>EcoRI/NotI</i>	ATCCGGAATTCATGAAGAAGCCGCGGGTTGTATGG ATCCGGCGGCCGCTCAGGTGCTGATCCTTTTAAGGTAATG	74°C

Tableau 6 : Stratégie de clonage des RR-B pour les expériences de production des protéines de fusion.

Les nucléotides en vert représentent les sites de restriction EcoRI (GAATTC) et NotI (GCGGCCGC). Les nucléotides en bleu et en rouge représentent respectivement les codons d'initiation et d'arrêt de la traduction.

III.4. Clonage dans les plasmides du système de *trans*-activation utilisé chez le tabac

Les plasmides effecteurs et rapporteurs dérivent du pCAMBIA 1305.1 (Numéro d'accension : AF354045) et ont été créés pour les études de *trans*-activation par Xiao et collaborateurs en 2006, puis modifié en 2007. La méthode utilisée dans ce manuscrit a été finalisée par Nassuth et collaborateurs en 2014. Les deux plasmides seront appelés par la suite plasmides effecteurs et receveurs (*ANNEXE 4*). Lors de notre étude, ces plasmides ont été utilisés pour tester la capacité des effecteurs RR13, 18 19 et 22 vis-à-vis des promoteurs des gènes *HK1a* et *RR18*, la construction contenant le promoteur du *RR13* a été effectuée mais n'a pu être testée. L'ensemble des amorces ayant permis la construction des plasmides sont répertoriées dans le tableau 8.

Effecteurs	Site de clonage	Amorces utilisées (5'-3')	Tm
RR13	<i>BamHI/SacI</i>	<u>GGACTCTAGAGGATCCATGTCAACGGCTAGTTCTGG</u> <u>GATCGGGGAAATTCGAGCTCTACACAGGAATATTATCCAGG</u>	60°C
RR18	<i>BamHI/SacI</i>	<u>GGACTCTAGAGGATCCATGGCTGTAGACGACCAAAG</u> <u>GATCGGGGAAATTCGAGCTCTTAGAGCACGAAAACCTGAAATGG</u>	60°C
RR19	<i>BamHI/SacI</i>	<u>GGACTCTAGAGGATCCATGACCGTAGAGGACCAAAG</u> <u>GATCGGGGAAATTCGAGCTCTCATACCCGTTTGATCATTGC</u>	60°C
RR22	<i>BamHI/SacI</i>	<u>GGACTCTAGAGGATCCATGACTGTAGAACAGGGGATT</u> <u>GATCGGGGAAATTCGAGCTCTAACCAAGAATGGTTGGCAA</u>	60°C
Rapporteurs			
PromHK1a	<i>HindIII/BamHI</i>	<u>CCATGATTACAAGCTTCTAGGGTTTACATTTCTTGCC</u> <u>ATATCTCCTTGGATCCGACACAAGAGGGAGGGAG</u>	58°C
PromRR13	<i>HindIII/BamHI</i>	<u>CCATGATTACAAGCTTTATAGAGCTGGGGATCATGTG</u> <u>ATATCTCCTTGGATCCCTTTGATCTCCAACCCAGC</u>	60°C
PromRR18	<i>HindIII/BamHI</i>	<u>CCATGATTACAAGCTTTCAGATTGGGTGCTTCATGTT</u> <u>ATATCTCCTTGGATCCGCCTTTCAGACAAAACCCAG</u>	60°C

Tableau 7 : Stratégie de construction des plasmides effecteurs et rapporteurs pour les expériences de trans-activation en cellules de tabac.

Les nucléotides en vert représentent les sites de restriction BamHI (GGATCC), HindIII (AAGCTT) et SacI (GAGCTC). Les nucléotides en bleu et en rouge représentent respectivement les codons d'initiation et d'arrêt de la traduction et les nucléotides soulignés représentent les séquences identiques avec les séquences bordant le site d'insertion du vecteur effecteur (GGACTCTAGA et GATCGGGGAAATTC) ou rapporteur (CCATGATTAC et ATATCTCCTT).

Les clonages de l'ensemble des partenaires au sein des plasmides effecteurs et rapporteurs ont été effectués par ligation sans usage de digestions enzymatiques des inserts par usage du kit In-Fusion® HD Cloning kit (Clontech) selon les instructions du fournisseur. Les plasmides ont ensuite permis la transformation de bactéries dont la présence de l'insert a été contrôlée par PCR sur colonie à l'aide des amorces précédentes spécifiques à chaque insert puis la conformité de la séquence a été contrôlée par réactions de séquençages avant la transformation de la souche d'*Agrobacterium* EHA 105, permettant la transformation du tabac.

III.5. Clonage dans le plasmide pENTR™/D-TOPO®

Le vecteur d'entrée de clonage directionnel pENTR™/D-TOPO® (Termo Fisher Scientific) a permis le sous-clonage de différents produits PCR par stratégie TOPO® pour l'étude d'extinction de gènes par technique RNAi et l'étude de la localisation de l'activité de gènes par utilisation du rapporteur *GUS*. Pour la technique RNAi, les fragments des *RR18*, *19* et *22* ainsi que du fragment commun aux *RR18* et *19* et pour la technique de localisation d'activité de promoteurs, les séquences des promoteurs des gènes *HK1a*, *RR13* et *18* ont été clonés par cette technique. Ces clonages s'appuient sur une ligation directionnelle entre certaines séquences spécifiques présentes sur le vecteur et ajoutées aux extrémités de l'insert par PCR à haute-fidélité (Tableau 9). La réaction est élaborée telle qu'explicitée par le fournisseur et l'action d'une topoisomérase I présente dans le kit pENTR™/D-TOPO® Cloning Kit permettra alors l'insertion de la séquence souhaitée au sein du vecteur. Ce dernier

a été utilisé lors de transformations de bactéries compétentes, sélectionnées grâce à la résistance à la kanamycine apportée par le vecteur et des PCR des séquençages ont été effectuées à l'aide des amorces universelles M13F et M13R (*Tableau S3 ANNEXE 3*).

RNAi	Amorces utilisées (5'-3')	Tm
RR18	<u>CACCGAAAGGAGAAGAGTATCTGAG</u> ATTAATATTTTAGAAAAGGGTG	54°C
RR19	<u>CACCCATATTGAAGGAGAAGAAGG</u> CAAATATTAATAAATTAAGGAAAGAG	60°C
RR22	<u>CACCAGCAGATTTAAACAGCCAAGGTC</u> GGAGACACTTTTCTTGGTAGAAAT	66°C
RR18/19	<u>CACCGTTACAACACTACCAATCAAGCAG</u> TCCATTTTCGAGCCCCACGAG	62°C
Pomoteurs		
PromHK1a	<u>CACCTTAACTAGGGTTTACATTTCTTGCC</u> GACACAATTAAGAGGGGAGGGAGG	68°C
PromRR13	<u>CACCTATAGAGCTGGGGATCATGTGCTTG</u> CTTTGATCTCCAAACCCAGC	60°C
PromRR18	<u>CACCTCAGATTGGGTGCTTCATGTC</u> GCCTTTCAGACAAAACCCAGATGGC	62°C

Tableau 8 : Stratégie de clonage dans le plasmide pENTR™/D-TOPO® pour les expériences de RNAi et de localisation de l'activité promotrice des partenaires du MSP.

La séquence CACC permet l'intégration de l'insert dans le plasmide.

III.6. Recombinaison dans les plasmides du système Gateway®

Les vecteurs de destination pKGWFS7 et pK7GWIWG2D(II) (*ANNEXE 4*) ont respectivement été utilisés comme plasmides finaux pour l'étude de la localisation de l'activité des promoteurs de gènes et pour la stratégie d'extinction de gènes par technique RNAi. Ainsi, les inserts précédemment obtenus dans le plasmide donneur pENTR™/D-TOPO® sont clonés au sein des plasmides receveurs appropriés par recombinaison *in vitro* à l'aide du kit Gateway® LR Clonase® Enzyme mix (Thermo Fisher Scientific) grâce à la présence sur ces trois plasmides de séquences de recombinaison appelées sites attL pour le plasmide donneur et attR pour les deux plasmides receveurs. La réaction est réalisée tel qu'expliqué par le fournisseur. La sélection des événements de recombinaison sera sélectionnée sur milieu LB supplémenté en spectinomycine et chloramphénicol et le contrôle de la présence des inserts sera réalisé par PCR sur colonie réalisée à l'aide des amorces spécifiques ayant servies au clonage dans le plasmide d'entrée dans le cas du plasmide pKGWFS7 et par l'utilisation de l'amorce sens seule spécifique à chaque clonage dans le cas du pK7GWIWG2D(II) grâce à la formation dans ce plasmide d'une structure en « épingle à cheveux » positionnant les inserts l'un face à l'autre (*Tableau 9*). Dans certains cas, l'utilisation de l'amorce 5' n'a pas permis d'obtenir d'amplification convenable et des amorces conçues à l'aide de la séquence du plasmides et appelée 5SeqpRNAi et 3P35SRNAi (*Tableau 3 ANNEXE 3*) ont été utilisées.

IV. Transformation et croisement du matériel biologique

IV.1. Transformation du matériel végétal

Au cours de cette thèse, des boutures de peuplier ont été transformées par *Agrobacterium* dans l'optique d'une part de créer des lignées n'exprimant plus les *RR18*, *19* et *22* et d'autre part pour créer des lignées permettant de visualiser l'expression des promoteurs de différents partenaires de la voie par stratégie gène rapporteur *GUS*.

D'autre part, afin de réaliser les deux méthodes d'analyse de la capacité de *trans*-activation des RR-B, des plants de tabac ainsi que des suspensions cellulaires de pervenche de Madagascar ont été transformés, respectivement par *Agrobacterium* et par biolistique.

IV.1.a - Agroinfection des boutures de peuplier

Afin de réaliser l'infection des boutures de peuplier, des vitroplants du génotype 717-1B4 âgés de deux mois et cultivés sur milieu MS ½ sont utilisés.

Sous conditions stériles, le plant est sorti du tube, les feuilles et les racines sont éliminées puis des sections latitudinales de la tige sont réalisées afin d'obtenir des fragments d'environ 0,8 cm. Chaque fragment de tige est également sectionné de manière longitudinale, cette blessure permettant d'augmenter la capacité d'infection par *Agrobacterium*, d'une part grâce à une augmentation de la surface de contact entre les deux partenaires, et d'autre part par une augmentation de la libération de molécules signalisatrices de la blessure, tels que des composés phénoliques, éléments chimioattractants pour la bactérie. Les sections de tiges sont ensuite disposées sur un milieu M1 solide et incubées à l'obscurité à 25°C. En parallèle, des cultures de chaque souche d'*Agrobacterium* contenant la construction promotrice ou RNAi à tester ou bien le témoin de transformation pH8-CAD (ANNEXE 4) sont réalisées tel qu'explicité en partie Matériel, chapitre II.2 de ce manuscrit.

Après 48 heures d'incubation à 28°C, une suspension bactérienne d'*A*₆₆₀ comprise entre 0,25 et 0,30 est réalisée à partir des cultures solides précédentes et les explants sont mis en contact avec celle-ci. Le mélange est incubé pendant minimum 16 heures à 25°C en obscurité sous agitation à 180 RPM. Après incubation, la suspension est éliminée par aspiration et les explants sont récupérés, rapidement séchés sur du papier absorbant stérile puis replacés sur le milieu M1 solide précédemment utilisé pour 48 heures à l'obscurité à 25°C.

Les bactéries en excès au niveau des explants sont ensuite éliminées par un premier lavage effectué avec 100 mL d'eau ultrapure stérile et agitation manuelle pendant 2 minutes puis 5 séries de lavages, comprenant chacune l'ajout de 100 mL d'eau ultrapure stérile, 5 minutes d'incubation en rotation à 125 RPM et élimination de l'eau.

Les explants sont finalement rapidement séchés sur du papier absorbant stérile puis déposés sur le milieu sélectif M2 solide, permettant à la fois la mort des bactéries excédentaires et le développement de cals au niveau des explants. Les cals obtenus seront ensuite traités comme explicité en partie Matériel, chapitre II.2 de ce manuscrit.

IV.1.b - Agroinfection des plants de tabac

Cette technique a été utilisée pour tester les capacités de *trans*-activation des RR13, 18, 19 et 22 sur les promoteurs des gènes *HK1a*, *RR13* et *RR18 in vivo* par transformation de la plante modèle *Nicotiana benthamiana*. Elle s'appuie sur le protocole développé par Xiao et collaborateurs en 2007 et modifié par Nassuth et collaborateurs en 2014.

Les deux souches d'*Agrobacterium* contenant respectivement les constructions effectrices et reportrices sont précultivées sur une nuit à 28°C à 280 RPM dans 3 mL de milieu LB-A tabac évoqué en partie Matériels, chapitre II.2 de ce manuscrit afin d'obtenir une culture à saturation. Le lendemain, les 3 mL de préculture précédents de chaque construction sont ajoutés à 25 mL de milieu d'induction LB-I tabac à température ambiante et l'ensemble est incubé pendant 3 heures à 28°C à 280 RPM, jusqu'à ce

que l'absorbance à 600 nm soit comprise entre 0,7 et 1 pour la souche contenant la construction reportrice et supérieure à 0,5 pour la souche contenant la construction effectrice.

Les bactéries sont ensuite centrifugées à 5000 RPM pendant 10 minutes puis éliminer le surnageant puis le culot est resuspendu dans 10 à 35 mL de $MgCl_2$ 10mM selon l'absorbance obtenue précédemment.

L'absorbance à 600 nm de la culture en $MgCl_2$ est réalisée afin de vérifier qu'elles soient d'approximativement 1.

A l'aide de la culture précédente, une solution de 25 mL (ou 35 mL) d'absorbance 0,5 pour les effecteurs et 1 pour les rapporteurs est réalisée en $MgCl_2$ 10mM. Un volume équivalent à une concentration finale de 150 μM d'acétosyringone est ajouté et les cultures sont incubées 2 à 3 heures à température ambiante sans agitation.

Une solution bactérienne d'un volume final compris entre 10 et 30 mL est préparée par combinaison des deux solutions précédentes, à un ratio 1 : 1, conduisant à des absorbances finales de 0,25 et 0,5 respectivement pour l'effecteur et le rapporteur.

Pour chaque combinaison effecteur/rapporteur à tester les 3^{èmes} et 4^{èmes} feuilles en partant du bourgeon apical de trois plants au stade 6 à 8 feuilles, correspondant à environ un mois de culture, sont utilisées. Pour ces 6 feuilles par condition, la suspension bactérienne contenant les deux partenaires à tester pour chaque combinaison est injectée dans 4 zones minimum à l'aide d'une seringue au niveau des cellules de l'épiderme de la face inférieure du limbe afin de couvrir une surface maximale. Les plants sont replacés pendant 2 jours en chambre de culture dans les conditions évoquées en partie Matériels, chapitre II.2 de ce manuscrit.

IV.1.c - Transformation des cellules de Pervenche de Madagascar par biolistique

La biolistique est une méthode de transfert direct de gène, qui consiste à propulser un gène d'intérêt dans le noyau d'une cellule moyennant un canon à ADN. Cette technique nécessite l'obtention de tapis cellulaires, dont la préparation est détaillée dans la partie Matériels, chapitre II.1 de ce manuscrit. Toutes les étapes de cette technique ont été effectuées suivant le protocole établi par [Guirimand et collaborateurs en 2009](#).

Une fois les tapis cellulaires obtenus sur boîtes de Pétri, la transformation est réalisée par bombardements à l'aide de bille d'or de diamètre 1 μm (1.0 Micron Gold, Bio-Rad) préalablement préparées et du canon à particules PDS-1000/He Biolistic (Bio-Rad).

Préparation des microbilles

Pour 5 répétitions, 3 mg de billes d'or sont mises en contact de 5 μg de vecteur rapporteur et 2,5 μg de vecteur *pUBI-GUS* permettant le contrôle de la transformation. L'adsorption est réalisée dans un milieu contenant de la spermidine 0,1 M et du $CaCl_2$ 2,5 M incubé 15 minutes à température ambiante et sous agitation douce. Le mélange est ensuite centrifugé et le surnageant éliminé. Le culot contenant les microbilles est ensuite lavé et celles-ci sont remises en suspension dans 48 μL d'éthanol pur.

Transformation des cellules

Pour chaque transformation, 8 μL de la solution de microbilles précédentes, soit 500 μg , sont déposées sur le disque porteur du canon à particules. Après évaporation de l'éthanol, ce disque est placé sur son support et le tapis cellulaire est disposé à 6 cm du dispositif de projection. Le bombardement est réalisé sous une pression d'hélium de 1100 psi, sous vide partiel de 28 in.Hg. Les tapis cellulaires sont ensuite replacés en incubation pendant 24 heures à 25°C à l'obscurité.

IV.2. Transformation de bactéries

Afin de réaliser la transformation des bactéries, celles-ci doivent être rendues compétentes. Lors de l'utilisation de souches commerciales, cette étape est déjà réalisée. Dans le cas de souches non

commerciales, les bactéries sont rendue compétentes par une méthode adaptée de [Sambrook et collaborateurs](#) en 1989, permettant de rendre perméable la paroi bactérienne grâce à l'utilisation d'une solution de CaCl₂.

Quelques colonies bactériennes sont prélevées et servent àensemencer 3 mL de milieu LB. La culture est incubée une nuit à 37°C sous agitation à 250 RPM. Le lendemain, 500 µL de préculture sont dilués dans 50 mL de milieu LB et la solution est incubée à 37°C jusqu'à l'obtention d'une DO₆₀₀ comprise entre 0,3 et 0,5. Les cellules bactériennes sont alors récoltées par centrifugation (10 minutes à 4°C et 5000 RPM) puis reprises dans une solution de CaCl₂ 50 mM. Après 20 minutes d'incubation à 4°C, les bactéries sont de nouveau centrifugées comme précédemment pour être enfin reprises dans une solution de CaCl₂ 50 mM contenant 20% de glycérol. Le volume bactérien est ensuite aliquoté en microtubes par 50 µL et stocké à -80°C.

IV.2.a - Transformation par choc thermique

La transformation est réalisée avec respectivement 50 µL ou 100 µL de bactéries *E.coli* compétentes DH5α ou BL21, mélangées directement avec 5 µL de réaction de ligation ou 0,5 µL de plasmide d'intérêt et incubées pendant 30 minutes dans la glace. Le mélange est ensuite transféré à 42°C pendant 30 secondes puis placé dans la glace pendant 2 minutes. Neuf cent cinquante microlitres de milieu SOC sont ajoutés puis les tubes sont incubés à 37°C à 250 RPM pendant 1 heure. Un volume de transformant adapté est ensuite étalé sur milieu LB solide supplémenté en antibiotique de sélection et en marqueurs sélectifs (IPTG et X-Gal) si nécessaire. Les boîtes sont incubées pendant une nuit à 37°C.

Le protocole est un peu différent pour la souche compétente d'*A. tumefaciens* EHA 105. Pour chaque transformation, 1 µg de plasmide d'intérêt est placé au contact de 40 µL de bactéries compétentes et le mélange est incubé dans la glace pendant 5 minutes. Les bactéries sont ensuite refroidies dans l'azote liquide pendant 5 minutes puis incubés à 37°C pendant 5 minutes. Après ajout de 1 mL de milieu LB, les bactéries sont incubées sous agitation à 230 RPM à 28°C pendant 2 heures. Après une centrifugation de 30 secondes à 13000 RPM, le surnageant est éliminé et le culot bactérien est resuspendu dans 200 µL de LB. La totalité du volume est étalée sur milieu LB solide supplémenté en kanamycine et rifampicine pour permettre respectivement la sélection du plasmide contenant le facteur de transcription ou la cible moléculaire et celui contenant les gènes VIR de l'*Agrobacterium*. Les boîtes sont incubées 48 heures à 28°C puis un contrôle de la transformation des bactéries est effectué par PCR sur colonie, tel que réalisé dans le chapitre I.2.a-2 de ce manuscrit.

IV.2.b - Transformation par conjugaison triparentale

Cette technique fait appel à la conjugaison entre deux souches d'*E.coli* et une souche d'*A. tumefaciens*, respectivement appelées souche donneuse (plasmide d'interêt), helper (pRK2013) et receveuse (C58-pMP90), décrites en partie Matériels, chapitre I.4 de ce manuscrit. Un contrôle positif de la réaction de conjugaison est également ajouté par utilisation de la souche *A. tumefaciens* C58, pBIN19 codant pour le gène rapporteur *LacZ*.

Une colonie de chacune de ces 4 souches est prélevée stérilement et resuspendue indépendamment dans 100 µL de milieu LB liquide. Une boîte de milieu LB, divisée en 4 parties, est utilisée afin de mélanger les différentes constructions comme suit : 5 µL de la souche receveuse et 5 µL de la souche donneuse (RD), 5 µL de la souche receveuse et 5 µL de la souche helper (RH), 5 µL de chacune de ces 3 souches précédentes(RDH), et enfin 5 µL de la souche témoin positif (T+) ([Tableau 10](#)). Les gouttes sont séchées autour d'une flamme puis la boîte est incubée à 28°C pendant une nuit.

Le lendemain, chaque croissance bactérienne obtenue est prélevée à l'aide d'un cône stérile et resuspendue au vortex dans 500 µL d'eau ultrapure stérile. Des dilutions en cascade de facteur 10 de 10⁻¹ à 10⁻⁴ sont réalisées à partir de 50 µL de bactéries resuspendues et 50 µL de chaque dilution sont étalés sur milieu LB contenant les antibiotiques appropriés et selon les modalités du tableau 5. Les

différentes cultures sont incubées pendant 2 jours à 28°C. Des PCR sur colonies sont effectuées comme explicité en partie Méthodes, I.2.b de ce manuscrit.

	Dilutions étalées	Milieux utilisés	Rôle
RD	10 ⁻²	LBGK	Contrôle négatif de croissance sur milieu sélectif
RH	10 ⁻²	LBGK	Contrôle négatif de croissance sur milieu sélectif
RDH	10 ⁻² , 10 ⁻³ , 10 ⁻⁴	LBGK	Tests de conjugaison triparentale
RDH	10 ⁻³ , 10 ⁻⁴	LBG	Evaluation du bruit de fond de la technique
T+	10 ⁻⁴	LBGK	Contrôle positif de croissance sur milieu sélectif

Tableau 9 : Résumé des différentes cultures réalisées dans le cadre de la conjugaison triparentale.

RD correspond au croisement de la souche de destination Agrobacterium C58 contenant le plasmide pMP90 et de la souche contenant le plasmide d'intérêt, RH à celui de la souche de destination Agrobacterium C58 contenant le plasmide pMP90 et de la souche contenant le plasmide helper pRK2013, RDH à celui contenant les 3 partenaires précédent et T+ à une souche d'Agrobacterium C58 contenant le plasmide pBIN-19 et utilisée comme contrôle positif.

IV.3. Transformation et croisement de levures

IV.3.a - Transformation de levures

Les transformations de levure sont réalisées d'après [Gietz et al., 1995](#).

Des précultures des souches de levures L40Δ et Y187 sont réalisées en milieu riche YPD et incubées une nuit à 30°C à 250 RPM. Le lendemain, une culture de densité optique 0,25 à 600nm (DO₆₀₀) est réalisée à raison de 5mL de culture par transformation à effectuer et incubée sous agitation à 250 RPM. La culture ayant atteint une DO₆₀₀ de 1 est centrifugée pendant 3 minutes à 3000 RPM à 4°C puis les levures sont rincées à l'eau distillée. Le culot est resuspendu dans de l'acétate de lithium (LiAc) 80 mM.

Chaque transformation est réalisée à l'aide d'un mélange contenant du PEG₃₃₅₀ à 35%, du LiAc 80 mM, de l'ADN porteur dénaturé simple brin à 0,14 mg/mL et 2,59 ng de plasmide. Soixante-quinze microlitres de levures sont ajoutés et la suspension est incubée 30 minutes à 30°C puis 20 minutes à 42°C. Après centrifugation à 7000 RPM, les culots sont resuspendus dans de l'eau stérile puis étalés sur milieu sélectif -L ou -W, présentés dans le tableau 4 de la partie I.5, et incubées pendant 3 ou 4 jours à 30°C. La vérification de la présence des plasmides est réalisée par PCR sur colonies tel que décrit en partie Méthodes, chapitre I.2.a.

IV.3.b - Croisement des levures haploïdes

Afin d'obtenir une souche de levure diploïde contenant les deux partenaires à tester, les souches haploïdes L40Δ et Y187, contenant chacun un partenaire et de signes sexuels opposés respectifs MATa et MATα sont croisées.

Une quantité équivalente de chaque partenaire est resuspendue dans du YPD liquide puis 5 µL de chaque suspension sont mis en contact sous forme d'une goutte sur milieu solide YPD. Les croisements sont incubés une nuit à 30°C. Le lendemain, un quart de la périphérie de la goutte précédente est récupéré et resuspendu dans 500µL d'eau stérile puis 100 µL de cette suspension sont étalés sur milieu sélectif -LW. Les boîtes sont incubées pendant 3 jours à 30°C. La vérification de la présence des deux partenaires est réalisée comme précédemment.

V. Analyses biochimiques

V.1. Productions et extraction des protéines recombinantes GST-GARP-RR

Ces expériences sont réalisées afin de d'étudier la capacité de ces RR-B à se fixer sur des cibles ADN déterminées. Cette étude se réalise par des expériences de gel retard et nécessite ainsi la production préalable des protéines d'intérêt, couplé à la GST permettant la purification de la protéine de fusion. Cette production est réalisée pour les domaines de liaison à l'ADN (GARP) des RR18, 19 et 22, à l'instar du travail mené lors de la [thèse de L. Bertheau en 2013](#) et nécessite une étape de co-transformation de la souche bactérienne *E.coli* BL21. Le plasmide pGEX-5X-1 contenant le domaine GARP d'un des RR-B (permettant la production d'une protéine de fusion GST-GARP-RR) et le plasmide pUBS520 sont ainsi utilisés. Ce dernier plasmide porte un gène de résistance à la kanamycine ainsi que le gène de *dnaY* d'*E. coli* codant pour un ARN de transfert isoaccepteur des codons arginine AGG et AGA (ARN^t^{ARG}). La surexpression de *dnaY* permet une traduction plus efficace des ARN messagers (ARNm) renfermant un nombre important de codons arginine, cet acide aminé n'étant que faiblement exprimé chez la souche *E.coli* BL21.

V.1.a - Productions des protéines de fusion chez *E.coli*

Un clone de chaque souche d'*E. coli* BL21 possédant le gène *lacI* et co-transformé comme expliqué précédemment est utilisé pour réaliser une pré-culture de 3 mL milieu LB-P ([Tableau 3](#)) et celle-ci est incubée à 37°C et sous agitation à 250 RPM pendant une nuit.

Le lendemain, 600 µL de cette pré-culture sont utilisés pour ensemercer 50 mL de milieu LB-P puis les cultures sont placées à 37°C sous agitation à 250 RPM. La DO₆₀₀ de cette culture est régulièrement relevée au spectrophotomètre jusqu'à l'obtention d'une DO₆₀₀ comprise entre 0,5 et 0,6. Lorsque la culture est dans cette phase exponentielle de croissance, l'induction de la synthèse protéique est réalisée par ajout de 3 à 4 mM d'IPTG dans le milieu précédent. Cette induction est laissée à 37°C et sous agitation à 250 RPM pendant 2 à 4 heures puis la culture est centrifugée pendant 10 minutes à 5500 RPM, le surnageant est éliminé et les culots sont stockés à -20°C jusqu'à l'extraction des protéines totales.

V.1.b - Extraction des protéines totales d'*E.coli*

Afin d'obtenir des protéines solubles, le culot bactérien est repris dans un mélange contenant 2 mL de tampon phosphate salin ou Phosphate Buffered Saline (PBS) 1X, 100 µg/mL de lysozyme et 2 µL de cocktail d'inhibiteurs de protéases (Sigma). Le mélange est vortexé pendant 2 minutes à vitesse maximale puis incubé à 37°C pendant 10 minutes en bain-marie. Trois cycles de sonication à 75/80 W, comprenant chacun 30 secondes de fonctionnement pour 90 secondes d'arrêt, le tout répété pendant 5 minutes sont réalisés.

Pour chaque culot, 20 U de DNase I (New England Biolabs) associé à son tampon réactionnel à concentration finale 1 X sont ajoutés, l'ensemble est brièvement vortexé et la réaction est incubée pendant 10 minutes à 37°C.

Les extraits bactériens sont clarifiés par centrifugation (15 minutes à 13000 RPM à 4°C), les surnageants ainsi que les culots sont récupérés séparément et stockés à -20°C pour l'analyse de la production de la protéine d'intérêt, réalisée par électrophorèse SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE).

V.1.c - Analyse de la production des protéines recombinantes GST-GARP-RR par électrophorèse SDS-PAGE

La production des protéines recombinante est analysée par électrophorèse en gel polyacrylamide (1 mm d'épaisseur) dénaturant selon la méthode de [Laemmli \(1970\)](#). Ce gel est composée d'une partie permettant la concentration des protéines (4 % d'acrylamide-bisacrylamide [T

40% ; C 3,3%], 125 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,1% SDS (m/v), 0,1% Ammonium PerSulfate (APS), 3 µL de N,N,N',N'-TetraMéthylEthylèneDiamine (TEMED)) et d'un gel permettant la séparation des protéines selon leur poids moléculaire (10% d'acrylamide-bisacrylamide [T 40% ; C 3,3%], 375 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,1% SDS (m/v), 0,1% APS, 3,2 µL TEMED). L'électrophorèse est réalisée à l'aide du système Mini-PROTEAN® 3 Electrophoresis Cell (Bio-rad).

A l'exception de la souche GST-GARP-RR13 constituant le contrôle positif, la capacité de production de trois souches bactériennes différentes ont été testées. Ainsi, pour chaque test, la DO₆₀₀ de l'extrait protéique est réalisée et la même quantité de chaque échantillon est chargée sur gel à l'aide du tampon de charge commercial Lysis Sample Buffer (LSB, BioRad) auquel du β-mercaptoéthanol a été ajouté à raison de 20 µL pour 400 µL de volume final de tampon.

La migration est effectuée à 120 V dans du tampon Tris-Glycine-SDS (TGS) pendant des temps variables et la progression de la migration ainsi que l'estimation visuelle de la taille des protéines est déterminée par l'ajout de 5 µL du marqueur de taille PageRuler Unstained Protein Ladder (ThermoFisher Scientific) auquel du réactif PageBlue™ Protein Staining Solution a été ajouté (ThermoFisher Scientific) comme explicité par le fournisseur.

La présence des protéines est ensuite révélée par ajout d'une solution de coloration (0,1% bleu de Coomassie G-250 (m/v), 20% éthanol (v/v), 10% acide acétique (v/v)) préalablement chauffée et incubation 30 minutes sous agitation douce, puis l'excédent de colorant est éliminé par 5 cycles de décoloration, chaque cycle étant composé d'ajout de solution de décoloration (20% éthanol (v/v), 10% acide acétique (v/v)), chauffage au micro-ondes, incubation 5 minutes sous agitation douce et élimination de la solution.

V.2. Test d'interaction des partenaires en levure : technique double-hybride

Le test d'interaction double-hybride en levure repose sur la capacité pour deux protéines en interaction à reconstituer un facteur de transcription fonctionnel, capable d'activer la transcription de deux gènes rapporteurs et ainsi de permettre la croissance des levures sur un milieu carencé.

Pour cela, une des protéines est couplée au domaine de liaison à l'ADN LexA présent dans le plasmide pLex, et l'autre protéine est couplée au domaine d'activation de la transcription GAL4, présent dans le plasmide pGAD. Le premier gène rapporteur est *HIS3*, permettant une sélection des levures déficientes pour le gène sur milieu carencé en histidine. Le deuxième gène rapporteur activé est *LacZ*, conduisant à l'apparition d'une activité β-galactosidase des levures pour laquelle l'interaction est effective.

V.2.a - Test de croissance sur milieu -LWH

Pour réaliser ce test, des suspensions cellulaires de chaque levure diploïde contenant une combinaison à tester est réalisée par création de solutions d'A₆₀₀ égale à 0,2. Des dilutions en cascade de facteur 10 sont réalisées afin d'obtenir des solutions diluées au 1/10^{ème}, 1/100^{ème} et 1/1000^{ème}, servant à apprécier l'affinité du dimère potentiellement créé. Pour chaque suspension non diluée, 5 µL sont disposées sous forme de goutte sur un milieu solide -LW afin de servir de témoin de croissance à l'expérience. La même solution non diluée ainsi que les différentes dilutions précédemment sont également déposées à raison de 5 µL sur milieux solides sélectifs dépourvus d'histidine (-LWH). Cette étape correspond ainsi au premier test d'interaction par le biais de l'activation du premier gène rapporteur *HIS3* comme évoqué précédemment. Un contrôle négatif d'interaction est réalisé par combinaison du plasmide pGAD dépourvu de domaine DDK avec l'ensemble des domaines DDK clonés dans le plasmide pLex.

V.2.b - Test de coloration X-Gal

Le deuxième test d'interaction des deux partenaires est réalisé selon un protocole colorimétrique établi par Fromont-Racine et collaborateurs (1997). Cette expérimentation consiste à couler directement sur les boîtes de cultures -LWH précédentes un milieu réactionnel contenant

0,04% de X-Gal ; 0,1% SDS ; 0,25 M tampon phosphate (solution stock : 0,5 M Na₂HPO₄ et 0,4% H₃PO₄) et 0,5% d'agar. La réaction est incubée à 30°C pendant 5 heures à une nuit permettant l'apparition d'une coloration bleue. Cette coloration est rendue possible lors de l'interaction des deux partenaires via la présence du gène *LacZ* produisant l'enzyme β-galactosidase dont le X-Gal est un substrat. La réaction enzymatique aboutira à la libération du chromophore X qui précipite en un composé de couleur bleue.

V.3. Dosage des activités β-glucuronidase et luciférase pour l'analyse des expériences de *trans*-activation chez *C. roseus* et *N. benthamiana*

La *trans*-activation est basée sur la faculté d'une ou plusieurs protéines à se fixer *in vivo* directement ou indirectement sur une cible promotrice, permettant ainsi d'agir sur la transcription du gène situé en aval du promoteur ciblé. Plusieurs techniques de biologie moléculaire dérivant de ce principe ont été élaborées, notamment afin de pouvoir étudier l'aptitude d'un facteur de transcription à se fixer sur un motif promoteur particulier. Dans ce contexte, le promoteur dans sa totalité ou bien un motif d'intérêt, sont ainsi clonés en amont d'un gène rapporteur, permettant de quantifier l'activité du facteur de transcription testé.

Au laboratoire BBV de Tours, le système de *trans*-activation développé chez *C. roseus* (Guirimand *et al.*, 2009) met en jeu trois partenaires : l'effecteur, sa cible potentielle ainsi qu'un plasmide annexe contenant un gène rapporteur permettant de quantifier l'efficacité de la transformation des cellules, effectuée par biolistique. Cette technique a été utilisée lors de la caractérisation de l'action du RR13 vis-à-vis des promoteurs des gènes de l'*ARR6* et de *HK1a*.

Une nouvelle technique aux caractéristiques intéressante à récemment été développée (Xiao *et al.*, 2007 ; Nassuth *et al.*, 2014). En effet, celle-ci dispose de deux gènes de contrôles présent sur directement sur les plasmides contenant les partenaires à tester. De plus, le système est mis au point chez le tabac mais peut être adapté au peuplier. Cette nouvelle technique a été utilisée pour tester la capacité des RR13, 18, 19 et 22 à *trans*-activer le motif synthétique 4xCRT (C-Repeat) ou les promoteurs des gènes *HK1a*, *RR13* et *RR18*.

V.3.a - Expression transitoire chez *Catharanthus roseus*

La technique développée au laboratoire de Tours est réalisée par analyse de l'expression des gènes rapporteurs luciférase, sous la dépendance du promoteur cible, ainsi que *GUS* sous la dépendance du promoteur constitutif de l'ubiquitine (*pUBI-GUS*) servant de contrôle interne de l'efficacité de la transformation. Cette technique a été utilisée pour étudier la capacité de la protéine RR13 à transactiver le gène d'un RR-A d'*Arabidopsis*, l'*ARR6* et des tests préliminaires de la fixation sur le promoteur du gène *HK1a* ont été réalisés. L'ensemble des constructions ont été préalablement réalisées (Thèse L. Bertheau, 2013).

Extraction protéique à partir de cellules de *C. roseus*

Les cellules préalablement transformées par biolistiques sont récoltées sur les boîtes et broyées en présence d'une pincée de sable de Fontainebleau et de 1 mL par mg de cellules de tampon CCLR 1X (25 mM Tris-phosphate, 2 mM EDTA pH 8, 2 mM DiThioThreitol (DTT), 10% glycérol, 1% triton X-100) contenu dans le kit Luciférase assay system (Promega). Les lysats sont centrifugés à 4°C et 12000 RPM pendant 10 minutes puis les surnageants contenant les protéines sont conservés à 4°C jusqu'à l'analyse.

Dose fluorimétrique

Le protocole est adapté de Jefferson (1987). Vingt microlitres d'extraits protéique précédent sont dilués dans le tampon 25 µL de tampon CCLR 1X et l'ensemble est incubé pendant 2 heures à 37°C en présence de 5 µL d'une solution à 10 mM de 4-MéthylUmbelliferyl-β-D-Glucuronide (MUG). Un témoin négatif contenant uniquement 45 µL de tampon CCLR 1X et 5 µL de MUG est également réalisé. La réaction est stoppée par ajout de 450 µL de Na₂CO₃ à 0,2 M. La quantité de 4-Méthyl-Umbelliférol

(4-MU) produite est mesurée par fluorimétrie après dilution de 150 µL de mélange dans 2,5 mL de Na₂CO₃ (0,2 M). (λEx = 365 nm ; λEm = 455 nm) à l'aide du spectrophotomètre à fluorescence (F-4500, Hitachi).

L'activité relative *GUS* est exprimée en quantité totale de MU produite (en pmoles) dans l'échantillon par mg de protéines totales et par minutes d'incubation (pmole/mg/min). Le gène *GUS* étant sous contrôle du promoteur ubiquitine, la mesure de l'activité enzymatique représente le contrôle interne.

Dosage de l'activité luciférase

Pour chaque échantillon, 3 répétitions sont réalisées et les mesures sont effectuées à l'aide d'un luminomètre en plaque (Mithras LB940 piloté par le logiciel Mikro win 2000, Berthold). Vingt microlitres d'extraits protéiques précédents non dilués sont mis en contact de 50 µL de réactif **Luciferase Assay Reagent (LAR, Promega)** contenant la luciférine, substrat de la luciférase. Cette réaction, effectuée en tubes de luminomètre, est mesurée deux fois 10 secondes après ajout du substrat, permettant au produit fluorescent de la réaction, l'oxyluciférine, d'être émis. Le gène *luc*, sous contrôle du promoteur cible, reflète ainsi la capacité du RR-B à activer la transcription du gène rapporteur.

Détermination de la concentration en protéines

Basé sur la méthode de **Bradford (1976)**, le kit Bio-Rad Protein Assay a été utilisé.

Dans un premier temps, une gamme de concentration d'une protéine standard, **BSA (Serum Albumine Bovine)** (0 à 10 mg), est réalisée à partir d'une solution à 0,1 mg/mL. Trois microlitres de tampon CCLR 1X précédent ainsi que 200 µL de réactif de Bradford (Bio-Rad) sont ajoutés à la gamme. Après incubation à température ambiante pendant 2 minutes, la DO₅₉₅ est mesurée afin d'établir une courbe étalon et ainsi déterminer l'équation de la droite.

Dans un deuxième temps, la DO₅₉₅ a été mesurée pour chaque échantillon dilué et supplémenté par le réactif de Bradford (200 µL). Ainsi, nous avons pu déterminer la concentration en protéines de chaque échantillon à partir de l'équation de la droite précédente.

V.3.b - Analyse de l'expression transitoire chez *Nicotiana benthamiana*

Comme explicité précédemment, cette technique utilise deux vecteurs contenant les protéines effectrices ou reportrices à tester associées chacune à un gène de normalisation différent, respectivement *GUSPlus* et *Luciferase* issue de la luciole (ou **Firefly Luciferase *FiLUC***). Ce système permet ainsi de s'affranchir d'une quantification des protéines totales. L'activité du promoteur est liée à l'expression du gène rapporteur **Luciférase** issu de **Renilla (*RiLUC*)**. Des analyses d'expression des gènes *LUC* et *GUS* sont ainsi réalisées à l'aide des kits Dual-Luciferase® Reporter Assay System et Dual-Glo® Luciferase Assay System (Promega). Un contrôle négatif de *trans*-activation a été effectué par ajout du plasmide pCAMBIA 1305.1 ne contenant aucun effecteur et mis en présence de chacune des constructions promotrices effectuées.

Préparation des échantillons

Pour chaque test d'action de protéines effectrices sur un rapporteur, les 6 disques foliaires obtenus en partie Méthodes, chapitre IV.1.b sont broyés en présence d'azote liquide à l'aide de broyeurs adaptés aux microtubes. Le broyage est poursuivi dans la glace après ajout de 300 µL de réactif CCLR 1X et les tubes sont incubés pendant 1 heure à 4°C dans la glace. Après centrifugation pendant 10 minutes à 13000 RPM à 4°C, 200 µL de surnageant sont récupérés, aliquotés et stockés à -80°C jusqu'à l'analyse.

Ces surnageants sont ensuite dilués au 1/75^{ème} dans du **Passive Lysis Buffer (PLB)** 1X pour un volume final de 150 µL.

Analyse *GUS*

Pour chaque échantillon, 10 µL de surnageant est mélangé à 90 µL de tampon d'analyse (50 mM pH 7 Na₃PO₄ ; 10 mM EDTA ; 0.1 Triton X-100 ; 0.1% C₁₅H₂₈NNaO₃ (N-Lauroylsarcosine Sodium

Salt); 10 mM 2-mercaptoethanol; 40 mM 4-MUG) préparé fraîchement. Après homogénéisation au vortex, les tubes sont incubés pendant 30 minutes à 37°C puis la réaction est stoppée par ajout de 900 µL de Na₂CO₃ à des temps défini et homogénéisation. Chaque échantillon est déposé en triplicat dans une plaque ELISA 96 puits (Starsted) et l'activité *GUS* est lue à l'aide du POLARstar® Omega.

Analyse Luc

Les extraits dilués au 1/75^{ème} sont conservés dans la glace et les réactifs LarII et le tampon Stop and Glo® sont décongelés dans de l'eau à température ambiante. Un mélange de 1 mL de tampon Stop and Glo pour 20 µL de substrat Stop and Glo est réalisé extemporanément. Cinquante microlitres de réactif LarII sont déposés dans les puits d'une plaque ELISA 96 puits (Starsted) puis 10 µL de chaque dilution d'échantillons sont ajoutés à des temps précis puis le mélange est rapidement homogénéisé par aspiration/refoulement 4 fois. L'activité de la FiLUC est lue à l'aide du POLARstar® Omega puis 50 µL du mélange Stop and Glo réalisé précédemment sont ajoutés et le mélange est homogénéisé comme précédemment avant que l'activité RiLuc ne soit lue. Cette lecture n'est pas effectuée en réplicats puisque chaque combinaison effecteurs/rapporteur a été testée sur 3 plants dont 4 répétitions ont été prélevées sur chaque plant.

Analyse des résultats

Pour chacune des 4 répétitions, le rapport RiLUC/FiLUC est réalisé afin de normaliser l'activité reportrice relevée. En parallèle, une moyenne des trois triplicats effectuées pour chaque analyse *GUS* est réalisée puis le rapport RiLUC / FiLUC / *GUS*_{moy} x 100000 est calculé. La moyenne, l'écart-type et l'erreur standard de chaque combinaison effecteur/rapporteur sont calculés et la modélisation des résultats sous forme de graphique peut être réalisée grâce à la présence du contrôle pCAMBIA vide associé à chaque construction promotrice testée.

V.4. Test de l'activité des promoteurs par utilisation d'un gène rapporteur

Cette approche a été utilisée lors de l'étude de la fonctionnalité des RR-B afin de déterminer la localisation de l'activité de ces protéines par le biais d'un système rapporteur. Lors de cette étude, une agrotransformation du matériel végétal a été effectuée (Partie Méthodes, chapitre IV.1.a), nécessitant l'utilisation du clone 717-1B4 du génotype *Populus tremula* x *P. alba*. La récupération des séquences promotrices de ces protéines a donc tout d'abord été réalisée ainsi que les clonages dans le vecteur permettant l'étude de localisation (Partie Méthodes, chapitre III.6 et 7).

V.4.a - Récupération des promoteurs

Les séquences promotrice des gènes *HK1a*, *HK1b*, *RR13*, *RR18*, *RR19* et *RR22* ont tout d'abord été recherchées à l'aide de la méthode **Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)** (Altschul *et al.*, 1990) à partir de la 3^{ème} version du génotype *Trichocarpa*, disponible sur la version 11.0 de Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!search?show=BLAST>) en utilisant les séquences codantes des gènes précédents pour le génotype Dorskamp. Des amorces sont ainsi déterminées afin d'amplifier une séquence d'environ 3 kb. Les séquences promotrices correspondantes pour le clone 717-1B4 du génotype *Populus tremula* x *P. alba* sont ensuite récupérées par PCR et analysées par séquençage.

V.4.b - Analyse des séquences promotrices

Les séquences promotrices récupérées L'analyse des éléments structuraux généraux retrouvés au sein des promoteurs ainsi que la présence de motifs caractéristiques présents au sein des promoteurs connus ou supposés comme étant la cibles de facteurs de transcription intervenant dans les voies de signalisations cytokininine, auxine, ABA, éthylène, méthyljasmonate et contrainte thermique a été évaluée à l'aide du site **PlantCis-Acting Regulatory Element (PlantCARE)** (Lescot *et al.*, 2002) et les résultats ont été matérialisés graphiquement.

V.4.c - Activité des gènes rapporteurs

Après agrotransformation des explants de peuplier par les constructions promoteur-*GUS* et régénération du matériel végétal comme décrit respectivement dans les parties Méthodes, chapitre IV.1.a et Matériels, chapitre II.2 de ce manuscrit, l'analyse d'une part de la présence des constructions ainsi que la localisation de l'activité du promoteur en condition témoin et après un stimulus aux CK ou l'application d'une contrainte osmotique ont été réalisées.

Cette expérience n'étant jamais été réalisée au laboratoire, un test préalable visant à valider le protocole a été réalisé. Ainsi, ce premier test a été réalisé à l'aide d'un témoin négatif correspondant à des vitroplants non transformés, ainsi qu'un témoin positif, consistant en des boutures transformées par le plasmide pIN19-*GUS*, mettant en jeu le promoteur constitutif fort 70S en amont du gène rapporteur *GUS* (ANNEXE 4).

Ce test a été effectué en prélevant les boutures du tube contenant le milieu MS ½ solide servant classiquement à obtenir les vitroplants puis ceux-ci sont plongés dans des tubes saturé en humidité et contenant du milieu MS ½ pendant environ 2 heures afin de diminuer le stress occasionné à la plante. Les plants sont ensuite découpés afin de réaliser une étude préalable de localisation de l'expression du promoteur. Pour cela, la partie apicale du plant contenant des tissus en développement, dont des tissus foliaires, a été récupérée, ainsi que 2 portions de tiges contenant deux nœuds foliaires où les feuilles présentes sont matures, ainsi que le système racinaire complet de la plante. Ces différentes parties sont placées sans fixation préalable des tissus à 37°C pendant une nuit dans une solution d'incubation dont la composition est détaillée dans le tableau 11 puis 3 cycles successifs de décoloration des tissus végétaux à l'éthanol absolu ont été réalisés.

	Solution d'incubation (Cf)
Tampon phosphate pH 8,0	0,1 M
EDTA	10 mM
Triton X-100	0,25 %
Ferricyanide de potassium	0,5 mM
Ferrocyanide de potassium	0,5 mM
X-Gluc	0,5 mM

Tableau 10 : Composition de la solution d'incubation permettant d'effectuer le test GUS dans des boutures de peuplier.

La concentration finale de chaque composant est indiquée.

Une fois le protocole validé, nous avons réalisé l'étude de l'activité des promoteurs en condition physiologique, après un stimulus aux CK ou l'application d'une contrainte osmotique. Pour cela, les plants destinés à l'étude de l'expression en condition physiologique sont conservés dans du milieu MS ½ liquide comme décrit précédemment. Les plants permettant l'étude des réponses du promoteur vis-à-vis de l'un stimulus CK ou d'une contrainte osmotique sont tout d'abord placés dans un tube d'incubation contenant milieu MS ½ liquide puis les plants sont placés respectivement pendant 45 minutes dans du milieu MS ½ liquide contenant 5 M de 6-BenzylAminoPurine (**BAP**) ou bien pendant 15 minutes dans du milieu MS ½ liquide contenant 100 g/L de PEG₆₀₀₀. Les plants sont ensuite rincés à l'aide de milieu MS ½ liquide puis replacés dans le tube d'incubation précédent. Les analyses de l'expression du gène rapporteur *GUS* sont réalisées comme spécifié dans le cas de l'expérience contrôle.

VI. Analyses informatiques

Différents outils informatiques ont été utilisés durant ce travail.

Le site CLUSTAL Omega (EMBL-EBI, <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) a permis l'alignement de l'ensemble des séquences nucléiques et protéiques présentées dans ce manuscrit.

Le logiciel **A** plasmid **E**ditor (**ApE**) V2.0.47 (M. Wayne Davis) a été utilisé pour les études de cartographie des sites de restrictions présents dans les séquences des promoteurs isolée chez le génotype 717-1B4 et pour réaliser la cartographie de l'ensemble des plasmides présentés en *ANNEXE 4* de ce manuscrit.

RESULTATS

Partie I : étude de la régulation des *RR-B*

Introduction générale Partie I

Nos objectifs au sein de l'équipe sont d'étudier la voie de signalisation de type MSP induisant une réponse du peuplier face à la contrainte hydrique.

Notre stratégie est donc d'étudier tous les partenaires de ce système afin d'avoir la vision la plus complète possible.

En ce qui concerne les RR, la caractérisation des RR de type B s'avère être une étape importante au vu de leur fonction de facteur de transcription.

Pour déterminer si une protéine, comme un facteur de transcription, est déterminant dans un processus biologique, une des stratégies consiste à étudier sa régulation au cours de ce processus. Ainsi, par exemple, l'augmentation des teneurs en transcrits de l'*ARR18* au cours d'un stress osmotique a été démontrée ainsi que son implication positive dans la réponse à la sécheresse (Veerabagu et al, 2014). De même, le rôle négatif joué par les ARR1, 10 et 12 au cours d'une sécheresse est corrélé à une diminution des teneurs en transcrits de ces mêmes RR-B (Nguyen et al, 2016).

En conséquence nous nous sommes posés comme objectif de déterminer quels RR-B pouvaient être impliqués dans la réponse à la sécheresse au travers d'une analyse de leur régulation génique. Cette régulation génique peut être abordée selon deux approches : soit l'étude directement des niveaux de transcrits cibles, soit par l'étude de la régulation de leurs promoteurs. Les deux approches peuvent fournir des informations complémentaires.

En effet, l'analyse des niveaux de transcrits, notamment *via* des techniques de RT-PCR, informent d'un niveau d'équilibre des messagers présents dans la cellule sans informer clairement sur l'augmentation de la transcription du gène en tant que tel. En effet, les teneurs en messagers résultent d'un équilibre dans la cellule entre la transcription et la dégradation de ces mêmes messagers. La technique du « Run-On » est une technique plus directe afin de démontrer l'augmentation de la transcription mais s'avère délicate à mettre en place. En conséquence, les techniques de RT-PCR donnent une image figée du niveau de transcrit à l'équilibre entre transcription et dégradation mais néanmoins très utile quant au niveau d'équilibre atteint par les messagers dans la cellule au temps « t » de l'analyse.

Par contre, l'analyse de la régulation du promoteur de ces gènes *via* l'étude de l'activation d'un gène rapporteur permet d'avoir une image directe de la régulation du gène lié à une augmentation de la transcription.

Nous nous sommes donc donnés comme objectif d'aborder la régulation des gènes de RR par le biais des deux approches, soit :

- d'une part, étudier la régulation de l'expression des gènes codant l'ensemble des RR-B de peuplier dans différents organes soumis ou non à une contrainte osmotique à l'aide de la technique de RT-PCR en temps réel,
- d'autre part, étudier la régulation de certains gènes de RR-B *via* une analyse *in planta* de l'expression de leurs promoteurs. La technique étant plus longue car nécessitant la

récupération des promoteurs et la construction de plants transgéniques, nous avons dû faire un choix de RR qui comme expliqué en introduction s'est porté sur les RR18, 19 et 22.

Ce premier travail sera ainsi découpé en deux chapitres.

Le premier chapitre traitera de la régulation de l'expression des RR-B dans différents organes de peuplier sous condition de stress osmotique par la technique de RT-PCR en temps réel.

Le second chapitre portera sur l'étude des promoteurs des *RR18*, *19*, et *22* et caractérisation de leur expression. Afin de compléter ce chapitre, nous avons étendu notre étude au promoteur du récepteur contrôlant la voie, soit l'étude du promoteur *HK1a* ainsi que du *RR13* dont la régulation par le stress osmotique a également été démontrée chez le peuplier. Ce travail est actuellement en fin de caractérisation en vue de publication.

Chapitre I : étude du profil d'expression des *RR-B* par RT-PCR en temps réel

I.1. Introduction

Au préalable de ce travail de thèse, l'étude par RT-PCR semi-quantitative des profils d'expression des *RR-B* pour le génotype Dorskamp (*Populus deltoides* (Bartr.) Marsh x *P.nigra* L.) a été conduite afin d'appuyer les réseaux d'interactions avec les 3 protéines HPT partenaires du récepteur *HK1a* précédemment mis en évidence.

Ainsi, une première étude a été faite sur des boutures de peuplier (racines, tiges, pétioles et limbes) témoins et soumises à un stress osmotique par application de PEG₆₀₀₀ à 50 g/L pendant 10 minutes (Bertheau *et al.*, 2012). Dans cette expérimentation, les RR12, 13, 14, 15, 16, 19, 21 et 22 ont été analysés. Le RR18 a été isolé plus tardivement sur la base des informations obtenues dans les travaux de Veerabagu et collaborateurs en 2014. Ces auteurs ont en effet montré une nette augmentation des teneurs en transcrite de ce RR après un traitement prolongé au PEG₆₀₀₀. Ces informations nous ont donc permis d'isoler ce RR à partir de peupliers stressés pendant 3h par cet agent. Nous avons donc entrepris d'étudier la régulation des *RR-B* sur une cinétique de stress plus complète (5, 10, 20, 40, 60, 120, 180 et 360 minutes), comprenant des temps de stress courts ainsi que des temps longs.

Différentes informations ont été obtenues à partir de l'ensemble de ces études dont les résultats sont présentés dans les figures 10 et 11, respectivement pour l'étude publiée en 2012 celle concernant la cinétique plus longue mise en place par la suite.

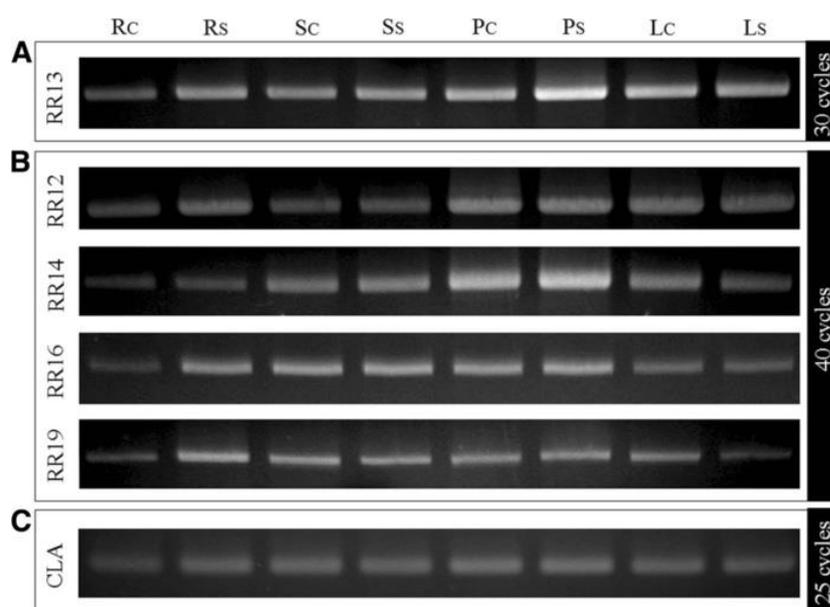


Figure 10 : analyse des profils d'expression des RR12, 13, 14, 16 et 19 de peuplier par RT-PCR semi-quantitative dans différents organes en condition contrôle ou sous l'impact d'un stress osmotique.

*Les ARN ont été isolés des racines (R), des tiges (S) des pétioles (P) et des limbes (L) en conditions contrôles (c) ou soumises à un stress osmotique à 50 g/L (s). Les ADNc obtenus par retrotranscription ont été utilisés comme matrices pour la PCR avec des couples d'amorces spécifiques à chaque RR-B et les résultats d'expression sont analysés respectivement après 30 (A) ou 40 (B) cycles de PCR par rapport à l'expression du gène contrôle clathrine (CLA) obtenue après 25 cycles d'amplification (C). Figure extraite de Bertheau *et al.*, 2012.*

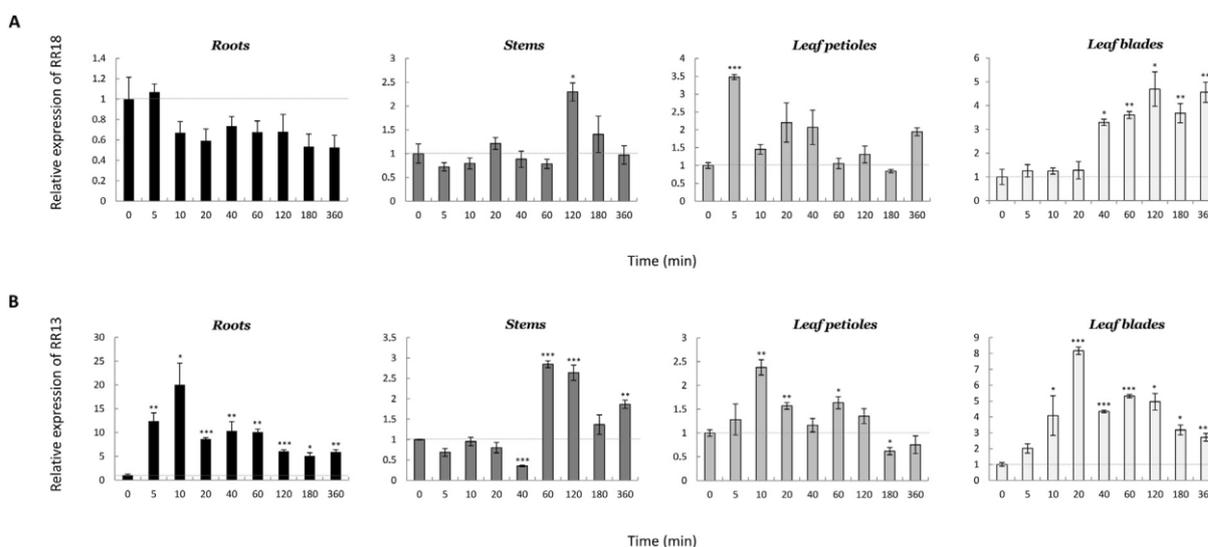


Figure 11 : analyse des profils d'expression des RR13 (A), 13, 14, 16 et 18 (B) de peuplier par RT-PCR en temps réel dans différents organes en condition contrôle ou sous l'impact d'une cinétique de stress osmotique.

Les ARN totaux ont été extraits des racines, tiges, pétioles et limbes en conditions physiologiques et à chaque temps de la cinétique de stress osmotique (PEG₆₀₀₀). Les rétrotranscriptions, ainsi que l'analyse par RT-PCR en temps réel, ont été effectuées puis l'ensemble des niveaux des transcrits de ces deux RR-B ont été normalisés au niveau de transcrit du gène contrôle YLS8 et au temps 0 de la cinétique (condition physiologique). La moyenne ainsi que l'erreur standard de trois réplicats indépendants sont réalisées pour chaque condition, puis les valeurs moyennes obtenues sont comparées à l'expression relative des RR dans les conditions contrôles (temps 0), respectivement pour chaque organe. La significativité des résultats obtenus est évaluée par un test-t. Les astérisques indiquent le niveau de significativité des résultats : *P < 0,05 ; **P < 0,01 ; ***P < 0,001. Figure extraite de Bertheau et al., 2015.

Le RR13

Ce RR-B s'exprime de façon ubiquitaire. Il est donc exprimé dans tous les organes de ce génotype. Au vu des conditions PCR utilisées, il semblerait que ce soit le RR le plus exprimé (Bertheau et al., 2012).

En condition témoin, il semblerait que les organes aériens présentent une plus grande teneur en transcrit que les racines. Ces résultats ont été corroborés par une analyse en RT-PCR en temps réel (Thèse L. Bertheau, 2013).

Au bout de 10 minutes de stress, les profils d'expression montrent une augmentation des teneurs en transcrits assez peu importante dans les racines (Bertheau et al., 2012) corroborée par l'analyse RT-PCR en temps réel (Bertheau et al., 2015). Cette augmentation observée en RT-PCR en temps réel a pu être estimée à un facteur 20. Une augmentation des teneurs en transcrit a pu être mise en évidence dans les organes aériens (tiges et feuilles) de manière plus tardive (Bertheau et al., 2012 ; Thèse L. Bertheau, 2013).

En conclusion, ce RR, dont l'interaction avec les protéines HPT2, 7 et 9 (partenaires de HK1a) est une des plus forte, est présent de manière ubiquitaire et se trouve être régulé par le stress osmotique.

Le RR18

Le RR18 est trop faiblement exprimé en condition témoin pour être détecté en RT-PCR semi quantitative. Par contre son expression a pu être étudiée en RT-PCR en temps réel. En condition témoin, son expression est identique dans tous les organes, alors qu'en condition de stress, son expression est très nettement augmentée à partir de 40 minutes de stress.

Toutes les données relatives aux profils d'expression des *RR13* et *18* par RT-PCR en temps réel ont été publiées (Bertheau *et al.*, 2015) et figurent en ANNEXE 10 du manuscrit puisque ma participation à ce travail, portant sur la caractérisation du stress et l'étude par RT-PCR en temps réel, m'a permis de cosigner cet article en tant que deuxième auteur.

En conclusion, les premiers résultats obtenus en RT-PCR en temps réel sur les *RR13* et *18* sur une cinétique de stress plus complète ont pu mettre en évidence une régulation de ces RR par le stress osmotique.

Les données bibliographiques concernant le *RR18* et la régulation positive de ce gène lors d'un stress osmotique (Veerabagu *et al.*, 2014) confortent l'hypothèse d'une implication de ce RR dans la voie de signalisation osmosensing chez le peuplier.

Par contre, le rôle du *RR13* dans la voie de signalisation cytokinique ayant été validé (Ramírez-Carvajal *et al.*, 2009), la régulation positive du gène *RR13* lors d'un stress osmotique pose la question de l'implication de ce RR dans la voie osmosensing.

Autres RR

Au début de ce travail, pour les autres RR, seule une analyse en RT-PCR semi quantitative avait été faite.

Les résultats obtenus sur ces RR, montraient une quantité de transcrits plus faible des *RR12*, *14*, *16* et *19* puisqu' un nombre plus important de cycles PCR avait été nécessaire afin de visualiser une expression de ces gènes en condition témoin dans tous les organes (Bertheau *et al.*, 2012). Une augmentation de teneurs en transcrit avait toutefois été observée. Cependant cette augmentation n'avait pas été quantifiée et seules les données à 10 minutes de stress étaient disponibles à ce stade.

A l'inverse, l'expression des gènes *RR15*, *21* et *22* n'avait pas pu être détectée dans ces conditions d'expérimentations et de PCR (Bertheau *et al.*, 2012). Les résultats obtenus *a posteriori* pour le gène *RR18* sur une cinétique plus longue laissaient penser qu'il pouvait éventuellement exister une possible régulation de ces autres RR à des temps plus tardifs.

I.2. Contexte d'étude et objectifs

Au vu de la régulation observée pour les *RR13* et *RR18*, en tenant compte des profils d'interactions observés entre les différents partenaires étudiés (Bertheau *et al.*, 2012 ; Bertheau *et al.*, 2015), des données préliminaires d'expressions obtenues lors de la cinétique courte de stress (Bertheau *et al.*, 2012), ainsi que des rôles mis en évidence pour les différents RR-B chez *Arabidopsis* (Veerabagu *et al.*, 2012 ; Nguyen *et al.*, 2016), nous avons voulu analyser l'expression des sept autres RR disponibles au laboratoire en utilisant la RT-PCR en temps réel, une technique plus sensible que la RT-PCR semi-quantitative et sur une cinétique de stress enrichie par des temps de traitement plus long. Les problématiques ainsi posées sont les suivantes :

- Les *RR12*, *14*, *16* et *19* étudiés par RT-PCR semi-quantitative pourraient-ils présenter une régulation détectable par la technique de RT-PCR en temps réel ? De même pourraient-ils être régulés sur une cinétique de stress plus longue ?
- Les *RR15*, *21* et *22* non détectés par RT-PCR semi-quantitative pourraient-ils l'être en utilisant la technique de RT-PCR en temps réel ? Et ces gènes pourraient-ils être régulés également sur une cinétique de stress plus longue ?

L'objectif général de ce travail est donc de rechercher si d'autres RR-B parmi les 7 précédemment évoqués pourraient être régulés positivement par le stress osmotique afin de déterminer si ces RR pourraient constituer des cibles intéressantes en terme de RR impliqués dans la voie osmosensing.

La stratégie utilisée sera ici d'étudier la régulation de ces RR-B par la technique de RT-PCR en temps réel à partir de boutures de peuplier soumis à une contrainte par application de PEG₆₀₀₀ à 100 g/L pendant 5, 10, 20, 40, 60, 120, 180 et 360 minutes.

I.3. Résultats

La mise en place de ces études d'expression se heurtait dès le départ à deux difficultés majeures : d'une part, l'alignement des séquences de RR montrait que les gènes étaient très conservés entre eux et qu'il allait être donc difficile de trouver des zones permettant d'amplifier spécifiquement chaque gène. D'autre part, le niveau d'expression de certains RR est faible dans la plante et il est très difficile de détecter la présence de transcrits.

L'alignement des séquences de RR nous a permis de choisir des amorces *a priori* spécifiques de chaque gène (ANNEXE 5). Nous avons dans un premier temps vérifié si l'utilisation de ces amorces nous permettait d'amplifier les ADNc d'intérêt.

Test des amorces par RT-PCR semi-quantitative

Nous ne disposions que d'une quantité réduite de matériel biologique, à savoir que l'obtention de boutures de peuplier de taille suffisante nécessite environ trois mois avant de réaliser les expérimentations. D'autre part, ces boutures ne peuvent être obtenues qu'une fois l'automne passée et qu'elles aient subi un passage au froid afin de les placer dans des conditions physiologiques favorables à la mise en place de l'expérimentation. L'ensemble de ces contraintes fait que nous ne pouvons réaliser qu'une expérience par an. Nous avons ainsi choisi uniquement deux conditions de cinétique et réalisés des expériences de PCR en utilisant comme matrice des ADNc issus d'ARN extraits de limbes soumis à un stress osmotique pendant 10 et 120 minutes. Ce premier temps d'exposition à la contrainte a été choisi car nous disposions déjà de ces données pour l'ensemble des RR-B (Bertheau *et al.*, 2012). Le choix du deuxième temps a été effectuée d'une part vis-à-vis de la quantité de matériel disponible pour ce point de la cinétique de contrainte, et d'autre part par l'observation de profils d'expression dans les limbes significativement plus importants que ceux observés dans la condition témoin pour les RR13 et 18 (Bertheau *et al.*, 2015), ces deux RR nous servant de référence pour la suite de l'étude.

Nous nous sommes aussi placés dans des conditions réactionnelles et d'amplifications similaires à celles utilisées en RT-PCR en temps réel, à savoir en particulier une matrice ADNc diluée au 1/5^{ème}, une température d'hybridation des amorces de 60°C et un nombre de cycles d'amplification de 40 (Figure 12).

Amorces PCR en temps réel

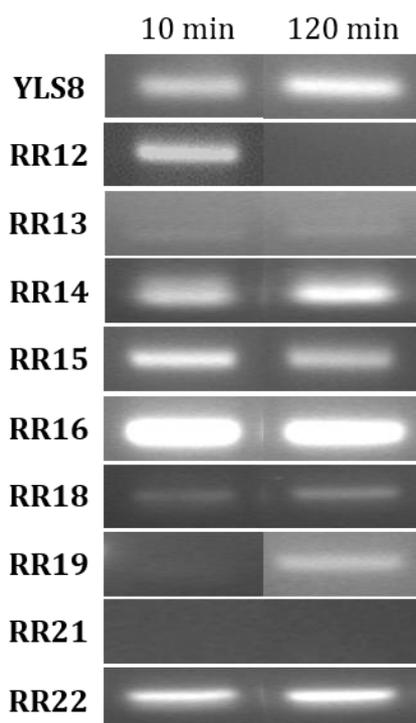


Figure 12 : profil d'expression de l'ensemble des RR-B de peuplier, génotype Dorskamp après 10 et 120 minutes de stress PEG₆₀₀₀ dans les limbes.

Les profils d'expression ont été obtenus après 40 cycles de PCR à partir de 1 µL de matrice ADNc diluée au 1/5^{ème}.

La figure ci-dessus montre que nous avons réussi à amplifier la majorité des *RR* et le gène *YLS8*, un gène exprimé de manière constitutive chez le peuplier et qui a été utilisé comme gène de référence dans nos précédentes expériences de RT-PCR en temps réel (Bertheau *et al.*, 2015).

De manière générale, lors de la présence d'un signal, une seule bande a été détectée, permettant de confirmer l'absence de produits PCR aspécifiques dont la taille serait très divergente de la taille théorique attendue.

Alors que les gènes *RR12*, *RR14*, *RR15*, *RR16*, *RR18* et *RR22* semblent s'exprimer de manière équivalente après 10 ou 120 min de stress, les transcrits du gène *RR12* sont uniquement détectables au bout de 10 min ce qui confirme les travaux récemment réalisés (Bertheau *et al.*, 2012).

Le gène *RR19* quant à lui semble s'exprimer un peu plus fortement au bout de 120 min après le stress.

Enfin, malgré de nombreuses tentatives et plusieurs changements des conditions expérimentales (réamplification à partir du premier produit PCR, nouvel échantillon biologique, test de la cinétique de stress, changement d'enzyme de rétro-transcription,...), le gène *RR21* n'a pas pu être amplifié.

Des difficultés d'amplification sont aussi apparues pour le gène *RR13* car, contrairement aux résultats précédemment obtenus par RT-PCR semi-quantitative, l'expression du gène est extrêmement faible semble équivalente à 10 et 120 minutes, suggérant une dégradation des amorces. Cette hypothèse a été vérifiée par l'usage des amorces ayant permis l'amplification de la séquence totale du *RR13* par RT-PCR relative (Bertheau *et al.*, 2012) (Figure 13).

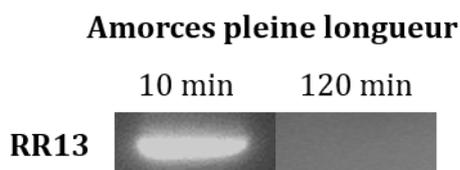


Figure 13 : profil d'expression du RR13 de peuplier, génotype Dorskamp après 10 et 120 minutes de stress PEG₆₀₀₀ dans les limbes.

Les profils d'expression ont été obtenus après 40 cycles de PCR à partir de 1 µL de matrice ADNc diluée au 1/5^{ème} et les amorces permettant l'amplification de la séquence totale du RR13.

La figure 13 nous permet de valider l'hypothèse de la dégradation des amorces, puisque, lors de l'utilisation des amorces permettant l'amplification de la séquence entière de ce *RR-B*, un profil similaire à celui précédemment observé est obtenu.

L'ensemble de ces résultats montrent que les *RR* semblent présenter des profils d'expression que nous souhaitons approfondir par RT-PCR en temps réel. Toutefois, afin de débiter les expériences, les courbes de calibration pour les différents gènes amplifiés ainsi que l'étude de leur courbe de fusion ont été réalisés afin de déterminer l'efficacité des couples utilisés et de vérifier si les couples d'amorces étaient réellement spécifiques d'un seul *RR*.

A l'exception du gène *YLS8* et du *RR18* pour lesquels nous avons réalisé les courbes de calibration (ANNEXE 6), nous n'avons pu obtenir à ce jour de données exploitables. Plusieurs cas de figure ont été rencontrés (ANNEXE 6) : efficacité insuffisante des amorces, détection de la formation de deux produits de fusion signifiant l'amplification de deux séquences différentes par le même couple, formation de dimères d'amorces. De nombreux changements de conditions expérimentales (changement de la température d'hybridation, de la concentration en amorces, en ADNc...) ainsi que le choix d'autres couples d'amorces ont été effectués mais sans aucune amélioration notable.

D'autres amorces doivent être choisies maintenant afin de pouvoir poursuivre ce travail.

I.4. Discussion

L'objectif du travail engagé était d'étudier les différents profils d'expression des différents *RR-B*, en particulier dans des conditions de stress osmotique, dans différents organes de peuplier. Les premières expériences de RT-PCR semi-quantitative ont révélé que les différents *RR* présentaient des profils d'expression distincts dans les feuilles.

Tout comme dans le cadre de l'étude menée par [Ramírez-Carvajal et collaborateurs](#) en 2009 sur le génotype *Populus tremula* × *Populus alba*, nous n'avons pas pu isoler les *RR17* et *20* que l'on suppose exprimés dans les organes reproducteurs au même titre que leurs homologues chez *Arabidopsis*.

Par contre dans cette étude, les auteurs n'ont également pas détecté le *RR14* ni observé de régulation de ce *RR* après apport de cytokinines dans leur génotype. A l'inverse, dans le génotype Dorskamp, nous avons réussi à isoler ce *RR-B*. Même si aucun résultat n'a pu être obtenu pour ce *RR* en RT-PCR en temps réel, les étapes préliminaires de RT-PCR semi quantitative ont semblé indiquer une augmentation des teneurs en transcrits de ce *RR* au temps 120 minutes de stress par rapport au temps 10 minutes. Ce *RR* pourrait donc être régulé par le stress à des temps de cinétique plus tardifs. Il pourrait donc, à ce titre, être un *RR* intéressant à étudier. Si ces résultats se confirment, l'absence de

régulation de ce *RR* par les cytokinines (Ramírez-Carvajal *et al.*, 2008) pourrait faire de lui une cible intéressante. De même pour le *RR21*, correspondant à sa paire, l'absence de régulation par les cytokinines observée au cours de cette même étude, pourrait rendre ce *RR* intéressant si nous réussissons à montrer une régulation de ce gène par le stress osmotique.

Le *RR16* a pu être détecté après 10 minutes de stress ce qui est cohérent avec les résultats obtenus lors de la précédente étude (Bertheau *et al.*, 2012). Les profils d'expression des transcrits de ce *RR* dans cette étude sont non régulés par le stress. Pour le *RR12*, les résultats d'expression obtenus après 10 minutes de contrainte sont conformes à ce qui avait précédemment été obtenu (Bertheau *et al.*, 2012) mais on observe par contre un absence de transcrite de ce *RR* après 120 minutes de stress ce qui dénote d'un comportement différent du *RR12* par rapport à sa paire le *RR13* dont les teneurs en transcrits sont restés élevés tout au cours de l'expérience, cependant cette interprétation est à tempérer car les techniques utilisées ne sont pas les mêmes.

Par contre, contrairement à l'expérience précédente au cours de laquelle nous n'avions pas pu détecter le *RR15*, dans cette expérience ci, nous avons pu dans les conditions témoins observer des transcrits de ce *RR*. Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que nous avons utilisé des boutures plus épaisses et donc plus chargée en réserves carbonées au niveau de la tige pouvant être à l'origine de la différence de teneurs en transcrits du *RR15* en condition témoin. Il est en effet évident que le niveau en réserve du matériel végétal utilisé est un facteur important pouvant influencer sur les résultats et doit être considéré dans l'analyse des résultats surtout si l'on doit faire des comparaisons entre expérimentation.

Nous n'avons pu obtenir aucune amplification pour le *RR21*. Plusieurs explications sont possibles : les amorces choisies pour ces *RR* ne s'hybrident pas correctement à la séquence ou bien le gène ne s'exprime pas dans les conditions choisies. Cette hypothèse d'une absence d'amplification de ce *RR* est cohérente d'une part avec les résultats obtenus lors de notre étude précédente (Bertheau *et al.*, 2012) mais également avec celle réalisée chez *P. trichocarpa* (Ramírez-Carvajal *et al.*, 2008) dans laquelle aucun signal n'a pu être détecté ni par microarray dans les feuilles, nœuds, entrenœuds et racines ni par RT-PCR dans des feuilles matures traitées ou non aux cytokinines. Cependant, dans cette étude, une expression augmentée de ce *RR* dans le phloème a pu être montrée (Ramírez-Carvajal *et al.*, 2008). Cette expression tissu-spécifique de ce *RR* est particulièrement intéressante au regard de la localisation de ces transcrits, le phloème étant un système particulièrement important dans le cadre des équilibres hydriques dans la plante.

Ce *RR-B* pourrait donc présenter un intérêt à l'avenir dans la voie de signalisation et sera sûrement un gène à prioriser lors de prochaines études d'expression chez le peuplier.

Pour le *RR18*, de manière surprenante vis à vis des dernières études réalisées (Bertheau *et al.*, 2012 ; 2015), une amplification a également pu être observée comme pour le *RR15* en condition témoin dans les limbes et cette expression est également retrouvée après 120 minutes de stress.

Comme pour le *RR18*, une expression a pu être détectée pour le *RR22* alors que ce n'était pas le cas dans l'étude précédente. La divergence de certains des résultats par rapport à l'étude précédemment réalisée, comme pour ces deux *RR-B*, peut s'expliquer par l'existence d'une variabilité inhérente au matériel végétal comme expliqué pour le *RR15*. Dans cette étude, il ne semble y avoir aucune régulation de ce gène aux temps considérés (10 et 120 minutes de stress) cependant cette étude n'a porté que sur les feuilles et les autres temps de cinétique n'ont pas été étudiés. En conséquence, nous ne pouvons exclure une possible régulation de ce gène par le stress osmotique.

D'autre part, une augmentation nette des teneurs en transcrits du *RR19* est visible après 120 minutes de stress. Cette augmentation, comme observée précédemment pour le *RR18*, ainsi que l'absence de régulation de ce *RR19* par les cytokinines (Ramírez-Carvajal *et al.*, 2008), font du *RR19* une cible très intéressante pour la suite de notre travail.

En effet, l'étude menée par Ramírez-Carvajal et collaborateurs en 2009 montre au contraire des *RR18* et *22*, une absence totale de régulation du *RR19* par les cytokinines dans les feuilles. Cette régulation spécifique du *RR19* par le stress osmotique et non par les cytokinines est une observation très intéressante faisant de ce *RR* un facteur de transcription qui pourrait très bien être spécifique de la voie osmosensing.

Ces résultats devront être validés mais désormais, ce *RR* retient toute notre attention pour notre étude.

Des résultats quantitatifs et plus détaillés étaient attendus grâce à l'utilisation de la RT-PCR en temps réel. Toutefois, afin de pouvoir exploiter les résultats obtenus par cette technique, de nombreux prérequis sont nécessaires. Il faut que l'expérience réalisée soit sensible, quantitative, spécifique du gène d'intérêt et reproductible à l'échelle de différentes répétitions biologiques (Abdallah and Bauer, 2016). Il existe en effet de nombreux paramètres capables d'influencer sur la performance et l'efficacité de la technique de RT-PCR en temps réel. Ainsi, la présence d'inhibiteurs divers, tels que les acides organiques ou phénoliques ou bien certains ions conduisent à une perte de performance et d'efficacité de la technique. De même, de nombreux paramètres de la réaction peuvent être modulés afin d'optimiser la technique, tels que le nombre de cycles PCR, la concentration de la matrice et des différents autres composants de la réaction PCR, les différents matériels utilisés ou bien encore la méthode de détection utilisée (TaqMan ou BigDye).

Le problème majoritaire correspond à la présence de produits multiples d'amplification, détectables par réalisation d'une courbe de dissociation. Nous avons émis plusieurs hypothèses concernant cette situation.

D'une part, du fait de l'absence de séquences génomiques disponibles pour le génotype utilisé au laboratoire (Dorskamp), certains couples d'amorces ont été déterminés dans les portions 5' ou 3' non traduites d'après les bases de données publiées sur le génotype *P. trichocarpa* (Tuskan *et al.*, 2006). Récemment, l'analyse du génome d'un autre génotype de peuplier, *P. tremula x alba* clone 717-1B4 a été réalisée et cette première version est disponible sur le site AspenDB (<http://aspensdb.uga.edu/s717>) (Zhou *et al.*, 2015 ; Xue *et al.*, 2015). La comparaison de différentes séquences (essentiellement promotrices dans notre cas) entre les deux génotypes a permis de mettre en évidence des divergences de séquence. Ces différences pourraient être le signe de zones pour lesquelles la conservation inter-génotype n'est pas idéale et ainsi présumer de différences également retrouvées pour le génotype Dorskamp.

A l'inverse, la conservation des *RR* sous forme de paires (Bertheau *et al.*, 2015) indique une forte homologie de séquence de *RR* deux à deux et pourrait laisser à penser que l'utilisation d'amorces choisies pour un *RR* conduirait à l'amplification croisée d'un autre *RR*. Cependant, les portions non traduites de chaque gène ont été analysées vis-à-vis de chaque membre d'une même paire et les amorces ont été choisies en conséquence.

Puisque la localisation de certaines amorces a été établie dans la région 5' non traduite des *RR*, se pourrait-il que cette zone soit à l'origine de problèmes lors de la rétro-transcription ? En effet, si aucune expression n'est obtenue, peut-être que la cible recherchée n'a tout simplement pas été synthétisée, ou bien avec une fidélité inférieure à celle obtenue lors d'une localisation des amorces dans la partie codante des gènes. Le décrochage de l'enzyme Retro-Transcriptase dans la zone 5' est un

phénomène connu et cette zone ne correspond en effet pas à une zone de premier intérêt pour choisir des amorces. Ce choix a cependant parfaitement fonctionné en ce qui concerne le *RR13* mais s'avère peut être ne pas correspondre au meilleur choix pour d'autres RR (*RR12*, 2 couples différents testés). Pour éviter ces difficultés, le choix des amorces peut être aussi fait dans le 3' non traduit des gènes (*RR15* et *19*), beaucoup plus discriminant. Toutefois, ces informations n'étaient et ne sont toujours pas disponibles actuellement pour le génotype que nous utilisons (Dorskamp). Il est donc nécessaire d'isoler les séquences pour chaque RR concerné. Des expériences de 3'-Rapid Amplification of cDNA-Ends (**RACE**) PCR sont en cours afin de pouvoir obtenir de nouvelles informations et choisir d'autres amorces.

Enfin, le génotype Dorskamp utilisé est issu d'un croisement entre une espèce européenne *P. nigra* (peuplier mâle noir d'Italie) et une espèce américaine *P. deltoïdes* (peuplier femelle deltoïde des Etats-Unis). L'individu obtenu possède donc un contenu génétique hybride, pouvant potentiellement se traduire pour certains gènes par la présence de deux séquences différentes correspondant aux deux séquences parentales. Ainsi, certaines des aspécificités observées lors des expériences de RT-PCR en temps réel ne pourraient-elles pas être le reflet des variations génétiques observées entre ces deux espèces de localisation spatiales très différentes ?

Dans notre cas, les multiples essais réalisés afin de résoudre les différents problèmes rencontrés ont conduit à l'épuisement des échantillons biologiques à l'origine des matrices ARN utilisées. D'autre part, nous avons été confrontés à des problèmes de matériel puisque nous avons perdu tout notre matériel végétal de départ suite à la perte du congélateur à -80°C dans lequel il se trouvait. Ce matériel ayant fait l'objet d'un traitement particulier (stress osmotique par application de PEG₆₀₀₀) et ayant été caractérisé (enregistrement des conductances stomatiques et validation des profils d'expressions obtenus pour les *RR13* et *18*), la suite des analyses de l'expression des RR-B de peuplier en réponse à une contrainte osmotique ne semble pas pouvoir être facilement réalisée. En effet, du fait des variations naturelles inhérentes au système biologique, il faudrait réaliser de nouveau l'ensemble des expérimentations.

Cependant, une approche complémentaire a été envisagée afin d'obtenir des informations de régulation similaires permettant comme expliqué en partie introductive, d'avoir une image plus représentative du niveau de transcription des gènes.

Cette approche nécessitant toutefois des étapes de transformation assez longues, nous sommes donc dans l'obligation de limiter le nombre de RR à sélectionner.

De par la bibliographie, nous savons que le *RR18* est impliqué chez *Arabidopsis* dans les réponses à la sécheresse (Veerabagu *et al.*, 2012). De plus, l'expression de son homologue peuplier, le *RR18*, est également impactée par la perception d'une contrainte sécheresse. Ce RR est donc un candidat majeur à des études ultérieures de caractérisation.

Comme évoqué précédemment, des études ont permis de mettre en évidence des événements de duplication au sein des génomes (Capra and Laub, 2012 ; Panchy *et al.*, 2016). Les gènes codant les RR-B chez le peuplier ont ainsi été dupliqués au cours de l'évolution (Bertheau *et al.*, 2012 ; 2015) et les *RR18* et *19* sont donc des dupliquats. Le *RR22* quant à lui est le seul RR non dupliqué mais dont la séquence est très proche de celle de la paire *18-19*. En conséquence ces deux RR, *RR19* et *22* seront également sélectionnés pour nos études ultérieures.

D'autre part, nous avons décidé de rajouter aux *RR18*, *19* et *22*, l'étude du promoteur de *HK1a* et *HK1b*, correspondant au récepteur, maillon inducteur de la régulation de ces RR.

L'ensemble de cette approche est donc présentée dans le chapitre suivant.

Chapitre II : régulation spatio-temporelle de l'expression des RR-B par analyse de l'activité des promoteurs

II.1. Introduction

Dans le but d'étudier la régulation de l'expression de gènes d'intérêt, plusieurs approches peuvent être envisagées. Au-delà de l'approche RT-PCR en temps réel abordée dans le premier chapitre, une autre approche, permettant d'obtenir des informations concernant la régulation de l'expression de ces gènes, consiste à étudier leur régulation *via* l'étude de la régulation de leur promoteur.

En effet, par le biais de l'étude des promoteurs, il est possible de disposer à la fois d'informations quant à la régulation du gène, à son expression organo- et tissu-spécifique et ce type d'information est le reflet réel d'une augmentation de transcription du gène étudié. Dans la première étude de ce manuscrit, nous avons focalisé notre travail sur les organes, racines, tiges, limbes et pétioles.

Une étude des promoteurs permettra d'une part d'obtenir des informations plus précises sur la régulation tissu-spécifique de nos gènes d'intérêt. D'autre part, l'accès à ces régions permettra d'identifier les zones *cis*-régulatrices permettant la régulation des gènes et d'avoir une vision plus globale des facteurs environnementaux pouvant les réguler.

II.2. Contexte d'étude et objectifs

Dans le chapitre précédent, nous avons montré l'expression constitutive du gène *RR13* ainsi que l'augmentation des teneurs en transcrits après application d'une contrainte osmotique aux temps courts d'application dans les racines ainsi que dans les feuilles, mais de manière plus tardive.

En ce qui concerne le *RR18*, nous avons également pu voir une augmentation des teneurs en transcrits après des temps longs d'exposition au stress dans les feuilles.

Concernant le *RR19* une étude préalable avait permis d'établir la présence des transcrits de ce *RR* dans l'ensemble des organes de la plante en condition témoin et après l'application d'une contrainte osmotique (Bertheau *et al.*, 2012) et cette donnée a pu être complétée au cours de notre étude (chapitre précédent) par une expression de ce *RR* dans des feuilles soumises à un stress long (deux heures).

Le *RR22*, dont l'expression n'a pas été observée dans l'étude précédente a, au contraire pu être localisé dans des feuilles soumises à 10 et 120 minutes de contrainte osmotique. Cependant, la localisation de l'expression de ce *RR-B* dans les autres organes n'a jusqu'à présent pas pu être étudiée.

Pour le gène *HK1a*, des études préalables ont pu montrer :

- Une expression constitutive du gène *HK1a* montrant de plus fortes teneurs de transcrits dans les parties aériennes que dans les parties souterraines (Thèse L. Bertheau, 2013).
- Une augmentation des teneurs en transcrits codant *HK1a* dans les racines après 10 minutes de traitement au PEG₆₀₀₀ à 50 g/L de (Chefdor *et al.*, 2006)
- Ces résultats ont été corroborés par une étude par RT-PCR en temps réel de l'expression de *HK1a* dans différents organes en condition témoin (Figure 14) et selon une cinétique de stress osmotique au PEG₆₀₀₀ (Thèse L. Bertheau, 2013).

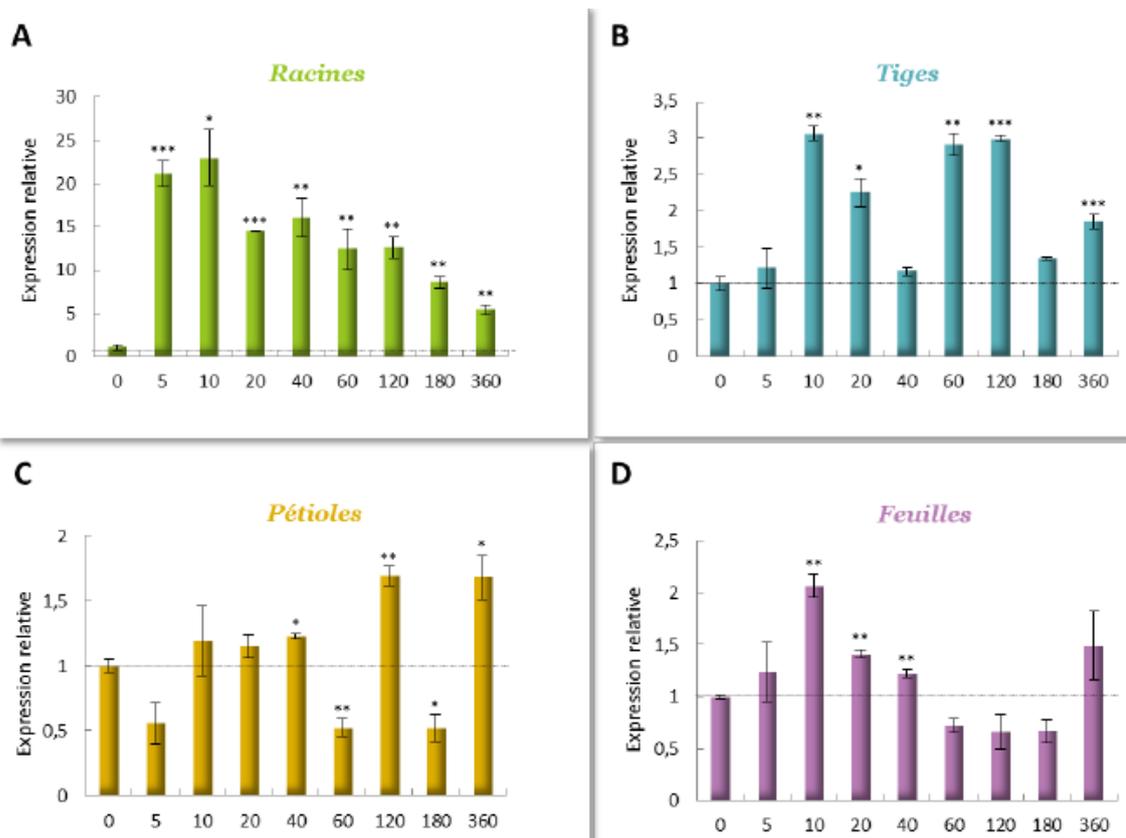


Figure 14 : analyse part RT-PCR quantitative de l'expression de *HK1a* dans différents organes de peuplier après croissance en hydroponie en condition témoin et soumises à une cinétique de stress au PEG₆₀₀₀ à 100 g/L.

Un microgramme d'ARN totaux a été utilisé pour réaliser la synthèse des ADNc. L'expression de *HK1a* a été mesurée dans les racines (A), les tiges (B), les pétioles (C) et les feuilles (D). La valeur moyenne et l'erreur standard ont été calculées pour chaque temps et chaque organe et la normalisation des résultats a été effectuée par rapport au temps 0 de l'organe considéré. Un test t a permis d'établir la significativité des différences observées. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$. Extrait de la thèse de L. Bertheau, 2013.

Il a ainsi été montré :

- qu'une augmentation des teneurs en transcrits d'un facteur 20 est observée au niveau des racines dès 5 minutes de contrainte osmotique et que le niveau des transcrits de ce gène était maintenu supérieur à ceux observés dans la condition contrôle durant l'ensemble des 6 heures de contrainte osmotique.
- qu'une augmentation rapide des transcrits respectivement d'un facteur 2 et 3 se produit dans les feuilles et les tiges après 10 minutes de contrainte (Figure 14, B et D). Cette expression diminue ensuite progressivement dans les feuilles et reste relativement stable au niveau des tiges.
- Qu'aucune régulation n'a pu être observée dans les pétioles (Figure 14, C) au cours des 6 heures de cinétique.

Une étude récente au sein du laboratoire a pu mettre en évidence que le gène *HK1a* était tout comme les gènes codant les RR-B, un gène dupliqué. Le premier gène étudié a donc été nommé *HK1a* et le second gène a été nommé *HK1b*. La fonction d'histidine aspartate kinase de ce second gène a pu être observée et une meilleure performance en tant qu'osmosenseur en levure a été démontrée pour ce second récepteur (Héricourt *et al.*, 2016, soumis).

Ainsi, nos objectifs étaient d'une part de disposer d'informations concernant les zones cis-régulatrices de ces promoteurs afin de pouvoir disposer d'une vision globale des facteurs affectant la régulation de ces gènes et d'autre part de compléter nos données concernant la régulation organo et

tissu-spécifique de l'expression des gènes codant les *RR13*, *18*, *19* et *22* et les gènes codant les récepteurs *HK1a* et *1b*.

Pour ce faire, nous avons opté pour l'isolement des promoteurs de ces gènes et *via* agrotransformation du clone 717-1B4 du génotype *Populus tremula* x *P. alba*, étudier la localisation et la régulation de l'expression de ces gènes *in planta*.

Afin de réaliser nos objectifs, nous avons dû tout d'abord récupérer et analyser les séquences correspondant à l'ensemble de ces partenaires dans le clone 717-1B4.

Nous avons ensuite cloné ces promoteurs en amont du gène rapporteur *GUS* puis transformé des plants de peuplier par ces différentes constructions.

Nous avons finalement étudié la régulation du promoteur *HK1a* et la localisation de son expression *via* l'observation de l'activité du gène rapporteur *GUS*, en condition physiologique, sous stimulus CK et enfin par application d'une contrainte osmotique au PEG₆₀₀₀.

II.3. Résultats

II.3.a - Isolement et analyse bio-informatique des promoteurs de *HK1a*, *HK1b*, *RR13*, *RR18*, *RR19* et *RR22* du clone 717-1B4.

Afin de récupérer les séquences promotrices des différents partenaires étudiés pour le clone 717-1B4, nous avons recherché les séquences correspondantes dans la banque de données Phytozome chez le génotype *P. trichocarpa*.

Des amorces permettant une amplification d'une taille théorique avoisinant les 3 kb ont été choisies pour chaque gène.

Cette approche a pu être réalisée avec succès pour la récupération des séquences promotrices des gènes *HK1a* et *RR13*. Cependant, pour les autres partenaires, une approche différente a été élaborée en conséquence d'une absence d'amplification.

Pour ces 4 partenaires (*HK1b*, *RR18*, *19* et *22*), des amorces 5' balayant la zone de 3 kb d'intérêt ont été choisies sur le génotype *P. trichocarpa* et des amorces 3' connues pour permettre une amplification de ces gènes ont été utilisées.

Nous avons ainsi pu obtenir la zone complète de 3 kb pour les promoteurs de *HK1a* et *RR13*, et des portions encore incomplètes pour les autres zones promotrices. Pour les autres gènes, les analyses bio-informatiques ont été effectuées sur les séquences isolées et les portions manquantes ont été analysées à partir de données *in silico*.

II.4.a - i - Etude du promoteur de *HK1a*

Pour ce gène, la séquence recherchée sur le génotype *P. trichocarpa* était de 2971 pb et les amorces choisies ont permis d'amplifier une séquence correspondante pour le clone 717-1B4 de 2943 pb à partir du codon d'initiation de la traduction (*Figure 15a*).

Nous avons sélectionné une zone promotrice de 2882 pb placée en amont du gène rapporteur *GUS* (prom*HK1a*-*GUS*) présentée en figure 15 ci-dessous.

a.

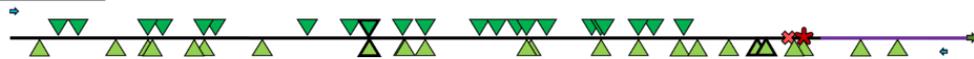
TTAACTAGGGTTTACATTTCTTGCCCATAAACTTAGCAATATATGGTTGTAGAGTTTAAAGATCATCACTTTTTTA
 GATGTTGTTTCGTACCTTGTTAAATGACTCTTCTATACCACCTAGATTTTGGGTATAAGCATTATCTATTACTGT
 TTATTTGGTTATTTCTAAGTTTTCAATTTTGATTGCAATATTCGCTTATTCATGTTACTCCTAAGTATAAG
 TTTGTTTCATATATTTGGTTGTGTTTGTTCATTACCATTTACAGAATAACACAAGCTTGCTACTCAATCT
 TATTTGGTGTGCTTTCTAGAATATAGTAATGTACATAAAAGGGTTTGTGTTTATAATTCGGTTGCGAGAAAAC
 TTCATATTTCTTAAATAATTTTATTGAAATCAATATTTCTTCAACTTTCAACTCTTATGATTTCCTATT
 TAGTTTTATTTCTAATTTTTATGGCATTTCAGTTCTATTTAACATTTAAGTCAAGTAATAGTGTATCAATA
 TGTATCCATCAATCCATTGTCATGATGTAACCTGGACACTTTGCTATGCTTGGTTGAACCACATCGGTCACT
 TAGATTTCACATCATTGGATAGATAAATGTTCTCTTATGCAAGCTCCTCTAATATACCATTATACCTAAGTC
 TTGCTCTCAAGCTTTTGTAGGAGCATGTTAGAAGCAAACATATAAAGAGAGCTTTAGGCTCTTGAAGACAATCT
 CACATGTGATATTTGCTCTTATCTGTGACGTCAAACTTTTCAGCTGTAATGGGCTTATACCATAAAGTTATG
 TATACTGGTTCATTTGCAAGAATAAAGCTTGTGGTGGTTTTGGCATCATGTGCTTGATTAAAGAAGTCTCA
 TTCCTACTCTTTTTTATTTACTTTTTATTAGAGTTGGTTGACTCCTTTCTTTCCCAAAATAATTTCTACTATGA
 TACTTCTATATATATGAATGATATTGTTATATAAGGCTTGATTCTTAGTACTAAGCAACTATAGACACATT
 TTAACATTTCAATTTATATGAAATTTGGTATCCTACAATATTTCTTGGTCTTAATATACACCGTTGTGCGAA
 CTGACACACTTTTGCATCAATATAAGTACACTCAAAGCTTCTCACTGAGTTTCTTCAATCCAGTAACCTGG
 TCCATATTTAATGTAGCTACAACAAGATGACGATGAGGTATTATAATTTCCCTCGTTGTATAGGTAGCTAGTGAG
 TTTGAATATTTGATAAATAGTTGGCCTAATATTTCTTTACTATACAACAAGTTAGGCATTTTATATAGGCTCC
 TCACCATTCTACTTACTTATAGTATGACATATCCTTTATTTCTCAAATTTACTTTAGTCATAGATTATTTTTTT
 CTACCGAGACTTCTTAAACAGTTGATGAGTTTTAGTAATGCAGATTGAGTTGGTTTTTCCAATACCTATTATCAT
 TTATTTGGCTAGTGCATGTTTCTTAGTGAATTTTATTCATAGAAGAGTAAGAAGTATTTAGTTTTTAAAT
 CTCAATTAAGTTGAATATCATGCTATGTCATTGCGCATGCTTTAAGATTGTCTTACTTTGGGGTCTATTAGGTG
 AACTTGATATTTCTCAACTTATTCTTTTTCTTTTTTATGCTAATAACACAAGTATTTCAAATTAATCAATCAATT
 TGGTCTTTTATGAGCATATCAAGCACATTGAAGTAGATTGTCATTCTATTCGTGAAATACTTTAATACATGTA
 TTACTTTTCTTATATTTTATTAAGTTCTAGACAACCTGATATGTTTACTAGGACTCTATCTTGTATCGACATA
 ATTTATTTAATAAATTTGATGCTTTGTTGACAAATATCAATTTTAGACAAGTTGTTAGTTGTGATATCTG
 ATTAAGAGAGTTTATCCAAGAAATTCATTAATAAGCAATTTTGTATACATTTATCTTTACAGAGATATTGTA
 ATTATTAATCCAAATAATGATTGTAAGATATAATATATAATTAATCTGACTAGTGAAGACAAATCAATACCATTGTA
 CAATAGTCTTGACATACCAAGACTAGCTCAAATGCTAGCAACTAAAGAGCAAAATTAACAACCATCCTCCTAC
 TCGCAATCTTCAAAATTTAAATGGTTGTTTGAAGTTATTTAAATCCCAAACCAACTGAAAACCATTAACCA
 TATGAAGTTTATCAAAATCTTCAACATATGAAGTTTATCAAAATCTTTATAAATTAATTAATTTATTTGTTT
 TTCAATGAATCAATGGTTGTTTCGAGATATCCTAAAATTTGAAAAAAAATTAATCTTAAGCTAATATTT
 ATAAATTTGAATCTAGAAAGCTGAGACGTTAACACCTCATGTATTGTTGCTCGTCACTGAATATACCAGAATT
 TGAGGCATTTATTGTCACCTCAAACCAAGATATAAAGCACTTTTGGTGTTTTATATGCTATGTGCATGGAACA
 AAAAGTTGAGTCCAAAGTTGCCCACTTCAACAGCATCGTCAAGCAATTTGCCCTTGTGTTTGCACATCTAT
 CCATGAAGTTTACCATTGTTGCTTTTCTTTTCTTATTCAGCTTAAATTTCCAAACCAAGAACAGGTGGAA
 TCTATATCAAAGAGTTGAGATAGGTGGCAAGTTGTCGTGGATGAGGAATATAAACCCTTTAGAAAATTTGCAAG
 AAAATTTGCCTTCGAAAGGTGGGGAGTGACACATGAACCAGCAGCATATTAACACCACACCCCATTAATCACAT
 TGTACAGTCTCCCTCCCTCCTTGTGTCCTCTCGTACAAAAACAAGCATGAGTTCTTGTCTAGTTAATTAAC
 TTCATCTCTTTTCGGAATC

b.

Éléments structuraux généraux

- ➡ : codon ATG
- ★ : boîte TATA sens
- ✖ : boîte CAAT sens
- : 5'UTR
- ♦ ♦ : Amorces sens et antisens

Motifs RR-B



c.

Motifs RR-B



- ▼ : motif NGAT(T/C) sens (*A. thaliana*)
- ▲ : motif NGAT(T/C) antisens (*A. thaliana*)
- ▼ : motif AAGAT(T/C)TT sens étendu (*A. thaliana*)
- ▲ : motif AAGAT(T/C)TT antisens étendu (*A. thaliana*)

Figure 15 : analyse des motifs cis-régulateurs présents au sein de la séquence promotrice de HK1a et permettant potentiellement la fixation des RR-B.

Fig. 15a : séquence nucléique. Le codon permettant l'initiation de la traduction est représenté en bleu ciel, le 5' non traduit en souligné, les boîtes TATA et CAAT putatives sens sont respectivement surlignées en rouge ou représentées en encadré et avec une écriture de couleur rouge. Les boîtes 5-NGATT-3' et 5-NGATV-3' sens sont représentées en surlignées en violet ou en écriture violette, et l'ensemble de ces boîtes en position antisens est représentée en surlignée en gris. Les amorces permettant la construction prom-HK1a sont représentées en surligné jaune.

Fig. 15b : schéma de la présence des motifs putatifs cis-régulateurs dans leur totalité permettant la fixation des RR-B.

Fig. 15c : schéma de la présence des motifs putatifs cis-régulateurs d'intérêt permettant la fixation des RR-B.

Lors de l'analyse du promoteur de *HK1a*, de nombreux sites de fixation ont pu être identifiés soit un total de 41 motifs dont des sites de fixation des RR-B caractérisés par les séquences 5'-NGATT-3, 5'-NGATV-3' ou des motifs étendus de fixation de l'ARR1 (RR-B d'*Arabidopsis thaliana*) dont la séquence a été bien caractérisée (*Figure 15 a et b*).

Puisque la fixation des facteurs de transcription agissant sous forme dimérique nécessite la présence coordonnée de deux séquences de fixation en orientation sens et antisens, nous avons procédé à une sélection parmi les motifs putatifs identifiés précédemment, et nous en avons retenu 9 potentiellement actifs (*Figure 15 c*).

L'analyse bio-informatique a également révélé l'existence de 5 sites putatifs de fixation de facteurs de transcription de type MYB (ou **Myb-Binding Site MBS**), ainsi qu'un site putatif de réponse aux auxines, 4 sites putatifs de réponse au méthyljasmonate et un site potentiellement impliqué dans une réponse au stress thermique (*Figure S16 ANNEXE 7*).

II.4.a - ii - Etude du promoteur de *HK1b*

Pour ce gène, nous avons isolé une séquence d'une longueur de 714 pb sur la longueur de 2916 pb théorique à cloner chez *Populus tremula x P. alba*. La partie manquante recherchée a été complétée par la séquence *in silico* (*Figure 16*).

a1.

```

AGCAGGAAGCTATACTTTCTCAATCAATAACACAGACAGATTAAATCTAGAAAATATTATCATGAACTTCAAGG
GAAGAAATGTGCCACTGGCTAGTTCCTCATAGTGGAGCTCAAAACAGAGTACGACAAACGTGATGGTGTGCTGTG
GGCACTGAAGCCATTTGCTGCTTAAGGCTAAACTCATGACCTCATCTCTAGAAATAGTGGTGTGAGGGAAAG
CAAGCCATATCTACCGTACCTCCCACTTTGAGCATGGGAATCAATAATATGGTGGATTAGTGAAGTGGAGTC
ACAAAAGCTTTGCTAGAGGATGAAGTCAAGCCAGAGAGAGAGAGACGCGCCCTGCTTTGCGTGTAAATATA
TTATCTATAGCCCTCCTCACACTCGTCTTTATCCAAAATGGATTGATGATACCGACTACCCCACTTGAACAAAA
AACAAATGTATCGCTGCTTATATTTTACCACCCCTCTTTAAATCTTTTATCCTGGGCTTAAATGATTCTAT
GTTGGATTCCCGGATACCTAATTAGTCAACTTAGCAAACTATTTCTTTAATAAAGAAAAGCTTGCATGTT
TACCTAATTTGTCATGTTGTTTCATGGAAGTCTTTTTCTATGCATCCGCGCATGGCGCGCACCAACA
CAATGCTTTGCGTGTCAATGCTTTTTTTATCATGTCATGCTTTTTTATTTAATTAAGAGATTTTTAAATATAAC
TAAAAAGTTTCCGTGAGTTCATAAAAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA
TTAAATCAAGATTGAGTCAGAAAACCTGAGATAAAATACTATTTTTAGAAAAAAAATAAATAAATAAATAAATAA
TTGAAATGGATTGAAAAGTTTTATTTGGTTAATCAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA
ACTCAATGTCAAATTTATTTTTAATTTGTCAGGGCTATATAAAGTCAACTGAAAACAAAACATCAAATATTAAT
CCCAAGTAAATTTAAAGTGAAGAGATTAGATTGAAAATAAAAAAGTCAAGTACAAAAAAAATAAGAGAAAAAAA
ATTACGGTAAACCAACCAATGAATATATCTTTATCTAAATTTTCAATTCATTTTCGATTTGATTTGATTAAAT
TCCAAACACTATTTTGTAAACTAAAATATAGTTTAAATAAAAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA
AGCTTGATGTTTGTAAATGAAAAGGAAAAGGACCAATTTAAAAAAGAAAAGTCTTTGAGATATATACATGAA
AAACATATTTTCATGACATAGTTTGTCCAGTATAAATAAGTTACATAGTATTTATCTTACGGATTATTTTTAC
GAAACCGCACTATAAATTTTTCAATGGAAAATAAAAAAGATTCAATAAAAAAAAACAGCAATGATAAAAAAAGGTT
GAGATTGCCCAAAGGAGAGCGAAAAGACCCGATTGGATTGGAAAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA
AAAAATAAATAAATGAGGTGTTTATTAATCAATGATAAATAAATAGTCAGTAGAGTGGTAGAATTCGGTAAAGCA
AAACTGTGGTGTCTCAATGGCAGRAAGTACCATGAGAGTCAATTAACAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA
CCTTATCACACGTAAGCTCTTTTGTAGCCCTTTTGCCATTTTATCTTGCCTTTTGGAAATCTGCTTTTTTTT
TCTTGAATTTGCACACCGTCTCTTTCTTTGGTTCAGCATTTTTTTTAAATAATATATTTTTTTATTTTTTAAAA
TTTATTTTTTAAATACAGATATATAAAAATGATTAAAAATACATACTAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA
ATTTTTACCGGCAAAAGTAAACAAAACCTGTCCTTCAACTAAACCAAAATGGCACACATTTTTCCACCGCAGA
AACCAACAAACCGCTCTTTTCAACAAAACAAAATAGCACTTTATCTCTGCTGGTATTTTTTTTTTTGGCGCTG
CAATATTTAGTCACCTCAGTAGAAAAGGGGAGTCCACTCCACTCGGCTCAATCGAATCCACTCCACGCAAT
GGACCAATCCAGGAGTCAATGGTGT

```

a2.

```

TAAATCAAGATTGAGTCAGAAAACCTGAGATAAAATACTATTTTTAGAAAAAAAATAAATAAATAAATAAATAA
TTGAAATGGATTGAAAAGTTTTATTTGGTTAATCAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA
ACTCAATGTCAAATTTATTTTTAATTTGTCAGGGCTATATAAAGTCAACTGAAAACAAAACATCAAATATTAAT
CCCAAGTAAATTTAAAGTGAAGAGATTAGATTGAAAATAAAAAAGTCAAGTACAAAAAAAATAAGAGAAAAAAA
ATTACGGTAAACCAACCAATGAATATATCTTTATCTAAATTTTCAATTCATTTTCGATTTGATTTGATTAAAT
TCCAAACACTATTTTGTAAACTAAAATATAGTTTAAATAAAAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA
AGCTTGATGTTTGTAAATGAAAAGGAAAAGGACCAATTTAAAAAAGAAAAGTCTTTGAGATATATACATGAA
AAACATATTTTCATGACATAGTTTGTCCAGTATAAATAAGTTACATAGTATTTATCTTACGGATTATTTTTAC
GAAACCGCACTATAAATTTTTCAATGGAAAATAAAAAAGATTCAATAAAAAAAAACAGCAATGATAAAAAAAGGTT
GAGATTGCCCAAAGGAGAGCGAAAAGACCCGATTGGATTGGAAAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA
AAAAATAAATAAATGAGGTGTTTATTAATCAATGATAAATAAATAGTCAGTAGAGTGGTAGAATTCGGTAAAGCA
AAACTGTGGTGTCTCAATGGCAGRAAGTACCATGAGAGTCAATTAACAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA
CCTTATCACACGTAAGCTCTTTTGTAGCCCTTTTGCCATTTTATCTTGCCTTTTGGAAATCTGCTTTTTTTT
TCTTGAATTTGCACACCGTCTCTTTCTTTGGTTCAGCATTTTTTTTAAATAATATATTTTTTTATTTTTTAAAA
TTTATTTTTTAAATACAGATATATAAAAATGATTAAAAATACATACTAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA
ATTTTTACCGGCAAAAGTAAACAAAACCTGTCCTTCAACTAAACCAAAATGGCACACATTTTTCCACCGCAGA
AACCAACAAACCGCTCTTTTCAACAAAACAAAATAGCACTTTATCTCTGCTGGTATTTTTTTTTTTGGCGCTG
CAATATTTAGTCACCTCAGTAGAAAAGGGGAGTCCACTCCACTCGGCTCAATCGAATCCACTCCACGCAAT
GGACCAATCCAGGAGTCAATGGTGT

```

b.

Éléments structuraux généraux

- ➡ : codon ATG
- ★ : boîte TATA sens
- ✳ : boîte CAAT sens
- : 5'UTR
- : Amorces sens et antisens

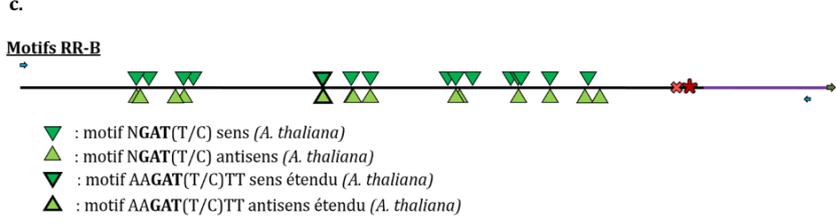
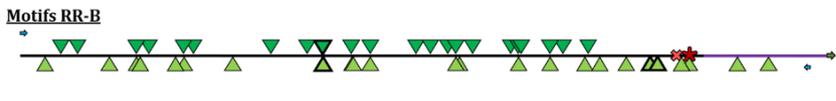


Figure 16 : analyse des motifs cis-régulateurs présents au sein de la séquence promotrice de HK1b et permettant potentiellement la fixation des RR-B.
Fig. 16a1 et a2 : séquence nucléique. La séquence du haut (a1) correspond à la séquence du génotype *P. trichocarpa* et celle du bas (a2) au génotype *Populus tremula* x *P. alba*. Le codon permettant l'initiation de la traduction est représenté en bleu ciel, le 5' non traduit en souligné, les boîtes TATA et CAAT putatives sont respectivement surlignées en rouge ou représentées en encadré et écrites en rouge. Les boîtes 5-NGATT-3' et 5-NGATV-3' sens sont représentées en surligné violet ou en écriture violette, et l'ensemble de ces boîtes en position antisens est représentée en surligné gris ou en écriture grise dans le cas de la boîte située dans l'amorce 3'. Les amorces permettant la construction prom-HK1b sont représentées en surligné jaune et l'amorce ayant permis la récupération de la séquence du génotype *Populus tremula* x *P. alba* est représentée en vert foncée.
Fig 16b : schéma de la présence des motifs putatif cis-régulateurs dans leur totalité permettant la fixation des RR-B.
Fig 16c : Schéma de la présence des motifs putatif cis-régulateurs d'intérêt permettant la fixation des RR-B.
Fig. 16b et c : la partie en pointillée correspond à la séquence théorique retrouvée dans les banques de données pour le génotype *P. trichocarpa* et la séquence en trait plein correspond à la séquence expérimentalement obtenue pour le clone 717-1B4 du génotype *Populus tremula* x *P. alba*.

Lors de l'analyse du promoteur de *HK1b*, un total de 37 motifs 5'-NGATT-3 et 5-NGATV-3' a pu être mis en évidence en orientation sens et antisens (*Figure 16 a1, a2 et b*). A l'inverse de *HK1a*, aucun motif étendu de fixation de l'ARR1 n'a été retrouvé au sein de cette séquence.

Comme précédemment, nous avons procédé à une sélection parmi les motifs putatifs identifiés précédemment (*Figure 16 c*), et nous en avons retenu 6 potentiellement actifs.

L'analyse bio-informatique a également révélé l'existence de 3 sites putatifs de fixation de facteurs de transcription de type MYB (MBS), ainsi qu'un site putatif de réponse aux auxines, et 2 sites potentiellement liés à la réponse au stress thermique. De manière intéressante, 2 sites putatifs de réponse à l'ABA, 2 sites putatifs de réponse à l'acide salicylique, 1 boîte putative de réponse aux gibbérellines, un site putatif de réponse à l'éthylène et 1 site putatif de réponse aux basses températures sont présents dans la séquence de *HK1b* et tous absents de la séquence de *HK1a*, suggérant une divergence de fonctions de ces deux gènes paralogues (*Figure S17 ANNEXE 7*).

II.4.a - iii - Etude du promoteur du RR13

Pour ce gène, la séquence recherchée sur le génotype *P. trichocarpa* était de 2970 pb et les amorces choisies ont permis d'amplifier une séquence correspondante pour le génotype *Populus tremula* x *P. alba* de 2778 pb (*Figure 17a*).

Pour la suite de notre étude, nous avons sélectionné une zone de 2730 pb, placée en amont du gène rapporteur *GUS* (*promRR13-GUS*) et représentée en figure 17.

a.

TATAGAGCTGGG**CGATC**ATG**GTGCTTG**GCACATGCAATGAAGGCCCTCGACCTTGCCTTGTTCGGGAGGGGAAGGAAT
GGATAGCCGGAAAAATGACTAA**AATCA**CCGGAAAGTTATTTCTTCTTTGTTGCGAAGGGGAACCTCGGGTGGG**CGATC**
TGTAGATGACCACCACAGCCGGTGT**CGATC**CTGTTATTTCTAGCGGAGAAAGACACTGTGCAGACTTTCAA**A**
ATCCATGTTGGAAC**TCGCCGTT**CAAAGGGATGGATGGCAAAGGGGATGGATGGCAAAGGGGATGGAAAGGGCCTT
TTCTCCAATTTCAAGGAGATGCCAGTGT**CGAGGGTCC****AATCA**CCTGAAACCACCAGGAAAGCGTAAGCTATCA
TAAGAGCGTGT**CGCA****AATCA**TAAATTTAATGCGAGCGTGAAGGATAATGCTGCGCAGTTACCACACAAATAAATA
TT**CGATT**TCCTTGAAGCATCATCTCCCTCGCACCAAAAAGCTCAAACCCTCAAACAGTAGCTTT**AATCT**GC
TTGCTCGGGTTTTTTATCGGGCTCTGAGGGTTCAGGGGTGTTAATACATTATATAAATTTGAAA**AATCA**TCAC
AGGTTTCACGGTGG**CGATC**AAGTGGATGACATTAACATCTATCTATCCATGTATATATATATTCATCGTAAAAG
ATAAAAAGAGGTCTCAGGGAATATACGTCTGCAGTCTGCCCTCCTTTAGTAGCGAGGTACGGCTTTTCTTGCGAG
TGAAAAGCAAGCTATCTATTTTTTTTACCATGTAACACAAAAAACACTGCATAAAACCAAAAACATCTCT
GT**AATCT**TATTGACATGCCCAACACAGCATCATATGATAAGA**AATCA**AAAAAGAAATAAGAA**AATCA**AAAAAGAAA
AGGAAAAAG**CGATT**GCTATCAATTAGGCTACATGTTCTTTGTTTTCCCTTCAATAATGAGAAAATATAACCA
GGAACTTAACTTCTGGATGGAGGTAGACAATGGCTTCTTAATTAACCGTAATTACTTTTGGGTTTTCTGCTT
TCTTGCTTGTCAACA**TGAT**TAGAATAAAAAAATACG**CGATC**TATGATGATAACTTAACGGTGGAGAGTAATA**T**
CGATCAGGCATT**TGATT****AGGATT**AGCATTGAAGAATATTCAACTGTAAGGTTGAAATGAAATATAAATTTAAAT
ATAGGGAATAAAAATGCACCTCAATGAAATATGTTGGACTGGTTTACGTGTTTTAGTGGCTTTCTGTGATGCTGT
CACGGG**AATCA**GTGAGGACCAGGTGGTGTGTTTTACCAAAAGAAAGATGACAAATGCAGAAAGCTTTTGCCA
AAGAAAACATAAAAAAGGAAAAGTGACAAAG**CGATC**ATGGCCACTCTCGGAACTTGAAAGTGGAAAGCTAAACC
AACCACAACCGCAAGTGGTGTCTGCCGTGCCATACATTGCTTTGAAACATAAAAATATCACCAGCTTGTGCATGA
GAGTCTCCATAAAAAAATAGGCTCAATATATATTTTTCCCTTTTCTCTTCTGTGTGCATAGAAAAGCGTAGTTTT
ATATTGGAGCTAGCAAGCTTAACAAGTA**AATCA****AATCA**TGCTTGGAAATGAAATTAGAGACTCAAGAGAAGGGTC
GTGTAATTTACAATTTAATAAACAACATCCTTGAATTGGCTACATGTTTCTACAGGTAATTCAAATGGCA**T****CGATC**
AGGCACAAAATGTAAGTATGATGACATTCATGGAGTGGCTGCCTTTATGTAGAAGACATCCCAAAATTAACAC
TCTT**GGATT**CAAGTATAAAGAAAGGCATCCCAACACATTAATGGCAATCCATTTGTACCACACTACAGCTAGAGGA
AACAAAATGTTGAGTTTTGTTTTGAGTGGCTGCCTTTTTAAATTTACTGCATCTCCTTTGTCTTTGACTCTA
TTCTTGGTTCAATGTTGAGTTTTAGATAGTGTACTAGAATAAAAATACAAACGAAATATATTTGCTGAAAGGGAT
AAAAATATAAATAAATAAACCACAAAACATG**TGATT**CTCCATAAAATATCTCGT**AATCT**TGACTTGAAATGTA
AAATTAAGATGATAAACCATGGATAAGTCCATTTTGTTTCAACTAGACCCG**AATCC**ACCAACATTTGCAAC**AG**
ATTTATAATATTCGTT**CAAAI**TCGTGCAACAAAATTTGACCCATCAAAGAAAGAGAAGTTATGTCCACGGTAG
AAACAAAACCTACGAAGAAGAAGTAAAAAAGCAAAGACAGCAACACAAACATGCTACAGAACACAGTAAAA
AACTTTAAGCTTAGGGTTTTCTGTTAGAGT**AGATT**TAGATACGGGTGGAGTTAGTTAACTTCAAGAGTGAAGC
T**CGATC**ACTCTTCAAGGACTGACCCACTTTTGAATAAAAT**AATCC**TACTTAAA**TAATAGATT**AT**TAAT**CAG
AAAGAAAGCAG**AGATT**TTTAGAGCTTCAATTGAAGAAGCTGAAGATACATGTCTCTTTTATAATTATCAATATTT
TTTTCCCTTTTTATGCTCTCGTCTAAT**AATCC**AAAACCTCCCTTCTTTCCCTCAAATTTCTCGTGTATCTCGACT
GGGTCTTTTAGTTTTGACTCTTTTATGAAAAGTTGAAGTCTTCAAACATGGAATTTAGTAGTGTCTCTCTT
TTGTTTAGTT**GCTGGGTTGG****AAT****CAAG**TTTTTTGTTTGCAGCCATGTT**AATCT**CGGTTACTGTAAG**CGATCA**
ATG

b.

Eléments structuraux généraux

- ★ : boîte TATA sens
- ✳ : boîte CAAT sens
- ➡ : codon ATG
- : 5'UTR
- ⬅ : Amorces sens et antisens

Motifs RR-B



c.

Motifs RR-B

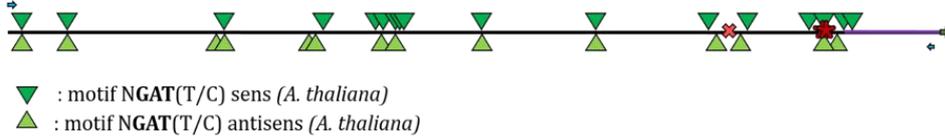


Figure 17 : analyse des motifs cis-régulateurs présents au sein de la séquence promotrice de RR13 et permettant potentiellement la fixation des RR-B.

Fig. 17a : séquence nucléique. Le codon permettant l'initiation de la traduction est représenté en bleu ciel, le 5' non traduit en souligné, les boîtes TATA et CAAT putatives sont respectivement surlignées en rouge ou représentées en encadré et écrites en rouge. Les boîtes 5-NGATT-3' et 5-NGATV-3' sens sont représentées en surligné violet ou en écriture violette, et l'ensemble de ces boîtes en position antisens est représenté en surligné gris. Les amorces permettant la construction prom-RR13 sont représentées en surligné jaune.

Fig 17b : schéma de la présence des motifs putatif cis-régulateurs dans leur totalité permettant la fixation des RR-B.

Fig 17c : schéma de la présence des motifs putatif cis-régulateurs d'intérêt permettant la fixation des RR-B.

L'analyse du promoteur du *RR13* a permis d'isoler un total de 48 motifs 5'-NGATT-3, et 5-NGATV-3' (*Figure 17 a et b*). A l'instar de *HK1b* et à l'inverse de *HK1a*, aucun motif étendu de fixation de l'ARR1 n'a été retrouvé au sein de cette séquence.

Comme précédemment, nous avons procédé à une sélection parmi les motifs putatifs identifiés précédemment (*Figure 17 c*), et nous avons retenu 8 sites potentiellement actifs.

L'analyse bio-informatique a également révélé l'existence de 4 sites putatifs de fixation de facteurs de transcription de type MYB (MBS), ainsi que 4 sites putatifs de réponse à l'ABA, 1 site putatif de réponse à l'acide salicylique et 2 boîtes putatives de réponse aux gibbérellines (*Figure S18 ANNEXE 7*).

II.4.a - iv - Etude du promoteur du RR18

Pour ce gène, une séquence d'une longueur de 2377 pb à partir du codon d'initiation de la traduction a été récupérée à ce jour, permettant d'obtenir un fragment de 2248 pb. L'analyse de ce promoteur est présentée dans la figure 18 ci-dessous.

a1.

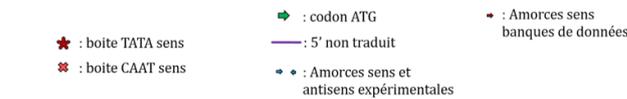
TGATATTAACTTGTCA**AAAGGG**ACRATTTGATATTTAACTAAATAGAAAAAAGAAAGGAGCTTGTACAC
 ACCTAGGGATAAATAAGAGCGTGGTGGCTCGATGCTCCCGACGTCCAAAACATCCATTTTCGACGTGTCGTTG
 GAAGACCGTGTGCTTTTCTATTTGGTGGTGGCTATCTTTGGTGGTGGTCTGGTTTGGCTAGTAGAC
 TTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTCACCCCTGAAAATTACAATTTGGCCCTCTGGTTTATTTATTTA
 TTCAAGTCAATCTTATCTTTTATTTCTACTTTTGTAGCTTTGGCCCTTTGTATAAAATTTATTTGTTTC
 AATTCATCATCT**CAATCT**CAATTTATCAAAATTT**AGATT**CTCAATTTCAATCCATTTTT**GGATT**CTCAATCT
 TTTCTTTGGCCCTTTCGTAAGTTTATTTAGTTTTCATTTCCATCATTCAATTCATATTGATTTATTTATGTTT
 TTCATTT**AGATT**CTCATTGTTTTATTTTTATTTTTTTCTTTGGCCCTTTTATGGTTATTTATCTTTCAATTT
 ACCCTTCAATCAAA**AGATT**GTATTTGGTTTTTATGTCAATTT**T**CTTATTTCTTTGAATTTTTTTTATCTTT
 TAACATAAATTTGTTTCAATTTTACCCTTT**CAATCA**ATAATAAAATTTATTTGGTTTCAATTT**AGATT**CTC
 ATCTTTTAAATGCGCCTGTTTTTTTAAAAAATCTTTTCGATATATTTTTTTTTTAAATTTTCATCTTTAATAT
 TTTAATATT**AGATT**GATTGAAATTTGAATTTTATTTT**AGATT**GGGTGCTTCAATG**T**

a2.

AGATTGGGTGCTTCAATGTTAAATGACCCCAAGTTACGAGTTTAAAAAGTTAACACAAATTTATTTTTTAAAG
 GCTTTTAT**ATCT**TTTTTATTTTTATCGAGTTATCCAAATTTA**AGATT**TAGGTCACGAGTTTGGTAAGATATT
 CCAGTTAGCTCAACCTTAATATTATGGTTATAAGTTTGGTATGTTAACTGGAAATGACAAAACTGAATTTTT
 TTACCTTTTTTATATGCAATTAGACATTTAAACATCATTTTTTATAATAAAAAATATATTCAGCTACGGACA
 AAGACTATCAATGCTATTCTAGTCTACATGGATACAAATTAAGGCTAAATCTCTCTATAAA**A**TTTACC
 AATACGGGTATTTCCCTTAATAGCCCTCTCC**ATCT**TATGCTTTCAAAATCAATAAAGTAATTTCTTACGG
 AGCTATATATATTTCCAAATCGAGAACTAGAAAAGGCAGTATCATTCAAGCAATTAATTAAGGCAAACT
ACCGGATTCCGTTCC**GGATT**TGACCATGTCGCTCT**AGATT**GTGACATATCCAGTTACGCACATAACATCTTAG
 TTCTTGCCAACATATTTCCATAGTATTTAT**ATCT**CCAACACCACTACTCATGTTTCCATTAACCTAATAAAA
 ACTATACGAAGATGTTACTCATGTGT**AGATT**TTTTTATGTTATATATGCTAAATATCCATAAAAATTTATTTA
 TATGAATGACTATTTGTGTATAAATGGCA**AGATT**AAGACCT**ATCT**AGAGATGAATTTAGTTCTTATATGTGAA
 AATTAGGAGGAGAAATACACCTTACATTTATTTAAGACAAAAACAAAAAATTAATTTACTCAGATATT
 AATTTTTTTTTTCTAGTTACGTTGTAATAAATTTGCTTTCGAGAGTTAAATTTAGATATTTTTTTTTGGCCAAAG
 AGATGAATTTTGTAGATATATAAAAAACCGGACACACAACTACTTGTCC**AGATT**ATAAATAAAAAAAC
 AAAATTTAATATTTTAAAGAAACATTCATTAATGAATGCTTAAAAAAGGAATTCAT**AGATT**GTATATTAT
ATCTATTTGAAAAATATAATAGATATGCAATTTTAAAGTGTTTTTTTTTTAAATATATAAATAATATATATAT
 TTTTAAATTTATCTTTTATATCAATATATAA**AGATT**CAAAACATTAATAAATAATTTTACATAAATAT
 TCTTTTTAAATTTTACACACAATATTTTTAATGCTCATCCAAATACCGCATGTGGTGTAAACAACTCAACTT
AGATTTACAAAAGAGTCAAGAAACACATTTCCCATCCGGCTTGTGTTTAAATTTCCATTTATGTTGATCATG
 CTACTTTCCCTAAATTAACATTCAAATTTTAAATTTTCCAGGAAGAAATCCAGTCAAT**AGATT**GATCTCATTA
 GTGCTCATAAACTTAAACGACCTAAAGCACCCCTTTATCACCTTACATTTTAAATCCAAAGAGTCAACCAT
 TTTAATGATAGGAAT**ATCT**TT**ATCT**ATTCATCTCTGTAGGGCCCTCCCTTACCTTAAACCAATGCCAC
 CAAATTTCCATCCTTTCTC**CAAAAT**GGCCCA**CAAT**CTCGATGGATGGTCT**AGATT**CATCAACGCTTACATC
 GCACATAGCAACAGCATGGTTACCATTTGGACATTTAGCTTACATTAACAAAGCTCAAAAGCTAGCACATC
 TTCCATATATGGTGACRGCTCTGACAAGGGGAGAAAGAGTTTACCATAAAAA**ATCT**AGAAAAATAAAGAGCTTA
 AGAGAGGATGAGGGGCTCC**ATAAA**CAAAACCCATTTATCATATATTTGACAAAATTTTAAATGCAAGAAA
 AAGTAAAAGGTTCTTGTGTTCTGTGAGAACTGAAGAAAAAAGCTAGAGACAAATACATAGGGCAGGGGAGC
 GGGGTTTGTGTACTTGAAGGGGAAAAAAGAGAGGAAAAACTAGTTAT**AGATT**TCTGTTTTTTTTGGGTAGG
 AACCCCTTCCCTCTCTTTCTTTGGCCATCACCATCATTGCTCCTATTTGTACAGCTTTTGGTATTACTATC
 TTCCATCTTTTATCCGTTCTC**AGATT**CTGTCT**AGATT**CAGCGCCATAG**ATCT**CTCTCTTTCTCTGTTTTC
CATCTGGGTTTTGTCTGAAGGCTTAAAGAACACATCTTTAATGAACTATAAAATCT**TAGCTTTCTCTCTC**
 TCTCTTTTTTTTTTGGT**ATCT**CTGTGTTGGGTGCTTTTTGTTGGTACATC**ATG**

b.

Éléments structuraux généraux



Motifs RR-B



c.

Motifs RR-B

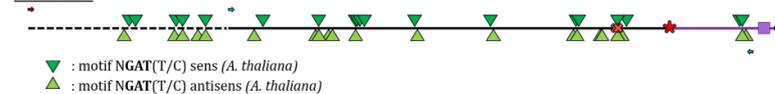


Figure 18 : analyse des motifs cis-régulateurs présents au sein de la séquence promotrice du RR18 et permettant potentiellement la fixation des RR-B.

Fig. 18a1 et a2 : Séquence nucléique. La séquence du haut (a1) correspond à la séquence du génotype *P. trichocarpa* et celle du bas (a2) au génotype *Populus tremula* x *P. alba*. La séquence du haut correspond à la séquence du génotype *P. trichocarpa* et celle du bas au génotype *Populus tremula* x *P. alba*. Le codon permettant l'initiation de la traduction est représenté en bleu ciel, le 5' non traduit en souligné, la boîte TATA putative est surlignée en rouge et la boîte CAAT putative sens est représentée en encadré rouge. Les boîtes 5-NGATT-3' et 5-NGATV-3' sens sont représentées en surligné violet ou en écriture violette, et l'ensemble de ces boîtes en position antisens est représenté en surligné gris ou en écriture grise dans le cas de la boîte située dans l'amorce 3'. Les amorces permettant la construction prom-RR18 sont représentées en surligné jaune et l'amorce ayant permis la récupération de la séquence du génotype *Populus tremula* x *P. alba* est représentée en vert kaki.

Fig 18b : Schéma de la présence des motifs putatif cis-régulateurs dans leur totalité permettant la fixation des RR-B.

Fig 18c : Schéma de la présence des motifs putatif cis-régulateurs d'intérêt permettant la fixation des RR-B.

Fig. 18b et c : La partie en pointillé correspond à la séquence théorique retrouvée dans les banques de données pour le génotype *P. trichocarpa* et la séquence en trait plein correspond à la séquence expérimentalement obtenue pour le clone 717-1B4 du génotype *Populus tremula* x *P. alba*.

L'analyse du promoteur du *RR18* a permis d'isoler un total de 48 motifs 5'-NGATT-3, et 5-NGATV-3' (*Figure 18 a et b*). A l'instar de *HK1b* et à l'inverse de *HK1a*, aucun motif étendu de fixation de l'ARR1 n'a été retrouvé au sein de cette séquence.

La sélection parmi les motifs putatifs identifiés précédemment (*Figure 18 c*) nous permet d'en retenir 8 potentiellement actifs.

L'analyse bio-informatique a également révélé l'existence de 2 sites putatifs de fixation de facteurs de transcription de type MYB (MBS), ainsi que 4 sites putatifs de réponse à l'ABA, 5 sites putatifs de réponse à l'acide salicylique, 1 élément putatif de réponse aux auxines, 2 éléments de réponse au méthyljasmonate, 4 boîtes putatives de réponse aux gibbérellines ainsi que 2 éléments putatifs de réponse au stress thermique (*Figure S19 ANNEXE 7*).

II.4.a - v - Etude du promoteur du RR19

Nous avons isolé pour ce promoteur une séquence d'une longueur de 759 pb. L'analyse de la zone isolée est présentée dans la figure 19 a. Cette zone a été complétée afin d'obtenir un promoteur de taille comparable aux promoteurs précédents en récupérant la portion manquante dans la banque de donnée Phytozome. Ce promoteur reconstitué est présenté dans la figure 19 ci-dessous.

a1.

```

GACTAAGTAGAGTCAACCTTGGCCACTATTAAAAGTCAAAATTTATTTTAAAGAGAAGTTCTCTCTTACGTTT
CTTTTAAAGAGAGGTTTCTTTCTTTCTTTCTTTTAAAGAGAAGTTTCTTTCTTACGTTTCTCTCTTTTAA
TATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATAT
TTTATAAAAAAAGTATTTTCTTGGACGATGAATCTGGAAATGTAGATGAATGTGTGCTAGCTAGAGAGAG
AAGAGTCTTTTAAACAGTTTCTTGGTACTATTGATTCCTCAGATATGCATGTCATGACTGTTCAAAATA
TTTTCTTTTTTATGCTCCTAAATATAAACTTTAGTTTCACATGAATAAATAAATAAATAGTGATACCTTTAT
ATTTATTTTACTATTCTTTTGAAGAAAAATAACAAGGCCTCGCGTAAAAATTTATGCTCTTCATTCTGTAGA
AACTAATAAGTATGGAGTTCTCAATCCCAATTTATGTTGCACAAAAATAATGGCCCTTTGTGCATAGGGTTAAAGG
AAGATTAAACTAGTCCCTTCAATGCCAAAGAACTACAAGAAAAACCATATTGAGACATAAAGGTTTAAAAACT
ATGGTCATCATCGATTCAACCCGCTTCTCAAACGATATCTTCCAAAATGCTCAAATCTATTTGACACCT
CCTTTGGCTACCCAATTTGATACAAAATGAGGGCTAGATTGTCTTTTTGGATGTGCAAGTATATCCAAATAATG
CTTGTACCGTTTGTTTTTGATTTAGAAAGTGTTCCTGAAAAATAATTAATTTCTTTTTAATATTTTTT
GATTATTTTAGAATAATAACATTTAAAAATAAAAAATATTTTAAAAAACCAATGAACCTTCACAAAGTCAATAAAGGA
ATTTCTCGAGGGAGGCTGTAAAAATATATTTTCCAATACAGGAAGAGTAGAAAAGGCAGTATCATATTCAGCA
ATTAAGGGGCAATATTACCAGATCTGTTTGGATTCTCGGTCTTAATATATACCAGACTAGGATAACCATA
CATGCCCCTCTTAATTTCTGACATATTCATTACGCACATTAACCTTTCACCTTCCAAACACATATATCCGATAGT
ATTTATATCTCCGACACTATCACTTTCATGACTTTACTAAAACATATATAGAACGATGTCATGTTTTTTTTTCT
TTTTCTTTTGTGCGAGCGGCTTTGTTTAAAGATTAAATCAAGAATATCTAATCTTGAAAAAATAATTAATTG
AGAGAGAGAGAGAATAACAAGATGAATCTAGTTTCAATCTAATATAGACCCCAAAATAAATTTATATAA
ACCAATAGTAAATTTAGTGTCTCTTTTCAATATTAATAGCCCAATATAAATAAAAAATAAATAATTAATA
ATACCCATCTAATAAATGACACGGAATAAATTTAATAATGCACGATAATTTTATGGCTCGTCCATTT
AGTGGTCAACTAGGTTACGCGCAATAATTTTAACTTAAATAACCCTAGTCTTGAAAAAAAACATAA
TTGTTGTTTTAATTTTCTAGTGCAGAGGTAATTTCTTGAATGTTTATGTTTACGGCTTAAATGAT
TTTATGATTAGAGAAATTTAGGTATATTTAATGGCCGTATTTATTTAAAGACTATATCAACAAGCATAA
GACAGCAATGCCAGGTTAATATCTCTGTACCGGGTCCGAGAGTTGAATTTAGATTATATTTCTTTTTTTT
AGTAAAGATAAATTTAGTTGGATATGTAAGAACAATAAATAGCTCCAATAATCAAGAGTACTTACCACAAT
ACTCTATCACATTAATTTGTTATATCTATCAGATTGAGAAAAATGAAAATAAATACCACCTTTAAAT
ATGATTATAAATAAAGAAATGGAGAATTTTAAATAATGGAGTTTCGTGTGAAATAATATCCCGTGGATGCA
AACTTAAACAAGACTGTAATTTAGTCATAACCTTCAACTTTTATACCAAAAGAGTGAAGAATAAATGCTT
CCAGCGTTTTGTTAATTTCTATTTATTTCCCATCGTGTAGTTTCACTAAATTAAGCAATCAAATTAAGAT
TTTAGAAGAAATCTAGTCATGATTGATTGTCATTAGTCCCATCAAACCTAACGAACCTTAAACCCCTTT
ATCACCCTGATGATTATATCTCCACCATCTTGAATG

```

a2.

```

CACTCCACCATCTTGAATATAGAATATCTTTAGTCTGTTCATCTCTACAAATCTTTATAGGACCCCACTTCA
CCCTTAAACAATGCCACCAATTCCTCTCCCTTCTCTAAAGGACCCCACTATCATAGATGGATGGTCTTGAT
TAAATCTTACATCACATGGAGCAAGAAACATAGTTCCCATGTGCCAGTTTTTGCACACACGCTCCACTTTA
TCAAAACCTCAAAAGTCTACATCTCCATATATGGAGACAAGAGAAATGAAGCTTACCATAAAAAAATTCGAA
AAAATAGAAAAGCTTCGGAGGTTGAGAGAGAGAGAGGGAGGGAGGGGCTCATATAAUA CAAAAACCCCTTAT
CATATATATTGACAAAATATAAAGAAATGGAAGAAAAGTAAAGGCTTATGTGTGCTGTTCAGAAAGTGAAGAA
AAAAGCCAGGACAAAATACAGAGTGTGAGACAGAGAGGGAGGGAGGGAGGGGTTGTGTACTAAAAGAAAAA
AGGGGAAAACCTGTTATGATTCTGTGTTTGGTTGGGGTTGATCCCACTCACTCTCTTTCTTTTAGGCTATC
ACCACTATGTCCTTGTACAGCTTTTGTGTTACTAATCTTCCATCTTTCCTCTTCTGATTCTTGTG
CTGATGCATCCCAATGATCCCTCTTTCTTTTGTGTTTGGCAATCGGGTGTCTTAAAGGCTTAAAGAACACT
CTTTCAATTCAGCAGTATATAAGTTTCAAGACTTTATTTGTTCTGTATTGGTACTTTTTGTTTGGTACAT
AATGACTGTAGAGGACAGGGGTTGTAATTCAGTTAATGAAAAAATGTTTCTGTGTTGATGCTGTCTAG
CTGTTGATGATG

```

b.

Éléments structuraux généraux

- ★ : boîte TATA sens
- ✳ : boîte CAAT sens
- ➔ : codon ATG
- : 5' non traduit
- : Amorces sens banques de données
- : Amorces sens et antisens expérimentales
- : stretch riche en Pyr

Motifs RR-B

c.

Motifs RR-B

- ▼ : motif NGAT(T/C) sens (*A. thaliana*)
- ▲ : motif NGAT(T/C) antisens (*A. thaliana*)

Figure 19 : analyse des motifs cis-régulateurs présents au sein de la séquence promotrice du RR19 et permettant potentiellement la fixation des RR-B.

Fig. 19a1 et a2 : Séquence nucléique. La séquence du haut (a1) correspond à la séquence du génotype *P. trichocarpa* et celle du bas (a2) au génotype *Populus tremula* x *P. alba*. La séquence du haut correspond à la séquence du génotype *P. trichocarpa* et celle du bas au génotype *Populus tremula* x *P. alba*. Le codon permettant l'initiation de la traduction est représenté en bleu ciel, le 5' non traduit en souligné, les boîtes TATA et CAAT putatives sont respectivement surlignées en rouge ou représentées en encadré et écrite en rouge. Les boîtes 5-NGATT-3' et 5-NGATV-3' sens sont représentées en surligné violet ou en écriture violette, et l'ensemble de ces boîtes en position antisens est représenté en surligné gris ou en écriture grise dans le cas de la boîte située dans l'amorce 3'. Les amorces permettant la construction prom-RR19 sont représentées en surligné jaune et l'amorce ayant permis la récupération de la séquence du génotype *Populus tremula* x *P. alba* est représentée en bleu/vert.

Fig 19b : Schéma de la présence des motifs putatif cis-régulateurs dans leur totalité permettant la fixation des RR-B.
 Fig 19c : Schéma de la présence des motifs putatif cis-régulateurs d'intérêt permettant la fixation des RR-B.
 Fig. 19b et c : La partie en pointillée correspond à la séquence théorique retrouvée dans les banques de données pour le génotype *P. trichocarpa* et la séquence en trait plein correspond à la séquence expérimentalement obtenue pour le clone 717-1B4 du génotype *Populus tremula* x *P. alba*.

L'analyse du promoteur du *RR19* (isolé et *in silico*) a permis d'isoler un total de 56 motifs 5'-NGATT-3, et 5-NGATV-3' (*Figure 19 a et b*), et aucun motif étendu de fixation de l'ARR1 n'a été retrouvé au sein de cette séquence.

La sélection parmi les motifs putatifs identifiés précédemment (*Figure 19 c*) nous permet de retenir 10 sites potentiellement actifs.

L'analyse bio-informatique permettant d'établir la présence d'éléments *cis*-régulateurs annexes sera très prochainement effectuée.

II.4.a - vi - Etude du promoteur du RR22

Nous avons isolé une séquence d'une longueur de 1022 pb. L'analyse de la zone isolée de 1022 pb est présentée dans la figure 20 a. Cette zone a été complétée afin d'obtenir un promoteur de taille comparable aux promoteurs précédents en récupérant la portion manquante dans la banque de donnée Phytozome. Ce promoteur reconstitué est présenté dans la figure 20 ci-dessous.

a1.

GAAGCCAGTGACAGCAGAACCCATTAACTCACTCTTTAGTAAATCTACCATGAAAACAGAAAGTAGTGGTGTGTC
 ATGGCCAGCAAGTACCAGTCTAGCTTGGTCAGTGTTCCTCAACGAAACAGGACAGAACTACAACTGATATCAAC
 TTATCTATAAACAGAGTACATAAACCTTAAAGGGGATTCACAGCTCTCATGCATTCTGCTGCCATGAAAAGAAAT
 TTTATTTTCATGAGAAATGTTTTTGAATTTTAAATTTTAAATATAAATTTTTTATTTTAAATATATATTTT
 TTAATATCAATATATTTAAACACATAAAAAATTAATTTTTTAAAAAAATTTTAAATTAATTTTAAATTAATTTTAA
 ACACAAAAACAAACATATGATAAATCTTTGTCTCTCGGCAACACTGGCATTTCCTCCATGCGTACTGGGA
 CTATATATTTGCACATCAATGAAAATGTGAACAAGCATGGGTGAAAGGATTGGATTAGAAAAATTTAAAC
 TTTAGGAAATCAATTTGATGAAACATTTAGCTTTTGGATGAAATCCAGAAATGGATTGGATAATGGATGGTCA
 AGGTTTCTCGTTGAAAAAGTTTGAAGACATGGAGATAAAGATGACACGGTGTCTACTGTACCATAATTTTTTA
 AATTTAACAAATGATGAATTTATTTATTTTAAATATAGATATTCGAGCTAGCTTGGCGTACTCGAATA
 ATTTTACGGTCAAGAGTTAAATGTAATCTTCAGTAAACCTAATGTTTGGGGCTCAAACTGGT
 TTAGAGAGTAAACTCAGAGTCTGACCAGTTGAGCTACACCCACAGAGTTGATAGCGGTAAATTTAGATTATA
 AGTCAGATGGTGTATGAAATATCAATTTTTTTTATTTTAAAAAAATAAAAAATGATATATTTTTTTAA
 AAAATAACAATTAACTAAGGTTTTTAAAGGTGACCCGATTAAATTAACATAGGTTTTTCATATACTCAC
 ACTAAATTAATTTTTTATTTTATTTTATTTGTAATCTGATAATCTAGACCCATTTTACGGGCGGATT
 TAAAACAGCTGTCTGACCTACTTTCAGCGGGTAAATTTCTTGGCTTCTCATCGTGTCTTACTGCAAGCA
 TTTTCTATGTTGGTCCCTACTTCAAGCATGTCTAAAATGGTAAAACCATTCACCATGTCGCTTTTCTTTTCA
 ATCTTAGAATTTTTCTTAAATTTTGGTTAATATAAATTTATATCCACTCTATTAATAACATTTATCAT
 TAAATATATATTTTTTTGACAAAATTTGATGAATAAATTAAGTTACATTTTCATATGTCATATGTCAT
 CATCCAAAGAAATAATTTTTTGAATTTGATCAAAAAATTAATTAAGCTGAAAAGGAAACAAATTTTC
 TCACTATTAATGATTCTTAAATTTAATCAATTAATTAAGATAATTAACAATTAAATCTGAAATTA
 CACAGAACTCAATCTAAAAAAAAGCAACTCATTATCTTAGCTATGCCTAAAATGAATAGGGTTTAAAA
 TTCTCAATTTCCATGGGCTTAAATCAATTTGATCATTAGCAAGTTTATACCATTAATCAATGAGG
 ATAAAAAAAATAAAGTTTAACTAATTTTTTAAACCTATATATTTTTTAAATTAATAGGAAGTCA
 TAAATAATGATAATTTTCAAAAAATTAATTAATTAATTTGATGATTTTCCCTAAATTTAACCTTTATATTTCA
 TTTTTTTTTTGGGAAAAACCTACTTAACTAAATTTTGAATAATAGCATTGTTCTGATATATCTTATCAA
 AAGTAGAAAGTCAACTAAATATTGATTTTTTCCATGATAAAGAATGCAAAATGATCTAAGAGCGTACC
 ACGGAAATATCCATAACATCAATGGATGCGCGTGAAAGCAGCGCAACCTAAATGGTAAAAAACATTTG
 ACAATGATAAAGCTTTCATCTTCAACC

a2.

ACAACTTCCACCACCGTCCAAATCTAGCCITGATTAATCTTTCATCACAGTTAAT
 TGTAGSCITAAATTTGTCATTTGGTTCCTCAACTTTAAATTTAAATTTATTTCCACTCCTTTTTCGATTTTCAIT
 CAATCTATCCTTAAATCTAATTTTGTATTAATTTGTCCTTTTCAAAATTTCTTTTAAATATTTTATCAT
 CATCCCTGTTATTTCTCAGAAAAATAAAAAATAAAAAATGGCAATTTTATTAATATCTTTTCAATCT
 TTTCAATAAATTTTCATGCAATTAATAATGAATTTGCAATTTAAAAGTCTAATGTTGAAAGATTAA
 GAAGGCAATTTTATGCAATCTTCTGTAATAATCTCAGTCTTTATATATTTGTTTAAATCCCTTACATGACTTC
 ATAAATAAAAAATTAATAATTTTATCTCATAGTTTACCAAAATTCATTTTTTGGAAAAAACTCAITTTAT
 GAAATCCAGTAATAAACCCATAAATCAATGATTAAATCTTTTTCAGAGAGTTAATTTTTAAATACTTTTCA
 AAAATTAGCATTTGCTATCGATTTTTTTAAAAAACATCAAGGTTCCGATATTAGAATAAACATTAATAA
 AAGTGATAAACAATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
 AGAGAGAGAGAGAGAGAGTGTCTGTTTGTCTTTTGAAGCCTTTTCTCTCTAAAACCTATATTTCAAGT
 TTACCATCAAGATTATTTTTGTTGCTCACTCTCTCAACTGGCAATTTCAAGCTCTGCAATTTATGTTTCT
 AGGTTTTTGTAAAGCTCCAACTTTGACAAATCTAGTTAAGCTCCAACTTTGAAGCAAAATTTAGTACCCCACT
 TTGTAATAGTCTTTTCTTCAATTTGCTCGTCAACTGGTTGAGAGGAGAAATG

b.

Éléments structuraux généraux

- : stretch riche en Pyr
- ★ : boîte TATA sens
- ✳ : boîte CAAT sens
- ➡ : codon ATG
- : 5' non traduit
- : Amorces sens et antisens expérimentales
- : Amorces sens banques de données

Motifs RR-B



c.

Motifs RR-B

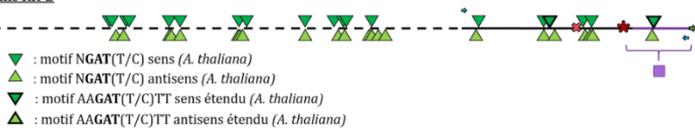


Figure 20 : analyse des motifs cis-régulateurs présents au sein de la séquence promotrice du RR22 et permettant potentiellement la fixation des RR-B.

Fig. 20a1 et a2 : Séquence nucléique. La séquence du haut (a1) correspond à la séquence du génotype *P. trichocarpa* et celle du bas (a2) au génotype *Populus tremula* x *P. alba*. La séquence du haut correspond à la séquence du génotype *P. trichocarpa* et celle du bas au génotype *Populus tremula* x *P. alba*. Le codon permettant l'initiation de la traduction est représenté en bleu ciel, le 5' non traduit en souligné les boîtes TATA et CAAT putatives sont respectivement surlignées en rouge ou représentées en encadré et écrite en rouge. La zone matérialisée par des crochets ainsi qu'une accolade violets représente une zone riche en pyrimidine potentiellement impliquée dans une forte expression transcriptionnelle. Les boîtes 5-NGATT-3' et 5-NGATV-3' sens sont représentées en surligné violet ou en écriture violette, et l'ensemble de ces boîtes en position antisens est représenté en surligné gris ou en écriture grise dans le cas de la boîte située dans l'amorce 3'. Les amorces permettant la construction prom-RR22 sont représentées en surligné jaune et l'amorce ayant permis la récupération de la séquence du génotype *Populus tremula* x *P. alba* est représentée en vert foncé.

Fig 20b : Schéma de la présence des motifs putatif cis-régulateurs dans leur totalité permettant la fixation des RR-B.

Fig 20c : Schéma de la présence des motifs putatif cis-régulateurs d'intérêt permettant la fixation des RR-B.

Fig. 20b et c : La partie en pointillée correspond à la séquence théorique retrouvée dans les banques de données pour le génotype *P. trichocarpa* et la séquence en trait plein correspond à la séquence expérimentalement obtenue pour le clone 717-1B4 du génotype *Populus tremula* x *P. alba*.

L'analyse du promoteur du *RR22* a permis d'isoler un total de 60 motifs 5'-NGATT-3, et 5-NGATV-3' (*Figure 20 a et b*). De plus, 2 motifs étendus de fixation de l'ARR1 ont été retrouvés au sein de cette séquence.

La sélection parmi les motifs putatifs identifiés précédemment (*Figure 20 c*) nous permet de retenir 10 sites potentiellement actifs.

Comme pour le promoteur du *RR19*, l'analyse bio-informatique permettant d'établir la présence d'éléments *cis*-régulateurs annexes sera très prochainement effectuée.

Comme expliqué précédemment, les promoteurs de *HK1b*, *RR18*, *RR19* et *RR22* ne sont à ce jour pas complètement récupérés puisque notre objectif était de disposer de promoteurs de taille identique (environ 3 kb) afin d'obtenir un maximum d'information concernant les éléments *cis*-régulateurs présents dans la zone.

Nous avons réalisé avec succès les transformations pour les promoteurs *HK1a* et *RR13*, cependant pour ce dernier promoteur, nous n'avons pas encore un nombre suffisant de plants afin de réaliser les études d'expression *in planta*. Cette étude devrait pouvoir être réalisée de manière assez rapide car nous avons commencé à propager le matériel végétal en vue de la réalisation de nos tests d'activité.

Pour le *RR18*, nous avons créé la souche d'*Agrobacterium* afin de procéder à la transformation qui devrait être envisagée très prochainement.

Ainsi, nous avons pu procéder à une étude préliminaire de l'activité du promoteur de *HK1a*.

II.3.b - Etude de la régulation du promoteur du gène *HK1a* dans différents organes en condition témoin

Ayant obtenu des plants de peuplier régénérés après transformation avec la construction *promHK1a-GUS*, notre premier objectif était de vérifier la présence de la construction et de l'expression du gène rapporteur sous contrôle du promoteur *HK1a*.

II.4.b - i - Validation du protocole

Afin de réaliser nos tests, une mise au point du test *GUS* a dû être réalisée en utilisant un contrôle négatif (vitroplants non transformés), ainsi qu'un contrôle positif (vitroplants transformés à l'aide d'un plasmide *pIN19-GUS*), où le gène *GUS* est ainsi placé sous contrôle du promoteur constitutif fort (70S). Les résultats sont présentés dans la figure 21.

L'absence d'étape de fixation dans le protocole adopté a nécessité la vérification que la coloration observée n'était pas imputable à une diffusion passive du précipité bleu formé lors de la réaction enzymatique entre la β -glucuronidase et son substrat plutôt qu'à une production dans le tissu considéré, ainsi nous avons incubé le contrôle négatif et le contrôle positif dans le même tube réactionnel (*Figure 21*).

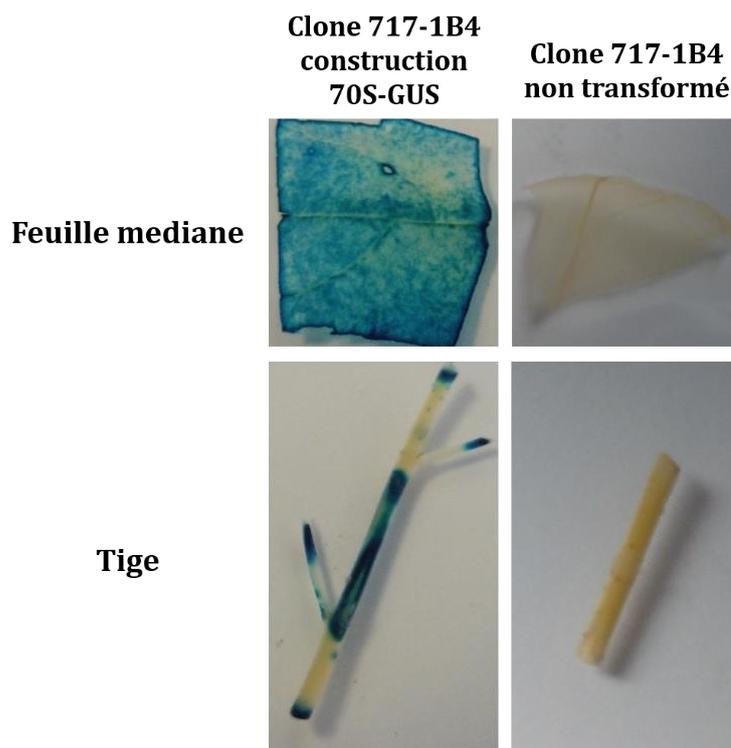


Figure 21 : analyse de l'expression du gène GUS dans une feuille médiane mature ainsi qu'une portion de tige d'un contrôle positif et d'un contrôle négatif sans fixation préalable des tissus.

Le contrôle positif correspond à un vitroplant du clone 717-1B4 transformé par le plasmide pBIN19 codant pour le gène GUS placé sous contrôle du promoteur constitutif fort 70S. Le contrôle négatif correspond à un vitroplant du clone 717-1B4 non transformé.

Lors de la réalisation du test, nous avons pu observer une forte coloration dans la feuille du contrôle positif et cette coloration était totalement absente à l'œil nu des tissus du contrôle négatif.

Cette donnée nous permet ainsi de valider la relation entre la visualisation d'une coloration bleue avec la réelle production de l'enzyme, attestant de l'activité du promoteur dans la condition testée, et l'absence de propagation de cette coloration à des tissus non transformés.

II.4.b - ii - Test de l'activité du gène rapporteur GUS en condition témoin dans des lignées transformées par la construction promHK1a-GUS

Avant de procéder à nos tests d'activation du gène rapporteur GUS par l'apport de cytokinines ou de PEG₆₀₀₀, les vitroplants sont placés pendant 2h dans des tubes contenant du milieu MS ½ en conditions saturante d'humidité. Afin de tester si ce transfert pouvait être considéré comme un stress, nous avons réalisé le test d'activité GUS de nos trois lignées différentes (7, 20 et 21).

Chacun de ces tissus a été soumis à un test GUS puis les résultats ont été analysés et compilés dans la figure 22.

Le plant issu de la lignée 20, n'ayant conduit à l'observation d'aucune coloration bleue, aucune photo de ce clone n'a été intégrée dans la figure.

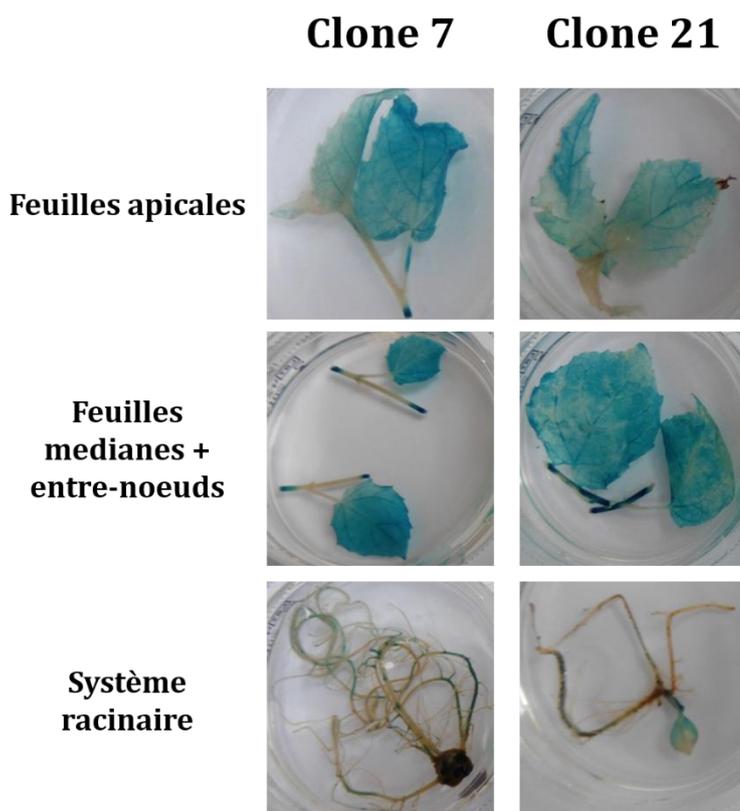


Figure 22 : analyse de l'expression GUS en condition témoin de deux lignées différentes de vitroplants de peuplier transformés par la construction promHK1a-GUS.

Les plants ont été placés dans du milieu MS ½ pendant 2 heures avant réalisation du test GUS. Ce test a été réalisé par incubation des plants à 37°C pendant une nuit dans la solution réactionnelle puis 3 décolorations successives des tissus.

En condition témoin, nous pouvons observer pour les deux clones présentés l'apparition d'une coloration bleue quels que soient les tissus considérés.

L'expression du gène *HK1a* étant constitutive, on peut supposer que cette coloration bleue soit le reflet de cette expression constitutive. Cependant, on ne peut exclure que le transfert des vitroplants induise une activation du gène rapporteur. Le stress induit par le transfert du vitroplant pourrait être un élément activateur du promoteur *HK1a*. Toutefois, n'ayant pas fait de test avant transfert, nous ne pouvons pas nous prononcer de façon certaine quant à cette induction. Cette vérification devra être réalisée.

En conclusion, sur les trois lignées obtenues, nous avons pu obtenir deux lignées exprimant bien le gène rapporteur *GUS*, reflet de l'activité du promoteur *HK1a*.

II.4.b - iii - Test de l'activité du gène rapporteur *GUS* après traitement par des CK ou un stress osmotique au PEG₆₀₀₀ dans des lignées transformées par la construction promHK1a-GUS

Pour ces tests, les boutures de chacune des deux lignées ont été soumises à un traitement à la BAP à 5 µM pendant 45 minutes et du PEG₆₀₀₀ à 100 g/L pendant 15 minutes. Les résultats obtenus sont présentés dans les figures 23 et 24.

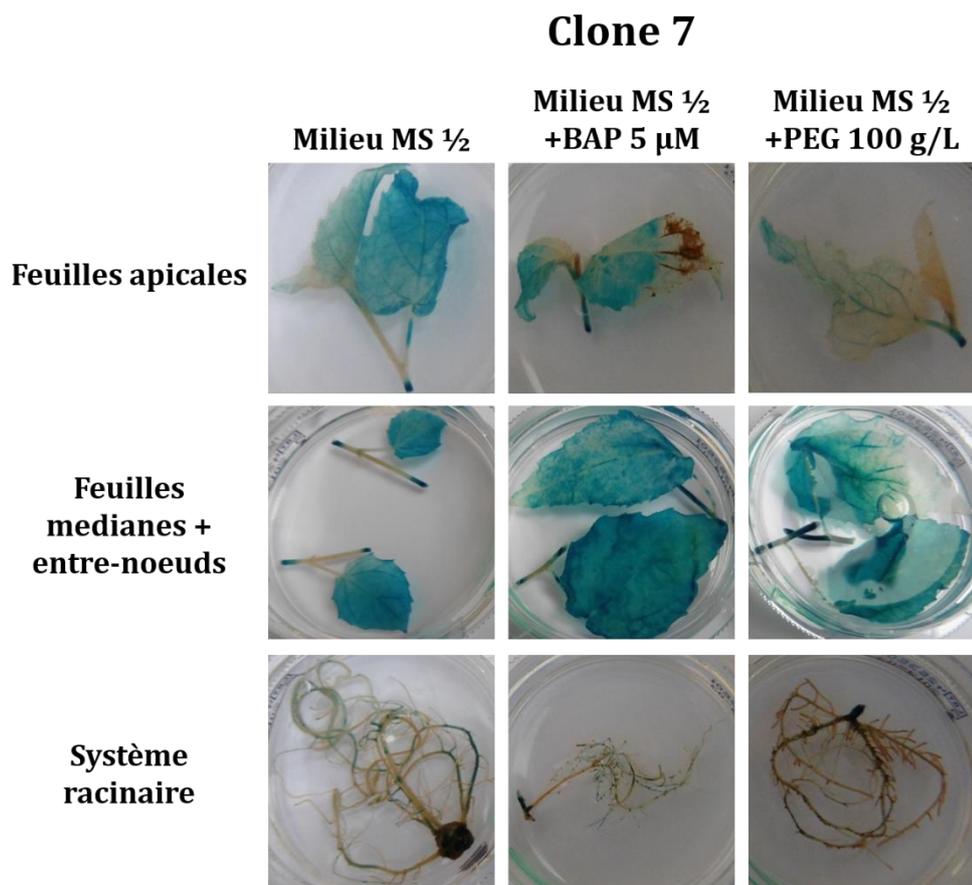


Figure 23 : analyse de l'expression GUS en condition témoin et sous stress osmotique ou stimulus CK de la lignée 7 de peuplier transformée par la construction promHK1a-GUS.

Les plants ont été placés dans du milieu MS ½ pendant 30 minutes avant l'induction de la contrainte osmotique (PEG₆₀₀₀ 100 g/L pendant 15 minutes) ou du stimulus CK (BAP 5µM pendant 45 minutes). Les plants ont ensuite été rincés puis replacés dans du MS ½ avant la réalisation du test GUS. Ce test a été réalisé par incubation des plants à 37°C pendant une nuit dans la solution réactionnelle puis 3 décolorations successives des tissus.

De manière générale, en condition témoin, le clone 7 a permis la production du précipité bleu dans tous les tissus (*Figure 23*) comme observé lors du test en condition témoin.

Que ce soit en condition PEG₆₀₀₀ ou en condition BAP, on observe une coloration bleue dans tous les tissus avec une plus faible coloration dans les feuilles apicales dans les deux conditions. Cette absence de coloration pourrait correspondre à un artéfact de préparation en raison de la forte coloration observée en condition témoin.

La forte coloration bleue observée en condition témoin dans ce clone ne nous a pas permis dans ces conditions expérimentales d'obtenir d'information suffisamment concluante quant à la régulation du promoteur *HK1a* par le stress osmotique ou la BAP.

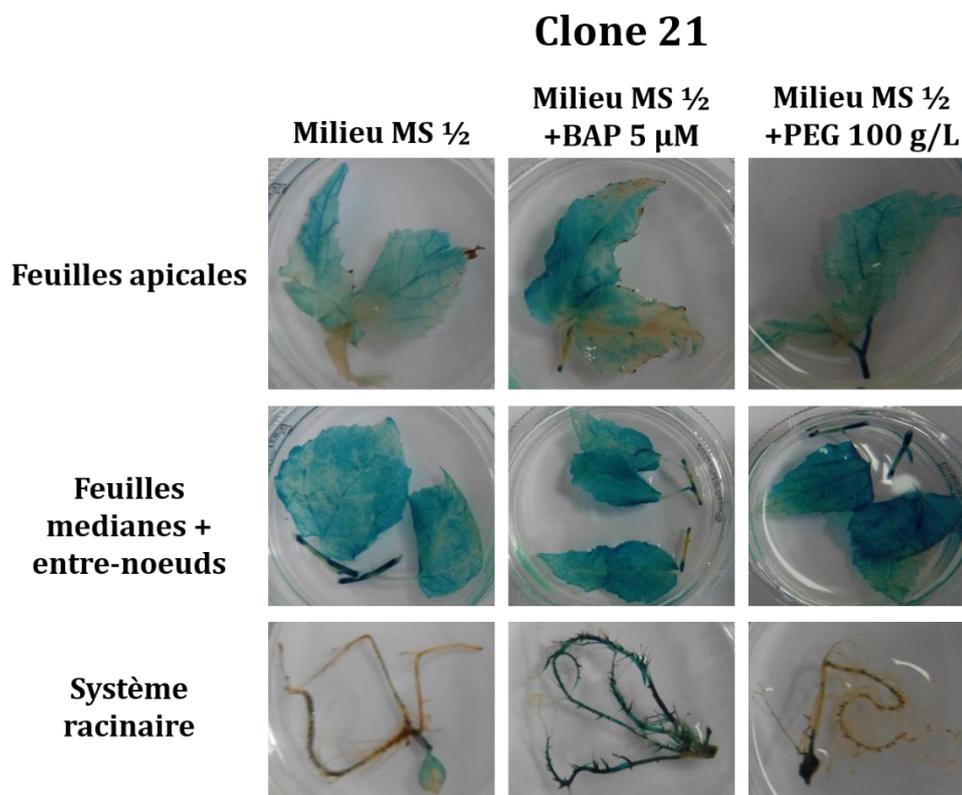


Figure 24 : analyse de l'expression GUS en condition témoin et sous stress osmotique ou stimulus CK de la lignée 21 de peuplier transformée par la construction promHK1a-GUS.

Les plants ont été placés dans du milieu MS ½ pendant 30 minutes avant l'induction de la contrainte osmotique (PEG₆₀₀₀ 100 g/L pendant 15 minutes) ou du stimulus CK (BAP 5µM pendant 45 minutes). Les plants ont ensuite été rincés puis replacés dans du MS ½ avant la réalisation du test GUS. Ce test a été réalisé par incubation des plants à 37°C pendant une nuit dans la solution réactionnelle puis 3 décolorations successives des tissus.

De manière similaire à ce qui a été obtenu pour le clone 7, une coloration de l'ensemble des tissus a été obtenue pour le clone 21 en condition témoin (Figure 24).

Lors de la comparaison avec les données obtenues pour la condition témoin, nous pouvons voir une coloration bleue plus prononcée dans les feuilles matures soumises au stimulus PEG₆₀₀₀ (nervures) ainsi que dans les racines soumises à la BAP.

De la même manière que pour le clone 7, une forte coloration en condition témoin altère l'interprétation des résultats cependant il semblerait que le promoteur *HK1a* soit inductible de façon tissu spécifique par les cytokinines et le stress osmotique causé par l'addition du PEG₆₀₀₀ dans la solution nutritive.

En conclusion, nous pouvons dire que la coloration bleue observée en condition témoin pour deux des lignées sur les trois testées conduit à la conclusion que ces deux lignées ont parfaitement intégré le T-DNA contenant le promoteur *HK1a*. Ce résultat est en soi extrêmement prometteur car nous pourrions ainsi utiliser ces deux lignées dans des études ultérieures.

Dans le cas de notre expérience, il s'avère que les conditions expérimentales doivent être optimisées car l'induction de l'activité *GUS* en condition témoin révèle que soit le niveau d'expression du gène *HK1a* est déjà important en condition témoin, soit que le simple transfert du vitroplant dans un nouveau tube correspond à un stress induisant la régulation du promoteur *HK1*. Ce fort niveau d'activité du gène rapporteur altère l'observation de toute induction par les traitements appliqués. Des adaptations seront donc nécessaires afin de pouvoir visualiser un effet potentiel.

Cependant, ces études préliminaires semblent indiquer une régulation du gène *HK1a* par les cytokinines et le stress osmotique de façon tissu spécifique et donc que le promoteur *HK1a* serait la cible de facteurs de transcription spécifiques de ces signaux. Les conditions expérimentales devront être optimisées afin de réitérer ces expériences et de valider ces résultats.

II.4. Discussion

Préalablement à ce travail, une étude bio-informatique du promoteur du gène *HK1a* du génotype Dorskamp avait été effectuée sur une zone d'environ 1,6 kb (Thèse L. Bertheau, 2013). Une recherche de motifs de fixation des RR-B présents en orientation sens ou antisens au sein de ce promoteur avait permis de mettre en évidence 18 motifs 5'-NGATT-3' (Sakai *et al.*, 2000) et 5 motifs correspondants à la séquence 5'-NGATV-3' retrouvée pour les ARR1, 2, 10 et 11 (Sakai *et al.*, 2000 ; Hosoda *et al.*, 2002, Imamura *et al.*, 2003) ainsi que les motifs étendus de l'ARR1 (Taniguchi *et al.*, 2007).

Une étude portant sur l'analyse du promoteur d'un gène codant un RR-A chez *Medicago truncatula*, le MtRR4, a mis en évidence au sein de cette séquence la présence de motifs fonctionnels de réponses aux cytokinines à environ 3 kb du site d'initiation de la transcription (Ariel *et al.*, 2012). Ainsi, il nous est apparu important de pouvoir obtenir des promoteurs de taille importante, au-delà de 2 kb, afin de maximiser les chances de déterminer la présence de sites fonctionnels permettant la signalisation du stress osmotique.

Durant ce travail, nous avons réussi à isoler trois promoteurs de tailles importantes, *HK1a*, *RR13* et *RR18*.

Pour les deux premiers promoteurs, nous avons pu procéder aux étapes de transformation et de régénération.

En ce qui concerne le promoteur *HK1a* nous avons également pu montrer que la construction avait bien été intégrée et obtenu deux lignées transformées exprimant le gène *GUS* sous contrôle du promoteur *HK1a*. La régulation de ce promoteur par la BAP, une cytokinine, a pu être mise en évidence dans les racines du clone 21, et une régulation par le PEG₆₀₀₀ semble également possible dans les feuilles matures de ce même clone. Le promoteur *HK1a* semble donc régulé par les cytokinines et le stress osmotique dans des organes différents. Ces résultats devront être validés par une répétition de nos tests.

L'analyse du promoteur *HK1a*, révèle la présence de 9 sites potentiels de fixation de RR-B. La présence de ces sites potentiels de régulation présage de la possible régulation du gène *HK1a* par ces facteurs de transcription.

La régulation de ce gène par un stress osmotique de façon très rapide (5 min dans les racines) conduit à l'hypothèse d'une reconnaissance rapide du promoteur par des facteurs de transcription. Cette rapide augmentation de transcription du gène *HK1a* pourrait être due à une régulation liée à la fixation d'un RR-B sur le promoteur. Un rétro-contrôle positif du gène par les cibles du récepteur lui-même pourrait ainsi se mettre en place dans le cas de signalisation stress osmotique. Cette hypothèse pourra maintenant être testée par différentes approches. Disposant en effet de lignées contenant le promoteur, nous pourrions procéder à des délétions de ce promoteur afin de déterminer les zones de régulation exacte. Ces zones identifiées, une analyse de la capacité de fixation des RR-B sur ces zones pourra être envisagée par test de *trans*-activation.

De même, malgré la nécessité de confirmer ces résultats préliminaires, nous avons pu observer une très forte activité *GUS* dans les racines du clone 21 traitées par de la BAP. Si ce résultat s'avère validé, nous aurons ainsi mis en évidence la régulation de ce gène par les cytokinines. La présence de

sites de fixation des RR-B dans le promoteur pourrait correspondre aux zones régulatrices de ce promoteur par les cytokinines *via* les RR-B. Cette hypothèse sera vérifiée si nous confirmons ce résultat par la même stratégie de délétion du promoteur. Parallèlement, des fractions de ce promoteur pourront être utilisées dans des tests de *trans*-activation afin de mieux cerner les zones régulatrices et les caractériser.

Pour *HK1b*, 4 sites de fixation potentiels par des RR-B ont été mis en évidence. Cependant, à l'inverse de *HK1a*, aucun motif étendu de fixation de l'ARR1 n'a été retrouvé au sein de cette séquence. Lors de l'analyse complémentaire de la présence de motifs putatifs dans ces deux gènes, la présence de plusieurs sites putatifs de réponse à l'ABA, à l'acide salicylique, aux gibbérellines, à l'éthylène et aux basses températures ont pu être trouvés pour *HK1b* et sont absents de la séquence de *HK1a*.

Ces différences observées entre les deux promoteurs des gènes *HK1a* et *HK1b* suggèrent des régulations différentes des deux gènes et vraisemblablement des rôles différents de ces paralogues. Une étude menée au laboratoire afin de comparer les deux protéines a conduit à la mise en évidence que ces deux récepteurs fonctionnaient de façon différente (Héricourt *et al.*, 2016, soumis). Ainsi, les différences observées entre ces deux promoteurs *via* des différences de zone régulatrice pourraient contribuer aux fonctionnements et aux rôles différents de ces deux récepteurs.

En ce qui concerne l'analyse du promoteur du *RR13*, aucun motif étendu de fixation de l'ARR1 n'a pu être identifié au sein de cette séquence, cependant 8 sites potentiels de fixation des RR-B ont été trouvés.

L'existence de sites putatifs de fixation de facteurs de transcription de type MYB (MBS), à l'ABA, à l'acide salicylique, ainsi qu'aux gibbérellines permet d'entrevoir une fonctionnalité de ce gène dans des processus physiologiques liés à ces signaux.

La transformation de plants avec la construction *promRR13-GUS* ayant été réalisée, des plants seront très prochainement disponibles au laboratoire afin d'effectuer les mêmes tests que pour *HK1a*. En effet, ce RR a déjà été démontré comme impliqué dans la signalisation CK et son expression est impactée par l'application d'une contrainte osmotique (Bertheau *et al.*, 2015).

L'analyse du promoteur du *RR18* a mis en évidence 8 sites potentiels de fixation des RR-B. L'analyse bio-informatique a également révélé l'existence de sites putatifs de fixation de facteurs de transcription de type MYB (MBS), ainsi que des sites putatifs de réponse à l'ABA, acide salicylique, auxines, méthyl jasmonate, gibbérellines ainsi que des sites de réponse au stress thermique pouvant nous aiguiller sur la possibilité de dialogues entre voies de signalisation (Figure S19 ANNEXE 7).

Les étapes de transformation concernant le promoteur du *RR18* seront réalisées très prochainement.

Concernant les promoteurs des gènes *HK1b*, *RR19* et *22*, les étapes de récupérations et de caractérisation des promoteurs seront poursuivies. Ce travail sera favorisée par la publication récentes des séquences du clone 717 du génotype *Populus tremula x P. alba* (Zhou *et al.*, 2015 ; Xue *et al.*, 2015). Les clonages seront ensuite effectués afin de réaliser les transformations de la même façon que pour *HK1a* et *RR13*.

Afin d'effectuer une meilleure étude dans les racines, une des perspectives au laboratoire consiste à créer des souches *Agrobacterium rhizogenes* contenant les constructions précédentes (ainsi que celles à venir). En effet, à l'inverse de la souche *Agrobacterium tumefaciens* utilisée lors de cette étude et naturellement capable de produire des tissus indifférenciés, la souche *Agrobacterium rhizogenes* permet le développement d'un réseau racinaire très important (hairy-root). Cela permettra

d'une part l'analyse plus en détail de l'expression des différents promoteurs dans ce tissu, mais également une forte production de biomasse, qui pourra être utilisée lors d'étude du locus d'insertion du transgène, ou bien pour s'assurer de la présence du promoteur cible au sein du génome de la plante.

Conclusion générale Partie I

Afin de déterminer l'identité des RR-B pouvant être impliqués dans la voie osmosensing, nous avons mis en œuvre deux approches complémentaires permettant d'obtenir des informations concernant la régulation de l'expression des gènes codant les RR-B lors d'un stress osmotique ou d'une application de cytokinines.

La première approche consistant à étudier la régulation de ces gènes par la technique de RT-PCR relative ou en temps réel nous a permis de montrer une régulation des gènes *RR13* et *RR18*, le premier semblant être un acteur primaire de la réponse au stress osmotique et le deuxième un acteur plus tardif de cette réponse.

La seconde approche a été conduite sur une sélection de gènes, *HK1a* et *1b*, ainsi que les *RR13*, *18*, *19* et *22*. Le travail a consisté à rechercher les promoteurs de ces gènes afin de les isoler et les caractériser.

Nous avons ainsi réussi à isoler entièrement les promoteurs de *HK1a*, *RR13* et *RR18*.

Des plants exprimant ces promoteurs en fusion avec le gène *GUS* ont été obtenus pour la construction *promHK1a-GUS* et des études préliminaires nous ont confirmé la présence de la construction. Au cours de ces études, nous avons pu observer une induction de ce gène sous contrainte osmotique ou par apport de cytokinines. Cette expérience préliminaire devra être réalisée sur un nombre plus important de plants afin de valider les résultats obtenus. Une analyse quantitative de l'activité de l'enzyme β -glucuronidase pourra également être envisagée.

Des plants ont également été obtenus pour la construction *promRR13-GUS* et seront testées très prochainement.

Pour le *RR18*, nous avons obtenu les constructions afin de procéder aux étapes de transformation.

Des portions de promoteurs ont pu être isolées également pour les *RR19* et *22* et en parallèle de la récupération des promoteurs complet, des constructions plus courtes pourront également être testées.

De manière générale, l'analyse des séquences cis-régulatrices des promoteurs des gènes *HK1* a montré des différences importantes de ces séquences pouvant être le reflet de régulations différentes et donc de rôles différentes. Cette constatation est également valable pour les promoteurs des *RR18*, *19* et *22* que nous supposons être impliqués dans la réponse à la sécheresse.

La mise en application de cette stratégie nous permettra de disposer d'informations importantes sur la régulation de ces gènes et leur importance dans la voie de signalisation osmosensing.

Afin de compléter nos connaissances sur ces RR, d'autres approches ont été mises en place dans ce travail.

L'étude des RR-B, acteurs finaux des voies de signalisations de type MSP a ainsi été menée selon différentes approches.

Si la première partie de ce travail portait sur l'étude de la régulation des RR-B afin de pouvoir déterminer ceux plus vraisemblablement impliqués dans la réponse à la sécheresse, une étude plus fonctionnelle a été mise en place en parallèle.

Cette étude portait sur la caractérisation fonctionnelle des RR-B via la caractérisation des domaines fonctionnels, domaine de liaison à l'ADN (domaine GARP), domaine de dimérisation (domaine DDK) ou via la caractérisation de la fonction de facteur de transcription par une approche d'étude de *trans*-activation ou une stratégie d'extinction de gènes par ARN interférentiel.

Partie II : caractérisation
fonctionnelle de RR-B
candidats à une implication
dans la voie de signalisation de
la contrainte osmotique

Introduction générale Partie II

Dans la partie précédente, notre objectif était d'étudier la régulation des gènes codant les RR-B par deux approches afin de sélectionner ceux potentiellement impliqués dans la signalisation de la contrainte osmotique. L'étude de la régulation des gènes codant ces partenaires par technique RT-PCR en temps réel a permis de mettre en évidence les RR13 et 18 comme candidats potentiellement intéressants.

Sur la base de l'existence d'une forte identité de séquence entre le RR18 et le RR19 et plus faiblement avec le RR22 (Bertheau *et al.*, 2015), ces deux derniers RR-B ont été avancé comme pouvant également être potentiellement impliqués dans les réponses de la plante à la contrainte osmotique. Ces deux RR-B ont donc été retenus pour la suite de notre étude.

Le RR13 ayant déjà fait l'objet d'une étude de caractérisation (Thèse L. Bertheau, 2013), notre objectif dans cette partie sera donc de réaliser une étude fonctionnelle des RR-B préalablement choisis, les RR18, 19 et 22.

Les RR-B étant des facteurs de transcription, leur structure est conservée et conditionne leur fonction biologique. Cette étude de fonctionnalité a été abordée selon deux approches : d'une part *via* l'étude de leur structure, et d'autre part *via* l'étude de leur fonction biologique *in planta*.

La première approche présentée en chapitre I s'est focalisée sur l'étude des deux domaines GARP et DDK retrouvés au sein des RR-B végétaux et présenté en section I et II respectivement :

- la section I de ce chapitre présente nos travaux concernant le domaine GARP et la capacité des RR-B à se fixer à l'ADN *via* ce domaine. Cette étude est basée sur ce qui a été préalablement effectuée pour le RR13 de peuplier (Thèse L. Bertheau, 2013), pour lequel une capacité de liaison au motif consensus de fixation des RR-B (5'-(A/G)GAT(T/C)-3') a pu être mise en évidence par gel retard. Ainsi la même approche a été envisagée pour notre étude,
- la section II de ce chapitre présente nos travaux concernant le domaine DDK, responsable de la dimérisation des RR-B, comme démontré dans le cas de l'homodimérisation de l'ARR18 (Veerabagu *et al.*, 2012) ou du RR13 de peuplier (Thèse L. Bertheau, 2013). Cette étude sera réalisée par des expériences de double-hybride en levure.

La seconde approche présentée en chapitre II s'est focalisée sur l'étude de la fonctionnalité biologique des RR-B sera explorée sous deux angles complémentaires :

- le premier angle se propose d'étudier la capacité d'activation de la transcription des promoteurs des gènes *HK1a*, *RR13*, *18*, *19* et *22* par les RR13, 18, 19 et 22 *via* deux techniques de transactivation *in planta*,
- le deuxième angle se propose d'étudier l'impact de l'extinction des transcrits des *RR18*, *19* et *22* par la création de lignées transgéniques de peuplier, obtenues par stratégie ARN interférentiel.

Chapitre 1 : étude de la fonctionnalité des RR-B selon leurs différents domaines structuraux

Section I - Détermination de la capacité de fixation des RR-B à l'ADN par le biais du domaine GARP

I.1. Introduction

Le domaine GARP, anciennement nommé motif B (Hwang *et al.*, 2002) correspond à une région capable de se lier à l'ADN et appartient à la super-famille SWI3, ADA2, N-CoR and TFIIIB DNA-Binding Domains (SANT) (Aasland *et al.*, 1996). Les membres de cette famille peuvent être classifiés en fonction du nombre de répétitions du motif de séquence Myb. Ce motif est défini structuralement par la conformation « hélice-tour-hélice » et a été mis en évidence au sein de l'oncoprotéine C-Myb chez les mammifères, qui possède 3 répétitions imparfaites du motif appelées R1, R2 et R3 (Ebnet *et al.*, 1994).

Le domaine GARP ne possède lui qu'une répétition du motif Myb et est retrouvé chez les eucaryotes au niveau de nombreuses protéines aux fonctions biologiques différentes. Sa présence au sein de facteurs de transcription permet de classer ceux-ci dans la famille des protéines Myb-related (Stracke *et al.*, 2001). Son nom est tiré de facteurs de transcription chez qui il est retrouvé : GOLDEN 2 de *Zea mays*, ARR-B d'*Arabidopsis* et Psr1 de *Chlamydomonas*.

La séquence du domaine GARP de différentes espèces a permis de mettre en évidence de nombreuses zones conservées (Tamai *et al.*, 2002).

Ce domaine a été retrouvé dans la séquence de certains facteurs de transcription (Riechmann *et al.*, 2000) dont les RR-B où sa structure a pu être déterminée (Figure 25). Celle-ci est constituée de trois hélices α dont le maintien est assuré par des liaisons hydrophobes se produisant au niveau de résidus spécifiques (Hosoda *et al.*, 2002). Les deux dernières hélices α permettent le repliement « hélice-tour-hélice » évoqué précédemment et permettant la reconnaissance au niveau de l'ADN de motifs ou d'éléments de réponses (Hosoda *et al.*, 2002). Dans le cas d'*Arabidopsis*, plus de 50 gènes ont été pressentis comme encodant des protéines contenant un domaine GARP (Qu and Zhu, 2006).

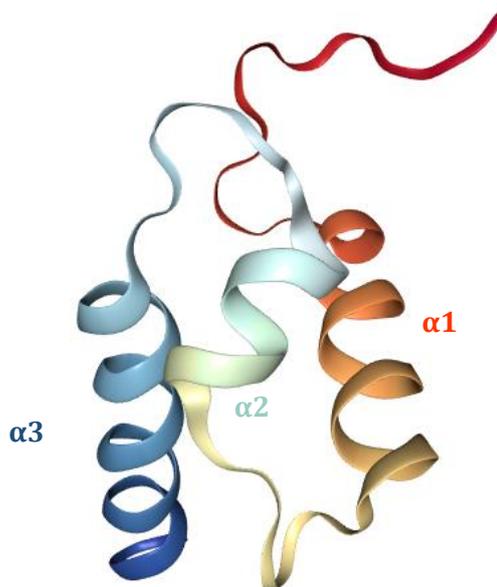


Figure 25 : modélisation de la structure du domaine GARP de l'ARR10.

Cette structure (Code PDB : 1IRZ) est composée de 3 hélices α ($\alpha 1$ à $\alpha 3$) et a été mise en évidence par la technique de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) en solution (Hosoda *et al.*, 2002).

Dans le cadre de la voie de signalisation liée aux cytokinines, la capacité d'interaction de ce domaine avec l'ADN a été étudiée et il a été mis en évidence que le domaine GARP des RR-B

d'*Arabidopsis*, ARR1, 2, 10 et 11, pouvait fixer la séquence ADN 5'-(A/G)GAT(T/C)-3' ceci *in vitro* (Sakai *et al.*, 2000 ; Imamura *et al.*, 2003 ; Hosoda *et al.*, 2002 ; Thèse L. Bertheau, 2013) et *in vivo* (Ross *et al.*, 2004).

De même il a été mis en évidence par tests de retard sur gel ou Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA), que le domaine GARP d'un RR-B de *Catharanthus roseus*, CrRR5, était capable de fixer le motif consensus 5'-(A/G)GAT(T/C)-3' présent dans le promoteur du gène codant l'enzyme 4-Hydroxy-3-MéthylBut-2-enyl DIPHosphate (HMBPP) Synthase (HDS) impliqué dans la voie Methyl Erythritol Phosphate (MEP) conduisant à l'accumulation d'alcaloïdes indoliques monoterpéniques chez cette plante (Ginis *et al.*, 2012).

L'étude de cette séquence consensus a été approfondie chez *Medicago truncatula* dans le cadre de la voie cytokinine également par le biais de la méthode d'Evolution Systématique de Ligands par Enrichissement Exponentiel (SELEX) et a conduit à la mise en évidence d'une séquence élargie comportant 12 résidus en ce qui concerne le RR-B, MtRR1 (Ariel *et al.*, 2012).

Concernant la voie de signalisation liée à la perception de la sécheresse, l'implication de domaine GARP n'a jamais été mise en évidence et l'identification des séquences ADN en *cis* des promoteurs non plus.

Du fait que certains RR comme le RR18 soient à ce jour clairement identifiés comme facteurs de transcription impliqués dans la voie de signalisation sécheresse, il apparait évident que son domaine GARP puisse se fixer sur les promoteurs de ses gènes cibles en rapport avec la réponse à la sécheresse.

Il apparait donc, en ce qui concerne la voie osmosensing, liée au phénomène sécheresse, un domaine vierge concernant la capacité des RR-B à fixer des séquences ADN ainsi que la caractérisation de ces séquences. Une question fondamentale porte donc sur le mécanisme de spécificité d'action des RR selon un signal donné.

Ainsi, il est important de pouvoir déterminer les éléments qui conduiront à la spécificité d'action des RR afin de permettre à la plante de répondre de façon spécifique à un signal tout en utilisant un panel de protéines (RR-B) commun à plusieurs voies de signalisation comme la voie cytokinine ou la voie osmosensing.

Nous avons ainsi émis l'hypothèse que cette spécificité d'action pouvait passer par le biais de la reconnaissance des séquences ADN permettant la fixation spécifique des facteurs de transcription sur les promoteurs. Ainsi, les RR-B ne reconnaîtraient pas tous les mêmes séquences et cela pourrait ainsi aboutir à la spécificité d'action de chacun pour une voie donnée.

En conclusion, deux questionnements liés peuvent être adressés.

- Serait-il possible qu'en fonction de la voie de signalisation considérée, le motif de fixation soit différent, déterminant ainsi la spécificité de la réponse apportée ?
- Pourrait-il à l'inverse y avoir des mécanismes de redondance de fonction au sein des RR-B observable par capacité de fixation à un même motif ADN ?

I.2. Contexte d'étude et objectifs

Au sein du laboratoire, une caractérisation du RR13 a été menée (Thèse L. Bertheau, 2013). Ce RR est l'homologue des ARR1 et 2 d'*Arabidopsis* et CrRR5 de *Catharanthus roseus* dont les rôles sont actuellement avérés dans la signalisation des cytokinines (Hwang and Sheen, 2001 ; Mason *et al.*, 2005 ; Ishida *et al.*, 2008 ; Ginis *et al.*, 2012 ; Kim and Hwang, 2012 ; Kim *et al.*, 2013).

Cette étude a abouti à la preuve que le RR13 était un RR fonctionnel en montrant qu'il était capable de fixer le motif de reconnaissance consensus 5'-(A/G)GAT(T/C)-3' et d'activer la transcription du gène *ARR6*, RR-A d'*Arabidopsis*, impliqué dans la voie cytokinique.

L'alignement des domaines GARP des différents RR de peuplier (Thèse L. Bertheau, 2013), révèle que les RR14 et 21 présentent des différences assez importantes de leurs domaines GARP par rapport à tous les autres RR et que les RR18, 19 et 21 se caractérisent en particulier par une absence notoire d'un résidu proline conservé dans les RR12, 13, 15 et 16 entre $\alpha 2$ et $\alpha 3$. Ce résidu proline semble décalé chez 14 et 21, pour se retrouver au sein de l'hélice $\alpha 3$ (Figure 26).

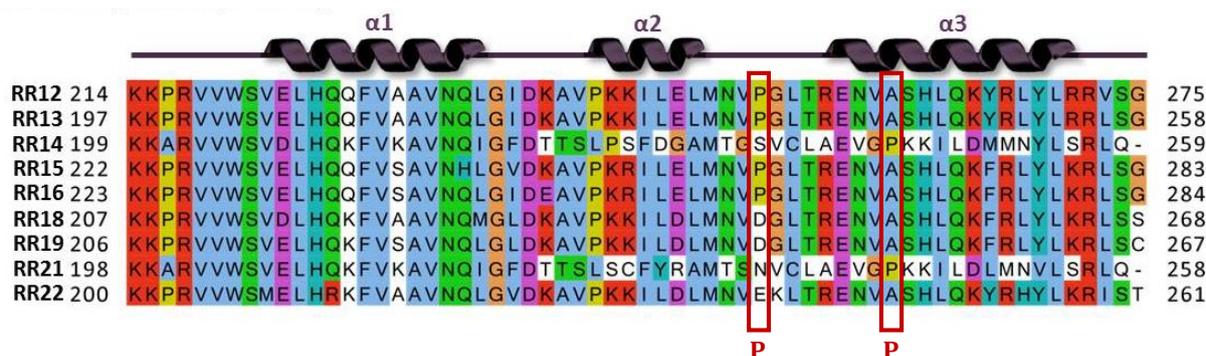


Figure 26 : alignement des séquences en acides aminés du domaine GARP de tous les RR-B de peuplier génotype *Dorskamp*.

En encadré rouge, le résidu proline (P) conservé dans les séquences protéiques des RR12, 13, 15 et 16 ou au sein de l'hélice $\alpha 3$ des RR14 et 21. Figure extraite de la thèse de L. Bertheau en 2013.

Le rôle du domaine GARP du RR13 ayant été mis en évidence dans la capacité de fixation de la protéine sur le motif ADN cible, nous pouvons ainsi nous questionner sur les capacités des autres RR à faire de même. Comme énoncé en introduction de ce chapitre, notre hypothèse repose sur le fait que certains RR-B, dont les RR18, 19 et 22, seraient des facteurs de transcription impliqués de la voie de signalisation sécheresse. De manière intéressante, la figure ci-dessus souligne bien que ces 3 RR-B sont caractérisés par l'absence de résidu proline entre les hélices $\alpha 2$ et $\alpha 3$ et qu'à l'inverse des RR14 et 21, ce résidu n'est pas retrouvé dans l'environnement proche de la proline consensus.

Cette différence de motif GARP pourrait-elle, en plus de la séquence de fixation ADN, être un élément induisant une spécificité par le biais d'une modification conformationnelle de l'hélice $\alpha 3$ responsable de la fixation à l'ADN ?

L'objectif de ce travail visait à :

1-Déterminer dans un premier temps, en terme de fonctionnalité structurale la capacité des domaines GARP des RR18, 19 et 22 à se fixer sur la séquence consensus à motif central de type 5'-(A/G)GAT(T/C)-3'. Sachant que ce motif pouvait être reconnu par des RR impliqués dans la voie cytokinines (ARR1, 2, 10 11, CrRR5, et plus largement MtRR1), cette première approche avait pour but de déterminer de la capacité de ces RR à se fixer sur des séquences de même type.

2-Identifier dans un deuxième temps, des séquences ADN qui pourraient être spécifiques de la réponse à la sécheresse.

Ne disposant pas de séquence consensus liée au stress osmotique, la stratégie envisagée a été la même que celle adoptée pour le RR13, c'est à dire déterminer par la technique EMSA dans un premier temps, la capacité des RR à fixer le motif 5'-(A/G)GAT(T/C)-3' (lié à la voie cytokinines). Dans

un deuxième temps, l'utilisation d'oligonucléotiques dégénérés sur les extrémités de ce cœur de séquence a été envisagée dans l'optique de déterminer les séquences complètes de fixation.

I.3. Résultats

I.3.a - Amplification et clonage dans les vecteurs d'expression des domaines GARP des RR18, 19 et 22

Les domaines GARP des RR18, 19, et 22 déterminés par rapport à l'alignement présenté en figure 26 ci-dessus (Thèse L. Bertheau, 2013) ont été récupérés par PCR à partir d'une matrice RR pleine longueur. Des sites de restrictions compatibles avec le vecteur de destination (PEX-5X-1) ont été ajoutés ainsi qu'un codon d'initiation de la traduction, le tout en respectant le cadre de lecture imposé par la séquence GST positionnée en amont du site multiple de clonage (ANNEXE 4). Les constructions ainsi obtenues ont été transférées en bactéries puis vérifiées par séquençage avant d'être introduites dans la souche *E.coli* BL21, classiquement utilisée pour les expériences de surproduction de protéines de fusion. Après vérification de la présence et de la fidélité de chaque séquence codant pour une protéine de fusion, les tests de surproduction ont pu être réalisés.

I.3.b - Tests de production des protéines de fusion RR-GARP-GST

La production des protéines de fusion a été vérifiée par analyse sur gel de polyacrylamide. Ainsi, pour chaque test, la même quantité de chaque échantillon à tester a été analysée. A l'exception de la souche GST-GARP-RR13 constituant le contrôle positif, la capacité de production de trois clones bactériens différents a été testée et les résultats étant identiques, seuls les résultats d'un clone ont été présentés pour chaque protéine de fusion.

I.3.b - i - Test positif : production de la protéine de fusion GST-GARP-RR13

Dans un premier temps, nous avons utilisé une souche préalablement construite lors du travail de L. Bertheau en 2013 et produisant la protéine de fusion GST-GARP-RR13 qui nous servira de contrôle positif de production de la protéine de fusion (Figure 27).

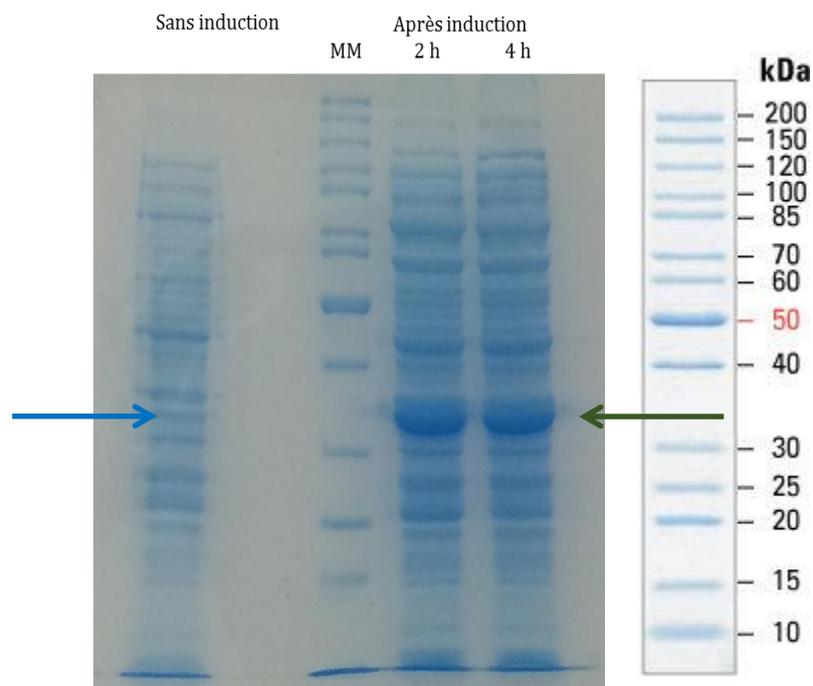


Figure 27 : analyse de la production des protéines totale et de la surproduction de la protéine de fusion GST-GARP-RR13 en souche d'*E.coli* BL21 avant induction, 2 heures après induction et 4 heures après induction par ajout d'IPTG 3 mM.

Les profils d'expression protéiques ont été réalisés sur gel polyacrylamide à 10% en conditions dénaturantes. Les flèches bleues et vertes indiquent la localisation de la protéine de fusion putativement produite respectivement avant et après induction.

Ainsi, la figure 27 montre qu'avant induction par ajout d'IPTG et de glucose 2%, aucune surproduction de la protéine de fusion n'est détectée sur gel SDS-PAGE. Par contre, lors de l'analyse des extraits protéiques collectés 2 heures ou 4 heures après induction, une protéine d'environ 37 kilo Dalton (**kDa**) correspondant à la masse moléculaire théorique calculée est bien surexprimée.

I.3.b - ii - Tests de production des protéines de fusion GST-GARP-RR18, 19 et 22

Dans le cas des RR18 (*Figure 28*), RR19 et RR22 (*Figure 29*), les profils de production des protéines totales ont été les mêmes pour les trois clones bactériens testés. Pour chaque RR, les résultats ont donc été présentés pour un seul clone bactérien.

GARP-RR18

L'analyse de l'extraction de protéines totales avant induction menées sur la souche *E.coli* contenant la construction GST-GARP-RR18 nous permet de dire que le profil observé est similaire à celui obtenu dans le cas de la souche *E.coli* contenant la construction GST-GARP-RR13 (*Figure 28*).

Lors de l'induction, la taille théorique calculée pour la protéine de fusion est d'environ 38 kDa et l'analyse par SDS-PAGE révèle une légère surexpression de protéines à la taille attendue. Cependant, ce signal est également présent, d'intensité un peu moindre, dans la piste correspondant à la production de protéines totales avant induction. Une hypothèse s'offre à nous : la protéine de fusion est bien produite de manière non optimale par rapport au RR13 et se trouve également produite de façon minoritaire en l'absence d'induction. Cette idée est rendue plausible par le fait que la construction dans le plasmide pGEX-5X-1 place l'ADNc codant pour le domaine GARP en aval d'un promoteur tac connu pour permettre une expression minimale en absence d'agent inducteur ([Saluta and Bell 1998](#)).

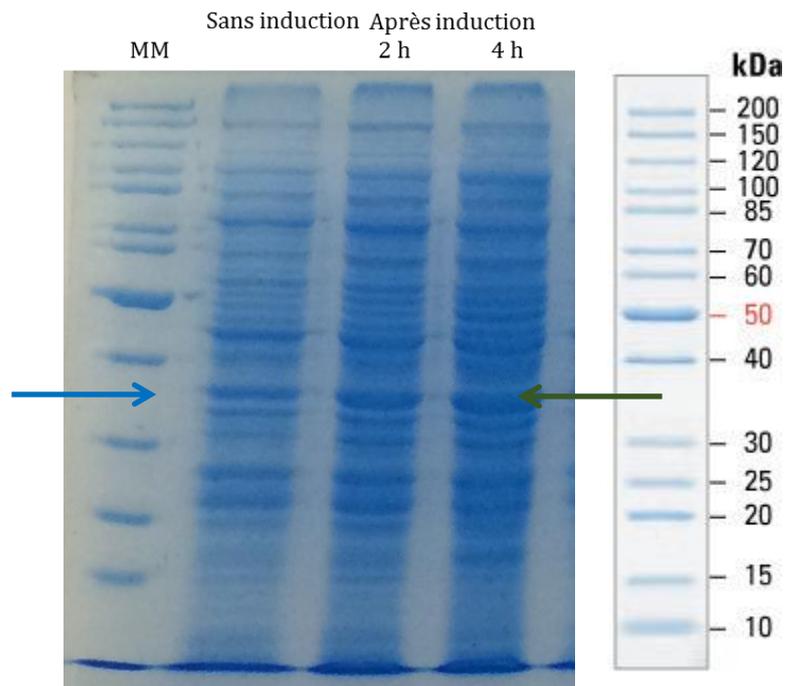


Figure 28 : analyse de la production des protéines totale et de la surproduction de la protéine de fusion GST-GARP-RR18 en souche d'E.coli BL21 avant induction, 2 heures après induction et 4 heures après induction par ajout d'IPTG 3 mM.

Trois clones bactériens ont été testés et les profils observés sont similaires à ceux présentés ici. Les flèches bleues et vertes indiquent la localisation de la protéine de fusion putativement produite respectivement avant et après induction.

GARP RR19 et 22

Dans le cas des souches contenant les protéines de fusion GST-GARP-RR19 et 22, les profils d'expression des protéines totales en absence d'induction sont similaires à ceux obtenus pour les RR13 et 18 (*Figure 29*).

Lors de l'ajout d'IPTG, des bandes majoritaires sont observées à environ 30 kDa ainsi qu'à 37 kDa. Les tailles théoriques attendues pour les protéines de fusions étant d'environ 35 kDa pour chaque construction, les profils observés pourraient correspondre à l'augmentation de la production des deux protéines de fusion. La présence de la bande à 30 kDa pourrait correspondre à une production de GST seule, puisque la taille théorique de cette protéine est de 28 kDa.

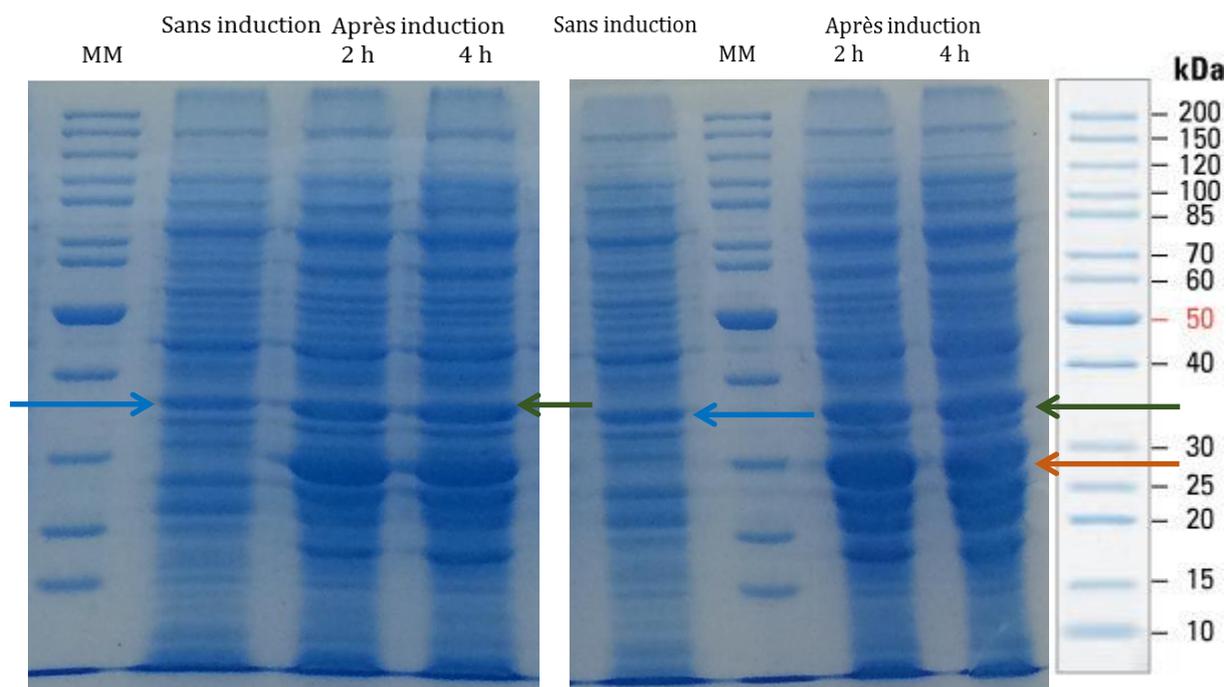


Figure 29 : analyse de la production des protéines totale et de la surproduction des protéines de fusion GST-GARP-RR19 (a.) et GST-GARP-RR22 (b.) en souche d'E.coli BL21 avant induction, 2 heures après induction et 4 heures après induction par ajout d'IPTG 3 mM.

Trois clones bactériens ont été testés et les profils observés sont similaires à ceux présentés ici. Les flèches bleues et vertes indiquent la localisation de la protéine de fusion putativement produite respectivement avant et après induction. La flèche orange indique la surproduction putative de la protéine GST seule après induction

I.4. Discussion

Nos objectifs au début de ce travail concernant la caractérisation fonctionnelle des RR-B d'un point de vue structural visaient à :

1-Déterminer la capacité des domaines GARP des RR18, 19 et 22 à se fixer sur la séquence consensus à motif central de type 5'-(A/G)GAT(T/C)-3'.

2-Identifier dans un deuxième temps, des séquences ADN qui pourraient être spécifiques de la réponse à la sécheresse.

Concernant notre premier objectif, nous avons réalisé avec succès les trois constructions plasmidiques afin de réaliser la production de protéines recombinantes. Les transformations bactériennes ont été réalisées ainsi que des essais de productions.

Toutefois, nous nous sommes confrontés à des difficultés pour les 3 protéines. Il semblerait ainsi que même si le protocole de production initial ait parfaitement fonctionné en ce qui concerne le domaine GARP du RR13, puisque ce domaine a pu être produit en quantité suffisante pour ensuite être isolé et testé en EMSA, ce protocole ne puisse permettre la production efficace des 3 domaines GARP des RR18, 19 et 22.

Plusieurs modifications du protocole ont été tentées afin d'améliorer la production, telles des changements de conditions de cultures en terme de milieu et de température et des conditions d'induction (concentration en IPTG et temps d'induction). Cependant, aucune de ces modifications n'a permis d'améliorer l'expression des protéines recombinantes.

Plusieurs raisons à ces échecs ont été envisagées.

La première hypothèse serait une mauvaise insertion de la séquence ADN du domaine GARP dans le plasmide d'expression.

Toutes les constructions utilisées ayant été séquencées afin de vérifier le respect du cadre de lecture, la construction des plasmides ne semble donc pas être à remettre en cause. Cette hypothèse a donc pu être écartée.

De plus, afin de vérifier que le problème ne provenait pas du plasmide en lui-même, les domaines GARP des RR18, 19 et 22 ont été substitués par digestion enzymatique et ligation à celui du RR13 dans le plasmide pGEX-5X-1 ayant permis une production efficace de la protéine de fusion. Le résultat de ce clonage a été re-séquéncé pour s'assurer de la validité de la substitution réalisée. Cet essai n'a cependant conduit à aucune amélioration des profils de production obtenus.

Une seconde hypothèse envisagée serait une mauvaise efficacité de co-transformation de la souche BL21.

En effet, afin de permettre la synthèse des protéines de fusion, une co-transformation de la souche bactérienne est réalisée à la fois avec le plasmide d'intérêt contenant la construction de fusion, mais également avec le plasmide pUBS-520 responsable de la synthèse d'un ARNt isoaccepteur des codons arginine AGG et AGA, acide aminé rare chez la bactérie. Nous avons systématiquement vérifié la transformation des bactéries par PCR sur colonie, mais uniquement dans le but de vérifier la présence du plasmide d'intérêt. Nous n'avons ainsi pas de preuve de ce côté-là de la présence du pUBS-520. Cependant, ce plasmide permet l'apport d'une résistance à la kanamycine et toutes les souches utilisées ont été sélectionnées sur un milieu contenant cet antibiotique, apportant un argument en faveur de la co-transformation efficace des bactéries.

Ainsi, nous avons pu écarter l'hypothèse d'un problème de co-transformation mais cependant pas un problème d'expression de l'ARN de transfert qui reste difficile à prouver.

Une troisième hypothèse repose sur la variabilité de séquences des domaines GARP considérés.

En effet, comme montré en introduction de ce chapitre, on constate qu'un résidu proline localisé entre les hélices $\alpha 2$ et 3 est manquant dans les séquences des domaines GARP des RR18, 19 et 22 comparativement aux séquences des domaines GARP des RR12, 13 15 et 16. L'absence de ce résidu pourrait très bien influencer sur la structure de ces domaines sans pour autant affecter le repliement en hélice. En effet, comme les résidus glycine et proline sont des acides aminés importants pour la constitution des boucles, la modification de ce résidu proline en glycine dans les domaines GARP des RR18, 19 et 22, ne devrait en rien altérer la structure et la formation de la boucle entre les deux hélices et de ce fait leur fonctionnalité de fixation sur l'ADN.

Par contre, cette modification en acides aminés pourrait très bien être responsable de propriétés physico-chimiques différentes de ces domaines GARP comparativement au domaine GARP du RR13. Ces modifications pourraient alors très bien conduire à l'agrégation de la protéine recombinante et expliquer, par exemple, le profil observé pour la protéine recombinante GST-GARP-RR18. De plus, comme évoqué en partie introductive, ces variations d'acides aminés dans cette boucle pourraient peut-être participer à la spécificité de fixation sur l'ADN. Un argument en faveur de cette hypothèse repose sur la comparaison de ces domaines GARP avec celui de l'ARR18 pour lequel on constate une très forte conservation de séquence mais où l'on constate en effet que le résidu proline y est également absent (*Figure 30*).

DkRR18 207 KKPRVVWSV^{DLH}QK^{FVA}AVN^{QML}G^LDKAV^PPK^ILD^{LM}NV^DGL^TRE^NVASH^LQ^KFR^ILY^LKR^ISS 268
DkRR19 206 KKPRVVWSV^{ELH}QK^{FV}SAVN^{QL}G^LDKAV^PPK^ILD^{LM}NV^DGL^TRE^NVASH^LQ^KFR^ILY^LKR^ISC 267
DkRR22 200 KKPRVVWSMELH^QK^{FVA}AVN^{QL}G^VDKAV^PPK^ILD^{LM}NV^EKL^TRE^NVASH^LQ^KYR^HY^LKR^IST 261
DkRR13 197 KKPRVVWSV^{ELH}Q^{CC}FVA^{AVN}QL^GLD^IDKAV^PPK^ILE^{LM}NV^PGL^TRE^NVASH^LQ^KYR^ILY^LRR^LSG 258
ARR18 193 KKPRVVWS^{CEL}H^QK^{FV}SAV^{CC}L^GLD^IDKAV^PPK^ILD^{LM}SI^EGL^TRE^NVASH^LQ^KYR^ILY^LKR^IDE 254

Figure 30 : alignement du domaine GARP des RR18, 19 22 et 13 de *Populus Dorskamp* avec l'ARR18 d'*Arabidopsis thaliana*.

En encadré rouge, la localisation du résidu proline conservé dans la séquence protéique du RR13, 15 et 16 et absent des RR18, 19, 22 et ARR18 présentés.

L'alignement des ARR1 et RR13 confirme cette hypothèse puisque le résidu proline s'y retrouve sachant que ces deux RR sont lié à la voie cytokinine (Figure 31). Cette zone ainsi que d'autres acides aminés pourraient peut-être participer à la spécificité décrite.

"ARR2-like" *Medicago truncatula* (207-271) STSKKPRVVWSI^{EL}H^QQ^FMA^VVN^{QL}G^LDKAV^PPK^IMEM^MNV^PGL^TRE^NVASH^LQ^KYR^ILY^LRR^LSG
ARR1 *Arabidopsis thaliana* (233-297) SNLKKPRVVWSV^{EL}H^QQ^FVA^{AVN}QL^GVE^KAV^PPK^ILE^{LM}NV^PGL^TRE^NVASH^LQ^KYR^ILY^LRR^LGG
RR13 *Populus dorskamp* (194-258) STLKKPRVVWSV^{EL}H^QQ^FVA^{AVN}QL^GDKAV^PPK^ILE^{LM}NV^PGL^TRE^NVASH^LQ^KYR^ILY^LRR^LSG

Figure 31 : alignement du domaine GARP de *Medicago truncatula*, *Arabidopsis thaliana* et *Populus Dorskamp*.

En encadré rouge, la localisation du résidu proline conservé dans les séquences protéiques des RR12, 13, 15 et 16 de peuplier ainsi que les RR-B des deux autres espèces. Figure extraite de la thèse de L. Bertheau en 2013.

Pour les RR18, 19 et 22, une expression de la protéine de fusion a pu être observée en absence d'agent inducteur. Comme expliqué dans la partie résultats, le système promoteur/inhibiteur permettant le contrôle de la synthèse de la protéine de fusion est connu pour permettre une expression minimale, pouvant être partiellement éliminée par incubation des cultures en présence de glucose. Dans notre cas, l'inhibition de la synthèse de la protéine de fusion pourrait peut-être se trouver améliorer par modulation des quantités de glucose apportés.

En ce qui concerne la production des domaines GARP des RR19 et 22, les profils obtenus sont beaucoup plus complexes puisque l'on constate vraisemblablement la production de la GST seule. Comme évoqué précédemment, cette production résiduelle provient probablement d'un décrochement de la machinerie cellulaire après la séquence codant pour la GST et avant la partie correspondant aux RR-B. Au vue des faibles taux de production des protéines de fusion, cette production parasite représente un frein à l'étape ultérieure de purification, puisque celle-ci est basée sur la présence de la GST pour permettre de ne conserver que la protéine de fusion. De ce fait, la GST seule pourra rentrer en compétition avec la fixation de la protéine de fusion et, selon les quantités de chaque protéine produite, la purification de la GST seule au détriment de la protéine de fusion pourra se produire.

En perspective de ce travail, plusieurs solutions peuvent être envisagées.

Au vu de ces difficultés, d'autres essais pourront être faits comme par exemple utiliser un autre type de plasmide contenant un autre tag comme un 6xhistidine. La nature de la fusion étant différente, cela pourra conduire éventuellement à éviter la formation de corps d'inclusion.

L'utilisation d'autres souches bactériennes peut également amener des améliorations car il est reconnu que toutes les souches bactériennes ne produisent pas les protéines de fusion avec la même efficacité.

De même comme mentionné pour MtRR1, RR-B de *Medicago truncatula*, d'autres stratégies peuvent être envisagées afin de répondre aux questions que nous nous posons. La méthode SELEX a largement permis d'élucider les cibles moléculaires de facteurs de transcription variés. Cette dernière technique a ainsi notamment permis de mettre en évidence la capacité de nombreux facteurs de transcription à reconnaître des motifs secondaires chez *Arabidopsis* dont certains ne possédaient aucune similarité avec l'élément primaire (Franco-Zorilla *et al.*, 2014). L'avantage de cette technique serait de pouvoir répondre à la fois à la première question à savoir si nos RR étaient capables de se fixer sur le motif 5'-(A/G)GAT(T/C)-3' caractéristique des gènes liés aux cytokinines mais également à la seconde, qui était de déterminer si des motifs spécifiques de la réponse à la sécheresse existaient.

En conclusion, dans l'objectif global de procéder à la caractérisation fonctionnelle des RR18, 19 et 22 par une approche structurale *via* l'étude du fonctionnement des domaines fonctionnels de la protéine, en l'occurrence de la capacité de fixation à l'ADN du domaine GARP, nous n'avons pas pu apporter de réponse. Cependant, celles-ci pourront être obtenues par d'autres approches notamment par des études de *trans*-activation sur des promoteurs cibles possédant des séquences en *cis* que nous pourrions moduler.

Ce point sera abordé dans la section II du chapitre 2, Partie 2 de ce manuscrit.

Dans le temps imparti pour ma thèse, il nous a fallu faire des choix et au vu des difficultés rencontrées, nous n'avons pas priorisé cette approche.

Les RR étant fonctionnels d'une part en raison de leur capacité de fixation à l'ADN et d'autre part en raison de leur capacité à dimériser, nous avons également abordé cette caractérisation de fonctionnement *via* l'étude de leur capacité à dimériser.

Cet autre aspect est donc développé dans la section II du chapitre 1, Partie 2 de ce manuscrit.

Section II - Etude de la capacité de dimérisation des RR-B

II.1. Introduction

D'un point de vue mécanistique, les interactions protéines-protéines représentent un évènement clé de régulation des fonctions de ces protéines permettant en conséquence leur implication dans de nombreux processus biologiques. Parmi ces interactions, la dimérisation représente un mécanisme largement retrouvé, intervenant par exemple dans de nombreux systèmes de signalisation et concerne particulièrement les facteurs de transcription.

Comme décrit dans le chapitre introductif, les RR-B sont des facteurs de transcription composés de trois domaines caractéristiques qui sont le domaine DDK, le domaine GARP et le domaine de *trans*-activation (*Figure 32*). Le domaine receveur DDK se caractérise par la présence d'acides aminés conservés dont un résidu aspartate en charge de recevoir le phosphate (*Sakai et al., 1998*).



Figure 32 : schéma des différents domaines composants les RR-B.

Les lettres D et K représentent respectivement des résidus aspartate et lysine conservés au sein du domaine receveur de phosphate et le deuxième résidu aspartate est matérialisé après transfert du groupement phosphate provenant du partenaire précédent. Les lettres P/Q représentent une forte présence des résidus proline et glutamine au sein du domaine de *trans*-activation. NLS (Nuclear Localization Sequence) correspond à des séquences permettant l'adressage nucléaire de la protéine.

II.1.a - Cas des RR-B procaryotes

Chez les bactéries, la structure du domaine receveur (également appelé domaine REC) a été identifiée. Ce domaine composé d'environ 120 acides aminés est structuré selon une topologie $(\alpha/\beta)_5$ soit 5 hélices α et 5 feuilletts β (*Gao and Stock 2009*). Cette structure est représentée dans la figure 33.

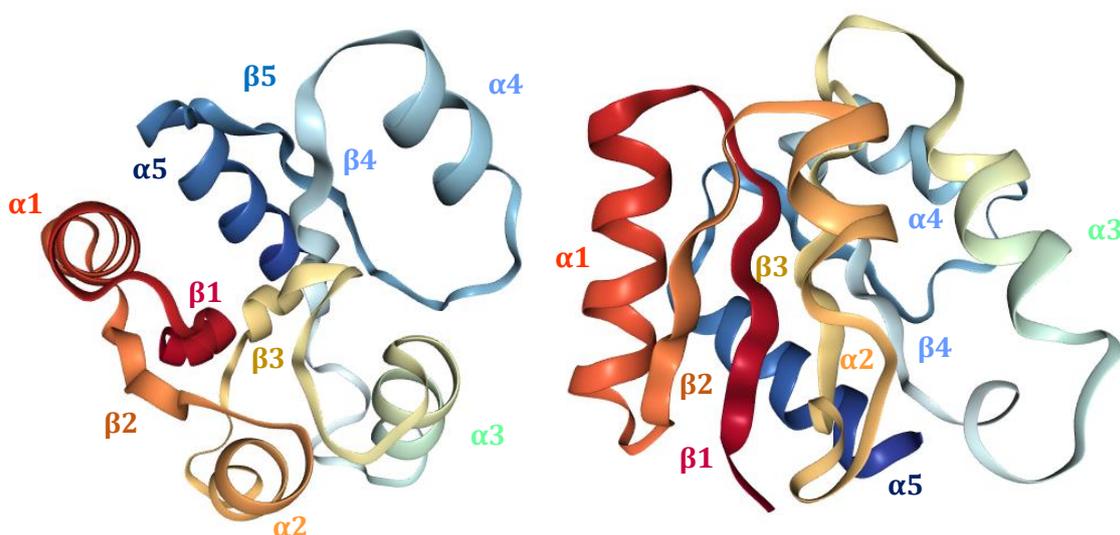


Figure 33 : structure topologique du domaine receveur (REC) des RR bactériens.

Cette structure (Code PDB : 1B00) est composée de 5 hélices alpha ($\alpha 1$ à 5) ainsi que 5 feuillets bêta ($\beta 1$ à 5) et a été réalisée à partir de l'analyse du RR PhoB d'E. coli (Gao and Stock 2009).

Chez les bactéries, il a été rapporté pour de nombreux RR, une capacité de dimérisation se réalisant par le biais de leur domaine REC précédemment décrit (Mack *et al.*, 2009 ; Barbieri *et al.*, 2013 ; Toro-Roman *et al.*, 2005b).

Pour la famille OmpR/PhoB, regroupant une large portion de l'ensemble des RR-B bactériens (30 à 40%) (Galperin, 2010) ainsi que pour la famille NarL/FixJ, représentant environ 19% de l'ensemble des RR bactériens (Baikalov *et al.*, 1996 ; Kurashima-Ito *et al.*, 2005 ; Galperin, 2006), une surface d'interaction composée des hélices $\alpha 4$ et $\alpha 5$ (Figure 34) encadrant le feuillet $\beta 5$ est présente au sein du domaine receveur du RR (Robinson *et al.*, 2003 ; Bachhawat *et al.*, 2005 ; Toro-Roman *et al.*, 2005a et b ; Bachhawat and Stock, 2007 ; Gao and Stock 2010).

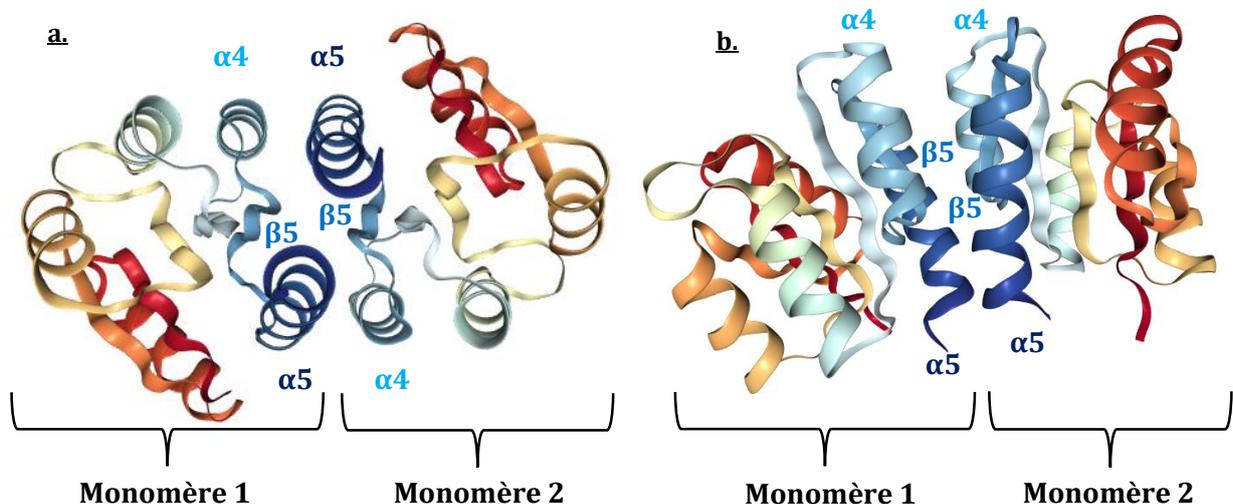


Figure 34 : structure cristallisée du domaine receveur du RR bactérien ArcA sous forme d'homodimère.

*Les deux monomères (Code PDB 1XHE) sont représentés en interaction vue de dessus (a) et de face (b) et pour chaque monomère, les hélices $\alpha 4$ et 5 ainsi que le feuillet $\beta 5$ sont indiqués afin de matérialiser la surface d'interaction $\alpha 4$ - $\beta 5$ - $\alpha 5$ entre les deux monomères (Toro-Roman *et al.*, 2005a).*

Au niveau fonctionnel, près de 50 % des RR bactériens forment des homodimères après phosphorylation (Creager-Allen *et al.*, 2013 ; Capra and Laub, 2012). L'homodimérisation s'avère en ce cas être un évènement crucial afin de permettre l'activation du RR et donc la mise en place d'une réponse (Gao and Stock, 2010). Une hypothèse suggère que cette phosphorylation serait responsable d'un changement de conformation de la protéine (Gao and Stock, 2009), conduisant à une réorganisation de la surface d'interaction $\alpha 4$ - $\beta 5$ - $\alpha 5$ précédemment décrite (Lee *et al.*, 2001 ; Gao and Stock, 2009 ; 2010). Ce changement module ainsi l'aptitude de la protéine d'une part, à interagir avec d'autres protéines et d'autre part, à interagir avec l'ADN par le biais de son domaine de fixation. Par contre, chez les bactéries il semblerait que les processus évolutifs aient favorisé les processus d'homodimérisation. Ce phénomène de sélection de l'homodimérisation par rapport à l'hétérodimérisation a été mis en évidence chez les RR bactériens mais également chez les HK bactériens (Gao *et al.*, 2008 ; Capra and Laub 2012) et cela même lors de la duplication de gènes apparaissant au cours de l'évolution. Ainsi, chez les procaryotes, les RR dupliqués voient leurs acides aminés impliqués dans les interfaces modifiés de façon à maintenir la spécificité HK/RR (Salazar and Laub 2015).

II.1.b - Cas des RR-B des végétaux

D'un point de vue structural, aucun RR végétal n'a été à ce jour cristallisé. Par contre, le domaine receveur du récepteur CKI1 (Pekárová *et al.*, 2011) a pu être cristallisé et révèle une organisation topologique $(\alpha/\beta)_5$ comme celle des RR bactériens (Figure 35).

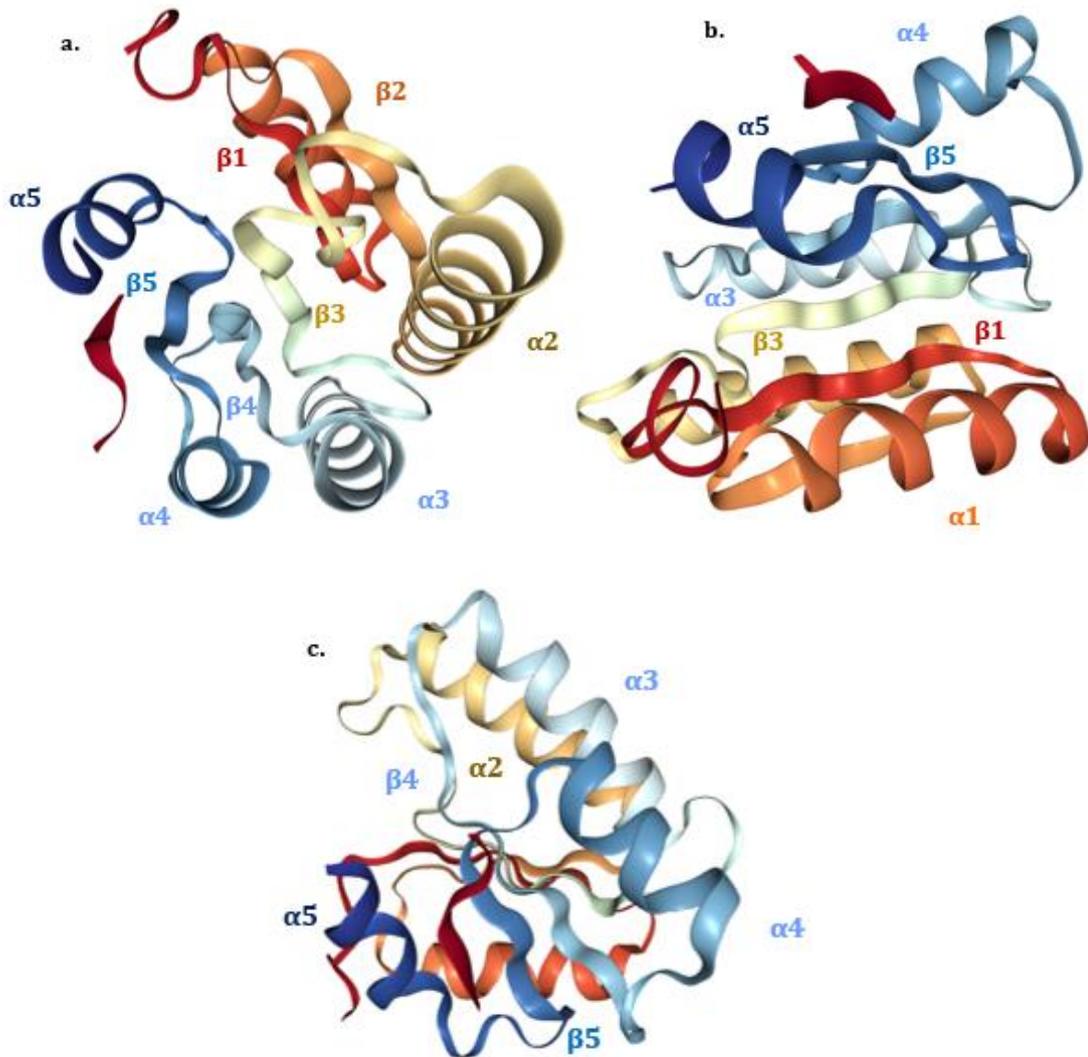


Figure 35 : structure cristallisée du domaine receveur de l'HK d'Arabidopsis CKI1.

*La protéine (Code PDB 3MM4) est représentée vue de dessus (a.), de faces (b. et c.). L'ensemble des hélices α ainsi que les feuillets β sont indiqués (Pekárová *et al.*, 2011).*

Chez les végétaux, le domaine DDK a été avancé comme responsable de la dimérisation des RR-B (Hosoda *et al.*, 2002). De nombreux exemples de dimérisation ont été rapportés, à l'instar de l'homodimérisation de l'ARR14 (Dortay *et al.*, 2006) ou de l'ARR18 (Veerabagu *et al.*, 2012) ou encore par exemple, la capacité d'hétérodimérisation ARR14/ARR2 mise en évidence et uniquement observée par l'usage de la technique *in vitro* « GST-pull down » (Dortay *et al.*, 2006). Les études menées sur l'ARR18 ont permis de montrer d'une part, que l'homodimérisation de ce RR n'est possible que si les deux monomères sont dans un même état soit de phosphorylation ou de non phosphorylation et d'autre part, que cette protéine développe son activité transcriptionnelle en état de phosphorylation.

D'un point de vue fonctionnel, chez *Arabidopsis*, la présence du domaine DDK dans les RR-B semble indispensable à l'activité de ceux-ci puisque la suppression de ce domaine conduit à une activité constitutive du RR-B et ce même en absence de signal (Sakai *et al.*, 2001 ; Imamura *et al.*, 2003 ; Tajima *et al.*, 2004 ; Ginis *et al.*, 2012 ; Liang *et al.*, 2012). De plus, ce domaine semblerait important dans l'acquisition d'une configuration active du RR (Liang *et al.*, 2012). La même observation a pu être faite concernant le RR13 de peuplier génotype *Populus tremula x Populus alba* (Ramírez-Carvajal *et al.*, 2009).

II.2. Contexte de l'étude et objectifs

Dans le génotype Dorskamp sur lequel nous travaillons, des 11 gènes codant des RR-B normalement présents, seuls 9 ont été isolés (Thèse L. Bertheau, 2013).

L'analyse phylogénétique de ces RR montre principalement que ceux-ci ont été dupliqués au cours de l'évolution (Bertheau *et al.*, 2012 ; 2015) (Figure 36).

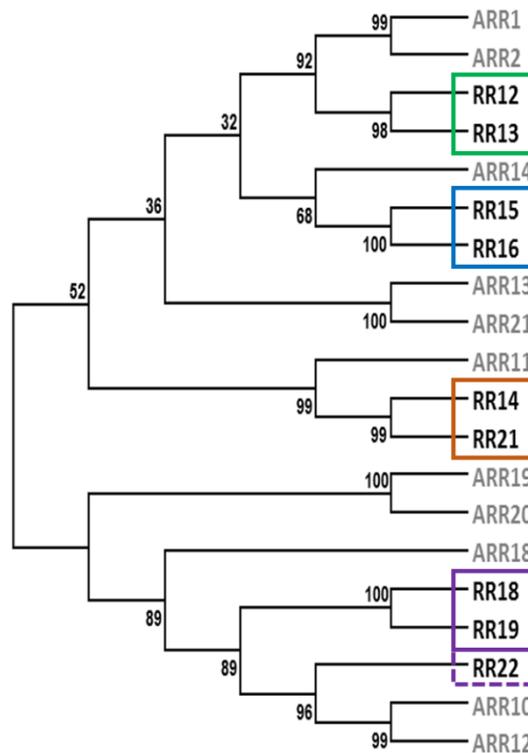


Figure 36 : arbre phylogénétique entre les séquences protéiques pleines longueurs des différents RR-B d'*Arabidopsis* (en gris) et de *Populus* (en noir).

Les valeurs situées à chaque nœud de l'arbre représentent les répliquats de bootstrap effectués. Les rectangles de couleurs matérialisent les paires de RR-B de peuplier ainsi déterminés et le trait pointillé présent pour le RR22 explicite les similitudes de séquences retrouvées avec la paire RR18-19. Figure extraite de Bertheau *et al.*, 2015.

La figure 36 nous permet de visualiser les différentes paires de RR-B. Ainsi, le RR12 et le RR13 forment une paire, ainsi que les RR14 et 21, 15 et 16 ainsi que 18 et 19. Le RR22 ne semble pas être apparié mais se retrouve être apparenté à la paire 18-19.

D'autre part, tous ces RR sont capables d'interagir avec les 3 protéines HPTs (HPT2, 7 et 9) partenaires de HK1, le récepteur osmosenseur de peuplier (Bertheau *et al.*, 2012, 2015). Cependant, parmi ces 9 RR, certains semblent être plus affins vis-à-vis de ces 3 protéines HPT laissant penser à l'existence d'un partenariat préférentiel.

Parmi les différents RR isolés chez ce génotype, la capacité d'homodimérisation du RR13 *via* son domaine DDK et son interface $\alpha 4$ - $\beta 5$ - $\alpha 5$ a été démontrée. De même, le rôle déterminant dans cette dimérisation d'un résidu glutamate, localisé au début de l'hélice $\alpha 5$ dans un motif particulier appelé motif PIRIE, a pu être démontré (Thèse L. Bertheau, 2013).

Comme évoqué en partie introductive de ce chapitre, certaines études montrent que certains RR de plantes sont capables d'homodimérisation. Cependant, aucune étude exhaustive de dimérisation des RR-B d'une même espèce n'a été menée à ce jour. Compte tenu de la présence de paires de RR chez le peuplier, la question du rôle de cette duplication dans la conservation d'une spécificité de voie de signalisation se pose entièrement.

Toutefois, certains points restent à élucider :

- Le résidu glutamate (E) du motif PIRIE du RR13 muté en résidu K a conduit à l'abolition complète de la dimérisation de ce RR (Thèse L. Bertheau, 2013). Chez les RR14 et 21, on constate naturellement la présence de ce résidu K à la place du E. En considérant la variabilité observée au sein du motif PIRIE (*Figure 37*) entre les différents RR isolés, l'homodimérisation de tous les RR est-elle possible ?

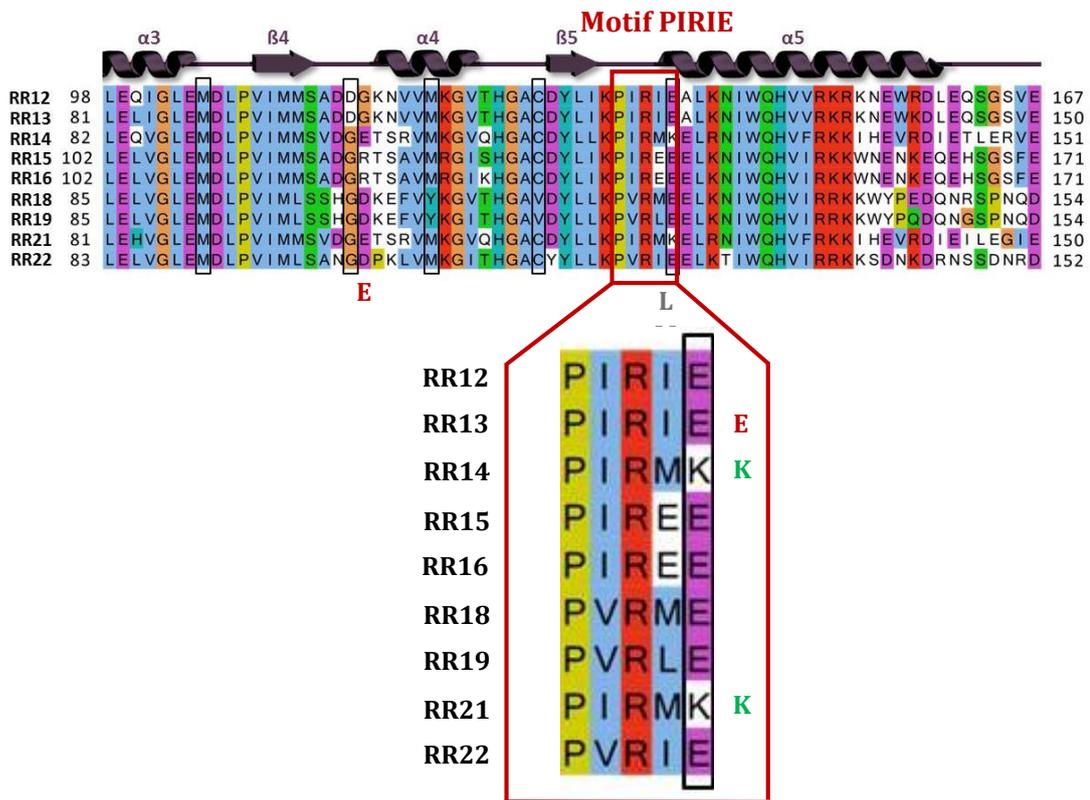


Figure 37 : alignement des séquences en acides aminés du domaine DDK de tous les RR-B de peuplier génotype Dorskamp.

En encadré rouge, le motif PIRIE mis en évidence dans la thèse de L. Bertheau, 2013. En vert, le résidu lysine (K) divergeant chez les RR14 et 21 et chargé positivement à pH neutre. En rouge le résidu glutamate (E) muté chez le RR13 en position 123 et chargé négativement à pH neutre ainsi que le résidu glutamate retrouvé chez les RR14 et 21 en amont de l'hélice α 4. En gris les résidus leucine (L) et méthionine (M) présents respectivement chez les RR18 et 19 et non chargé à pH neutre. Figure extraite de la thèse de L. Bertheau en 2013.

- Les processus d'hétérodimérisation sont-ils impossibles à l'instar de ce que l'on constate chez les procaryotes ?
- A l'inverse, si ces processus d'hétérodimérisation existent, à l'instar de ce qui est observé *in vitro* pour ARR2 et ARR14, quels types d'hétérodimères peuvent se constituer ? De plus, ces interactions *in vitro* sont-elles pertinentes ?
- Quel serait alors le rôle de ces hétérodimères en termes de spécificité de voie ?

Nos objectifs dans ce travail ont donc été les suivants :

- 1- Déterminer la capacité d'homodimérisation de tous les RR-B,
- 2- Déterminer la capacité d'hétérodimérisation des RR-B au sein d'une même paire,
- 3- Déterminer la capacité de dimérisation des RR-B membres d'une même paire vis-à-vis des autres RR-B.

II.3. Résultats

Afin de déterminer la capacité de l'ensemble des RR-B à former des homo- et/ou hétérodimères, la technique de double-hybride en levure a été utilisée. Cette technique, essentiellement qualitative, est basée sur l'utilisation de deux gènes rapporteurs différents. Elle permet de mettre en évidence les interactions protéine-protéine directes entre deux partenaires et est réduite à l'utilisation de protéines n'ayant pas de capacité d'auto-activation des gènes rapporteurs du système. Pour cette raison, les séquences complètes des RR-B n'ont pu être utilisées mais seulement les domaines DDK, sièges de la phosphorylation et de l'homodimérisation du RR13 (Thèse L. Bertheau, 2013).

A l'exception du RR13 pour lesquelles les constructions avaient déjà été réalisées lors de l'étude de la capacité de formation d'un homodimère RR13-RR13 (Thèse L. Bertheau, 2013), l'ensemble des constructions permettant de tester l'interaction des domaines DDK par double-hybride a été effectuée. Seul le domaine DDK du RR19 n'a pu être cloné à ce jour mais les expériences sont en cours.

Le choix des séquences à acquérir, correspondant aux acides aminés impliqués dans la formation et la structure tridimensionnelle des domaines DDK a été réalisée sur la base des études d'alignement et de structure de l'ensemble des domaines fonctionnels et structurels des RR-B de peuplier réalisés dans la thèse de L. Bertheau en 2013. Pour chaque RR, les acides aminés allant de la méthionine initiale jusqu'aux acides aminés jouxtant immédiatement la boucle $\alpha 5$ en fin de domaine ont été inclus dans les constructions (ANNEXE 8). Ainsi, chaque partenaire a été couplé soit au domaine GAL4, présent dans le plasmide pGAD et permettant l'activation de la transcription, soit au domaine LexA présent dans le plasmide pLex et permettant la liaison à l'ADN. Le contrôle de la validité des interactions observées a été testé par la combinaison de chaque domaine DDK couplé au domaine pLex vis-à-vis du domaine GAL4 seul. La construction GAL4-DDK-RR19 n'ayant à ce jour pas pu être obtenue en levure, seuls les résultats traitant de la configuration DDK-RR19 couplé au domaine LexA ont pu être analysés dans ce manuscrit.

L'ensemble des combinaisons a été déposé sur milieu témoin de croissance non sélectif -LW et sur le milieu sélectif -LWH carencé en histidine. Dans le cas d'une dimérisation des partenaires testés une reconstitution d'un facteur de transcription fonctionnel s'effectue.

Celui-ci permettra l'activation du premier gène rapporteur *HIS3*, et par conséquent la croissance des levures précédemment déficientes pour ce gène.

L'activation du deuxième gène rapporteur *LacZ*, permettant la production de l'enzyme β -galactosidase, a également été testée après ajout de son substrat le X-Gal, aboutissant à la synthèse d'un composé bleu en présence d'une interaction des deux partenaires testés. Durant l'expérience, les résultats de ce second test ont été lus après 5 heures d'incubation de la réaction à 37°C.

Afin d'obtenir une uniformisation des résultats présentés et de permettre la comparaison entre les différentes combinaisons testées, la même quantité de levures contenant les deux partenaires à tester (DO_{600} de 1) ainsi que trois dilutions successives ont été déposées pour chaque test d'interaction. Ceci permet d'avoir un reflet de la force de ces interactions. Deux répétitions biologiques de chaque combinaison de domaines DDK ont été effectuées. L'ensemble des résultats sont présentés sur la figure 38 et sont repris dans le tableau récapitulatif 12.

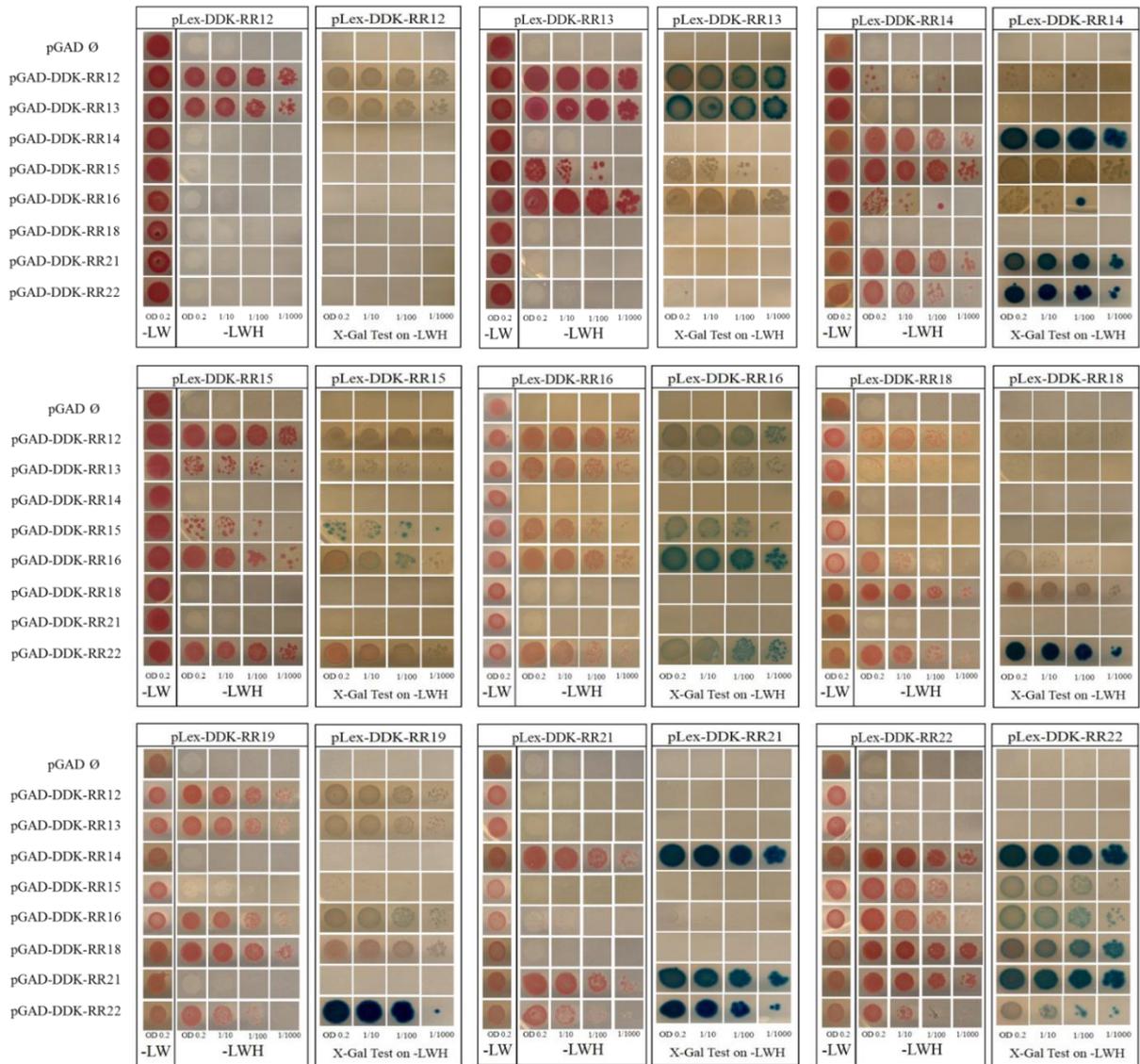


Figure 38 : etude de la capacité de dimérisation de l'ensemble des domaines DDK des RR-B par système double-hybride en levure par analyses de la croissance sur milieu carencé et activité β -galactosidase. Le symbole « \emptyset » représente la construction témoin pGAD ne contenant aucun domaine DDK. Les colonnes -LW correspondent aux tests de croissance sur milieu contrôle et les colonnes -LWH correspondent aux tests de croissances réalisés sur milieu carencé. OD 0.2 correspond à la quantité de levures équivalente à une absorbance à 600 nm de 0,2. 1/10, 1/100 et 1/1000 correspondent aux dilutions respectives réalisées à partir de la solution mère OD 0.2. Les tests X-gal sont lus après 5 heures d'incubation de la réaction à 37°C.

Pour faciliter l'exploitation de l'ensemble des données obtenues, l'analyse des résultats sera traitée séquentiellement en trois parties à l'aide de tableaux récapitulatifs selon les questions que nous posions.

II.3.a - L'ensemble des domaines DDK des RR-B possède une capacité de dimérisation en levure

pLex \ pGAD	12	13	14	21	15	16	18	19	22
∅	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	+	+	-	-	+	+	+	+	-
13	+	+	-	-	+	+	-	+	-
14	-	-	+	+	-	-	-	-	+
21	-	-	+	+	-	-	-	-	+
15	-	+	+	-	+	+	-	-	+
16	-	+	+	-	+	+	+	+	+
18	-	-	-	-	-	-	+	+	+
22	-	-	+	+	+	+	+	+	+

Tableau 11 : Bilan de la capacité de dimérisation pour l'ensemble des domaines DDK des RR-B de peuplier.

Le symbole « ∅ » représente la construction témoin pGAD ne contenant aucun domaine DDK. Les cases colorées en vert et marquées d'un symbole « + » représentent les combinaisons de domaines DDK pour lesquels ont été observés une croissance en levure et/ou une coloration bleue après tests X-Gal. A l'inverse, les cases blanches marquées d'un symbole « - » représentent les combinaisons de domaines DDK pour lesquelles aucune croissance n'a été observée.

Pour tous les domaines DDK testés par le système double-hybride en levure, un minimum de deux interactions (dans le cas du domaine DDK du RR12 couplé au domaine LexA vis-à-vis de tous les domaines DDK couplés au domaine GAL4) a été observé, validant nos constructions et la capacité des RR-B à former des dimères en levure.

Il est également important de noter que selon la fusion testée (LexA ou GAL4), une variation des capacités de dimérisations des domaines DDK a pu être observée. Un exemple parfait de ce cas de figure est la capacité d'interaction du domaine DDK du RR12, largement supérieure dans la configuration GAL4-DDK-RR12 par rapport à la configuration LexA-DDK-RR12. A l'inverse, pour certains domaines DDK, les résultats obtenus pour les deux fusions sont équivalents à l'instar du domaine DDK du RR21.

Afin de pouvoir conclure durablement quant à l'absence d'interaction de certaines combinaisons, il faudra s'assurer que ce résultat n'est pas simplement la conséquence de l'absence de production de l'un des deux partenaires. La vérification de la production des deux protéines pour chaque combinaison sera ainsi réalisée prochainement par la technique Western Blot.

Ainsi, par cette première étude, nous avons montré que tous les RR de peuplier sont capables de dimériser par le biais de leur domaine DDK.

II.3.b - Les domaines DDK des RR-B possèdent une capacité d'homodimérisation en levure

pLex \ pGAD	12	13	14	21	15	16	18	19	22
∅	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	+	+	-	-	+	+	+	+	-
13	+	+	-	-	+	+	-	+	-
14	-	-	+	+	-	-	-	-	+
21	-	-	+	+	-	-	-	-	+
15	-	+	+	-	+	+	-	-	+
16	-	+	+	-	+	+	+	+	+
18	-	-	-	-	-	-	+	+	+
22	-	-	+	+	+	+	+	+	+

Tableau 12 : Bilan de la capacité d'homodimérisation de l'ensemble des domaines DDK des RR-B de peuplier.

Le symbole « ∅ » représente la construction témoin pGAD ne contenant aucun domaine DDK. Les cases colorées en vert foncé et marquées d'un symbole « + » représentent les combinaisons de domaines DDK formant un homodimère pour lesquelles ont été observés une croissance en levure et/ou une coloration bleue après tests X-Gal. A l'inverse, les cases blanches marquées d'un symbole « - » représentent les combinaisons de domaines DDK pour lesquelles aucune croissance n'a été observée.

L'homodimérisation du RR13, témoin positif du système a pu être reproduite avec succès et, à l'exception du domaine DDK du RR19 pour lequel une seule construction a été obtenue, l'ensemble des domaines DDK des autres RR-B sont capables de constituer des homodimères (*Tableau 12*).

Tous les RR présentent une capacité d'homodimérisation forte, à l'exception du RR15 pour lequel cette homodimérisation présente un profil « colonies isolées » avant même la réalisation des dilutions successives. Cette homodimérisation ne semble pratiquement plus se produire après dilution au 1/1000^{ème} de la solution mère de levure. Ce type de profil est le reflet d'une faible interaction entre les deux partenaires c'est à dire une homodimérisation faible en ce qui concerne le RR15. Un profil relativement similaire à celui du RR15 est observé pour le RR22 représentatif d'une interaction de faible intensité également. Par contre, toutes les autres combinaisons d'homodimérisation continuent de se produire au-delà d'une dilution au 1/1000^{ème} (*Figure 38*), permettant d'établir que la formation des homodimères semble se produire avec une affinité relativement forte.

En conclusion, il apparaît que :

- Tous les RR-B sont capables d'homodimérisation même si l'on constate une capacité moindre pour les RR15 et 21.
- Le résidu K présent naturellement dans le motif PIRIE modifié (PIRMKE) des RR14 et 21 n'empêche absolument pas le phénomène de dimérisation se produisant entre ces deux RR-B.

II.3.c - Les domaines DDK des RR-B possèdent une capacité d'hétérodimérisation en levure

Outre la capacité d'homodimérisation, la capacité d'hétérodimérisation des RR-B a également été testée.

Comme expliqué dans le contexte de l'étude, les RR-B de peuplier présentent un fort taux de duplication puisque à l'exception du RR22, ils sont tous dupliqués (*Figure 36*) (RR12-13, RR14-21, RR15-16, RR18-19 et RR22 apparié).

II.3.c - i - Cas d'hétérodimérisation au sein d'une même paire de RR-B

pLex \ pGAD	12	13	14	21	15	16	18	19	22
∅	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	+	+	-	-	+	+	+	+	-
13	+	+	-	-	+	+	-	+	-
14	-	-	+	+	-	-	-	-	+
21	-	-	+	+	-	-	-	-	+
15	-	+	+	-	+	+	-	-	+
16	-	+	+	-	+	+	+	+	+
18	-	-	-	-	-	-	+	+	+
22	-	-	+	+	+	+	+	+	+

Tableau 13 : Bilan de la capacité d'hétérodimérisation intra-paires obtenue pour l'ensemble des domaines DDK des RR-B de peuplier.

Le symbole « ∅ » représente la construction témoin pGAD ne contenant aucun domaine DDK. Les différentes couleurs représentent les paires de RR-B. Les cases colorées en vert clair et marquées d'un symbole « + » représentent les combinaisons de domaines DDK formant un hétérodimère intra-paires pour lesquels ont été observés une croissance en levure et/ou une coloration bleue après tests X-Gal. A l'inverse, les cases blanches marquées d'un symbole « - » représentent les combinaisons de domaines DDK pour lesquelles aucune croissance n'a été observée.

Ces résultats conduisent à la validation de l'hétérodimérisation des RR-B d'une même paire (*Tableau 13*), et ce, quelle que soit la configuration utilisée. De plus, les hétérodimères formés au sein d'une paire représentent souvent les profils d'interaction les plus intenses, à des niveaux équivalents ou légèrement inférieurs à ceux obtenus pour l'homodimérisation (*Figure 38*).

Il est à noter que la paire 12-13 possède exactement le même motif PIRIE, alors que la paire 15-16 présente une modification de ce motif (motif PIRÉE). Quant à la paire 14-21, elle possède un motif PIRMK. L'hétérodimérisation au sein d'une paire semble nécessiter la présence d'un motif identique entre les RR-B de la paire.

Toutefois, la paire 18-19 est capable de dimérisation alors qu'elle possède non seulement un motif différent des autres RR-B mais aussi entre ses 2 membres : ainsi le RR18 possède le motif PVRME alors que le RR19 présente le motif PVRLE. La capacité de liaison des RR18 et 19 ne semble donc pas altérée malgré une modification du quatrième acide aminé au sein du motif (soit une méthionine pour le RR18 et une leucine pour le RR19).

II.3.c - ii - Cas d'hétérodimerisations entre les RR-B membres d'une même paire et les autres RR-B

pLex \ pGAD	12	13	14	21	15	16	18	19	22
∅	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	+	+	-	-	+	+	+	+	-
13	+	+	-	-	+	+	-	+	-
14	-	-	+	+	-	-	-	-	+
21	-	-	+	+	-	-	-	-	+
15	-	+	+	-	+	+	-	-	+
16	-	+	+	-	+	+	+	+	+
18	-	-	-	-	-	-	+	+	+
22	-	-	+	+	+	+	+	+	+

Tableau 14 : Bilan de la capacité d'hétérodimerisation entre paires, obtenue pour l'ensemble des domaines DDK des RR-B de peuplier.

Le symbole « ∅ » représente la construction témoin pGAD ne contenant aucun domaine DDK. Les différentes couleurs représentent les paires de RR-B. Les cases colorées en violet et marquées d'un symbole « + » représentent les combinaisons de domaines DDK formant un hétérodimère intra-paire pour lesquels ont été observés une croissance en levure et/ou une coloration bleue après tests X-Gal. A l'inverse, les cases blanches marquées d'un symbole « - » représentent les combinaisons de domaines DDK pour lesquelles aucune croissance n'a été observée.

Au-delà de la capacité des domaines DDK des RR-B à s'associer aux domaines qui leur sont le plus similaire, d'autres cas d'hétérodimerisation ont pu être observés (*Tableau 14*).

Au vu des résultats, il apparaît d'une part, que les possibilités d'hétérodimerisation entre paires semblent relativement réduites. D'autre part, il est intéressant de noter que les profils d'interaction au sein de chaque paire ne sont pas toujours identiques révélant soit des absences d'interaction soit des forces d'interaction différentes.

Le RR22 est le seul RR-B dont la capacité d'hétérodimerisation s'étend à l'ensemble des RR-B à l'exception de la paire 12-13. Ce profil d'interaction particulier pourrait ainsi être révélateur d'une fonction différente du RR22 par rapport aux autres RR.

De même, en ce qui concerne la paire 15-16, des interactions ont été observées avec toutes les paires de RR avec cependant des différences de comportement en fonction des membres de la paire, révélant que RR15 et RR16 ne se comportent pas toujours de manière identique.

Ainsi, RR15 ne peut établir d'interaction ni avec RR18 ni avec le RR19 alors que le RR16 en est capable.

De même, pour la paire 14-21, RR21 ne peut interagir ni avec RR15 ni avec RR16 alors que RR14 en est capable. De plus seul le RR22 a pu interagir avec les deux membres de cette paire dans les deux configurations.

Concernant la paire 18-19, les interactions les plus fortes pour cette paire sont observées vis-à-vis du RR22 qui comme montré dans l'arbre phylogénétique s'avère être un RR très proche de la paire 18-19.

On peut donc constater qu'au sein d'une paire, un des RR peut donc présenter un panel plus large d'interactions que son homologue. (le 19 par rapport au 18 ainsi que le 16 par rapport au 15).

II.3.c - iii - Résultats remarquables : absence stricte de dimérisation entre certaines paires

Au-delà de ces dimérisations, un des points les plus remarquables concerne l'absence de dimérisation observée entre certaines paires de manière stricte. Ces résultats sont mis en évidence dans le tableau 15.

pLex \ pGAD	12	13	14	21	15	16	18	19	22
∅	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	+	+	-	-	+	+	+	+	-
13	+	+	-	-	+	+	-	+	-
14	-	-	+	+	-	-	-	-	+
21	-	-	+	+	-	-	-	-	+
15	-	+	+	-	+	+	-	-	+
16	-	+	+	-	+	+	+	+	+
18	-	-	-	-	-	-	+	+	+
22	-	-	+	+	+	+	+	+	+

Tableau 15 : Bilan des hétérodimérisation inter-paire non observée parmi l'ensemble des domaines DDK des RR-B de peuplier.

Le symbole « ∅ » représente la construction témoin pGAD ne contenant aucun domaine DDK. Les différentes couleurs représentent les paires de RR-B. Les cases colorées en rouge et marquées d'un symbole « - » représentent les combinaisons de domaines DDK pour lesquels aucune croissance n'a été observée.

Comme observé dans le tableau, on constate une absence totale d'interaction entre la paire 14-21 et les paires 18-19 (mais observée avec le RR22) et 12-13.

Afin de faciliter la lecture de ces résultats, un schéma récapitulatif de cet interactome de dimérisation a été réalisé et est présenté dans la figure 39.

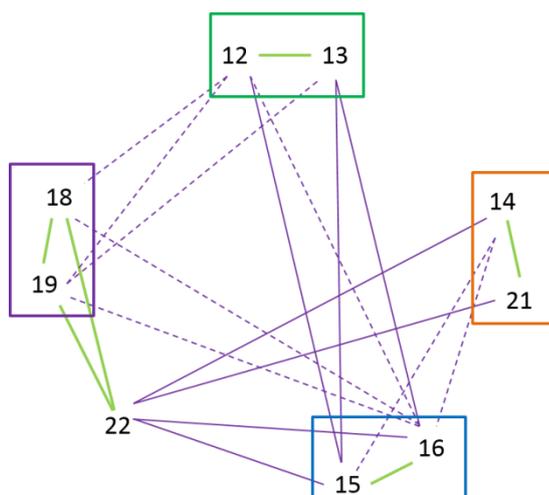


Figure 39 : schéma récapitulatif des hétérodimérisations observées entre les paires de RR-B parmi l'ensemble des domaines DDK des RR-B de peuplier.

Les traits pleins représentent les interactions caractérisées par une forte croissance et validées dans les deux configurations réalisées. A l'inverse les traits en pointillés sont le signe d'une croissance faible ou uniquement observée dans une seule configuration. Les rectangles de couleurs représentent les différentes paires abordées dans les tableaux précédents et traits plus épais en vert représentent les interactions établies entre les membres d'une même paire ou entre la paire 18-19 et le RR22 s'y appartenant.

L'ensemble de ces absences d'interactions peut laisser penser à la présence d'une certaine spécificité d'interaction et serait un bon argument pour la présence de voies de signalisations distinctes les uns des autres et dont des RR-B spécifiquement impliqués dans la réponse à la sécheresse.

II.4. Discussion

Nous avons trois objectifs au début de ce travail :

- 1- Déterminer la capacité d'homodimérisation de tous les RR-B
- 2- Déterminer la capacité d'hétérodimérisation des RR-B au sein d'une même paire
- 3- Déterminer la capacité de dimérisation des RR-B membres d'une même paire vis-à-vis des autres RR-B

1- Déterminer la capacité d'homodimérisation de tous les RR-B

Nous avons montré au cours de ce travail que l'ensemble des domaines DDK des RR-B montrait une capacité d'homodimérisation. Cette donnée avait déjà été établie pour plusieurs facteurs de transcription chez les végétaux dont certains RR-B (Veerabagu *et al.*, 2012 ; Dortay *et al.*, 2006 ; Thèse L. Bertheau, 2013)

Une étude de mutagenèse menée au sein du laboratoire sur le RR13 a pu déterminer que la simple mutation du résidu glutamate E123 du motif PIRIE situé au début de l'hélice $\alpha 5$, en un résidu lysine (K), était suffisante pour abolir la capacité de dimérisation de ce RR-B (Thèse L. Bertheau, 2013). L'hypothèse avancée concernant la dimérisation était que le résidu E123 du RR13, chargé négativement et situé dans l'hélice $\alpha 5$, pourrait interagir avec le résidu K106 chargé positivement et situé dans l'hélice $\alpha 4$ de l'autre monomère. La présence naturelle d'un résidu lysine au sein de ce motif chez certains RR-B (RR 14-21) aurait pu laisser entendre que ces RR n'auraient pas été capables de dimériser. Cependant il est à noter que la modification de ce résidu intervient sur les deux RR de la paire. On constate ainsi pour les RR14 et 21, la présence d'un résidu glutamate (E) juste avant l'hélice $\alpha 4$. La présence de ce résidu chargé négativement pourrait alors interagir avec le résidu lysine du motif PIRMK de cette paire, rendant alors possible la formation de l'homodimère. Ces résultats nous permettent ainsi d'établir que, malgré la différence de résidu retrouvée au sein du motif PIRIE des domaines DDK des différents RR-B, une homodimérisation reste possible sachant que les charges mises en jeu dans l'interaction ont été réparties différemment au sein des deux monomères dans l'interface de dimérisation. L'homodimérisation ayant été démontrée nécessaire pour l'activité transcriptionnelle de ces RR, nous pouvons supposer que la totalité des RR de peuplier pouvant homodimériser seront alors capables d'activité transcriptionnelle.

Ce premier résultat montrant la capacité d'homodimérisation des RR-B est donc un argument en faveur de leur fonctionnalité.

2- Déterminer la capacité d'hétérodimérisation des RR-B au sein d'une même paire

Plusieurs études ont déjà montré l'existence d'hétérodimères chez les protéines HK ainsi que chez les RR-B d'*Arabidopsis* (Dortay *et al.*, 2006 ; Caesar *et al.*, 2011).

Pour toutes les paires considérées, une hétérodimérisation a pu être observée et ce, avec les deux fusions réalisées. D'après les dilutions en cascade effectuées pour chaque combinaison, cette hétérodimérisation au sein d'une paire semble se produire avec la même affinité que les homodimérisations. L'hétérodimérisation entre les différentes paires a également été observée.

L'hétérodimérisation entre les membres d'une paire semble nécessiter la présence d'un motif identique entre les RR de la paire à l'exception des RR18 et 19 pour lesquels une divergence de résidu, respectivement une méthionine et une leucine, ne semble pas altérer la capacité de liaison de ces deux RR. En effet, ces deux acides aminés étant tous les deux des résidus hydrophobes, cette différence ne semble pas altérer les propriétés physico-chimique du motif et donc de la capacité d'interaction entre les deux RRs.

3- Déterminer la capacité de dimérisation des RR-B membres d'une même paire vis-à-vis des autres RR-B

On constate également la capacité d'hétérodimérisation entre les différentes paires de RR-B. Cependant, il est important de noter que les membres d'une paire peuvent conduire à des différences notables de profil d'interaction, comme on peut le constater pour le RR18 présentant un panel moins large de partenaires avec lesquels il interagit comparé au RR19.

Comme mentionné plus haut, il est à noter que la paire 18-19 ne présente pas le même motif au sein de l'hélice $\alpha 5$. Si cette modification n'altère en rien la formation d'un hétérodimère au sein de la paire 18-19 comme expliqué précédemment, la nature soufrée du résidu méthionine pourrait induire des modifications se répercutant au sein de la structure et pourrait entre autre être responsable de la différence de capacité d'interaction de ces deux RR vis-à-vis de la paire 13-13.

De même, le RR21 de la paire 14-21 présente lui aussi un panel moins large de RR interagissant avec lui comparé au RR14. En ce qui concerne cette paire, la seule différence observée se situe dans l'hélice $\alpha 3$. Une modélisation serait alors nécessaire afin de comprendre la différence de comportement de ces deux RR et de vérifier si cette simple différence pourrait être à l'origine de cette différence.

D'autre part, le RR22 a montré un profil d'interaction beaucoup plus ubiquitaire. En effet cette protéine est capable d'interactions avec l'ensemble des RR-B à l'exception de la paire RR12-13. Sur la base de la séquence de ce RR, possédant un degré de divergence d'acides aminés légèrement supérieure à celui constaté pour les autres RR-B, nous pouvons nous interroger sur un rôle particulier et spécifique du RR22 comparé aux autres RR.

4 - Absence de dimérisation entre les paires

De manière remarquable, nous avons mis en évidence que certaines paires n'étaient pas capables de dimériser entre elles. En effet, on a pu constater une absence totale d'interaction entre la paire RR 14-21 et les paires 18-19 (bien qu'observée avec le RR22 apparié à ces deux RR) et 12-13. Cette absence d'interaction pourrait être due à la présence d'un résidu lysine chez les paires concernées en début d'hélice $\alpha 4$ et absent de la séquence des RR14 et 21 à cette position. La présence

de ce résidu pour ces 4 RR pourrait peut-être perturber l'interaction avec la paire 14-21 qui possède un résidu K dans le motif PIRMK. La présence de ces résidus chargés positivement dans les deux monomères se faisant face pour l'interaction pourrait finalement les repousser empêchant ainsi la formation du dimère.

Les études menées chez les organismes procaryotes ont conduit à la mise en évidence que la duplication de gènes codant les histidines kinases (Ashenber *et al* 2011 ; Ashenber and Laub 2013) ou les RR bactériens aboutissaient à la mise en place de paires ayant des fonctions différentes mais ne favorisant que la formation d'homodimères (Capra and Laub, 2012).

Dans cette étude, nous avons montré la capacité d'hétérodimérisation entre les membres d'une même paire mais également entre les RR-B de paires différentes au contraire de ce que l'on peut constater chez les procaryotes. Chez les plantes, ce phénomène est connu puisque l'homo et hétérodimérisation de membres de différentes familles de facteurs de transcription ont été également démontrées. C'est le cas de facteurs de transcriptions tels que les protéines basic leucine ZIPper (**bZIP**), particulièrement étudiés, mais aussi tels que les WRKY (Xu *et al.*, 2006 ; Eulgem and Somssich 2007).

La duplication de gènes chez les plantes est un phénomène très répandu puisque 65% de gènes chez les plantes sont dupliqués (Panchy *et al.*, 2016). Parmi les gènes concernés, une grande proportion est impliquée dans la signalisation comme les kinases, les facteurs de transcription ou impliqués dans la réponse des plantes aux stress environnementaux (Panchy *et al.*, 2016). Cette duplication de gènes semblerait permettre la mise en place de partenaires différents entre paralogues et la mise en place de réponses alternatives (Panchy *et al.*, 2016).

Ainsi, en terme d'osmosensing, nous avons récemment isolé au sein du laboratoire un paralogue du gène HK1 précédemment isolé (et renommé depuis HK1a), et cette nouvelle protéine a été appelée HK1b. Une étude réalisée sur ce récepteur HK1b a conduit à la mise en évidence d'une divergence fonctionnelle en terme d'activité kinase et d'osmosensing de ce récepteur par rapport à son paralogue HK1a (Héricourt *et al.*, 2016, soumis). Ce travail conforte l'hypothèse que la duplication de gènes aboutit à la mise en place de paires dont les fonctions divergeraient.

Ainsi, cette capacité d'hétérodimérisation large des RR de peuplier et donc de plantes pourrait vraisemblablement participer à la mise en place de réponses plus efficaces aux contraintes environnementales.

En effet, parmi les rôles attribués à l'hétérodimérisation, se trouve la modulation différentielle de cibles géniques en fonction des dimères formés ou bien un rôle régulateur négatif d'un RR sur un autre par le biais de la dimérisation. Lors de la perception d'un stress, l'expression d'un RR réceptif à ce stress pourrait être stimulée et celui-ci serait alors capable d'intervenir par compétition avec la formation d'un homodimère. Cette inhibition par compétition pourrait alors privilégier la signalisation d'une voie, préférentiellement vis-à-vis d'une autre. Cette hypothèse est appuyée par une étude faite chez les WRKY, pour lesquels la redondance partielle de fonction de trois WRKY a été établie mais où la nature du dimère formé permet cependant une modulation de la cible génique ciblée (Xu *et al.*, 2006).

Dans la même optique et vis-à-vis de la complexité des différentes voies de signalisations existantes et possédant parfois des passerelles permettant une interconnexion, il pourrait être judicieux d'envisager une étude de partenariats des RR-B avec d'autres familles de facteurs de transcription, à l'instar de la démonstration de liaison de l'ARR18 avec les bZIP53 et 63 (Veerabagu *et al.*, 2014) ou bien de l'interaction de l'ARR2 avec TGA3, un autre facteur de transcription appartenant

également à la famille des bZIP (Choi *et al.*, 2010). Ainsi, ces liaisons seraient capables de moduler l'activité transcriptionnelle des complexes formés en intervenant par exemple pour le recrutement d'un autre RR ou bien agissant sur celui-ci pour en modifier les propriétés structurales.

Afin de relier le mécanisme de dimérisation avec l'idée générale d'une fonction de transmetteurs du signal des RR-B, il pourrait également être judicieux de pouvoir étudier la dimérisation des RR-B lors de la perception d'une contrainte osmotique ou bien leur capacité de liaison avec les RR-A ou les Pseudo-RR. En effet, chez le peuplier, les protéines **Secondary wall-associated NAC Domain 1 (SND1)** sont un exemple de modulation d'une voie par action directe d'un de ses acteurs *via* l'hétérodimérisation. Il a été montré qu'une forme alternativement épissée cytosolique d'une protéine SND1 était capable de transloquer dans le noyau et de former un hétérodimère avec chacune des formes complètes des protéines SND1, modulant ainsi la voie de signalisation visée (Li *et al.*, 2012).

Toutefois, afin de pouvoir statuer sans équivoque sur la capacité de dimérisation des RR-B, il nous apparaît primordial de valider les résultats obtenus par une autre technique. En effet, nous avons pu observer, au cours de notre analyse, des variations dans la capacité de dimérisation d'un même RR selon la fusion utilisée. A l'exception des RR14 ou 18, ainsi que du RR19 pour lequel une seule fusion était disponible, la capacité d'interaction s'est trouvée améliorée lors de la fusion au domaine GAL4. De plus, de nombreuses études montrent des variations de résultats lors de l'utilisation de techniques *in vitro* et *in vivo* (Cutcliffe *et al.*, 2011; Veerabagu *et al.*, 2012 ; Bertheau *et al.*, 2012). En effet, dans le cas de l'étude des capacités d'homo et hétéro-dimérisation des protéines **Cytokinin Response Factors (CRF)**, certaines interactions détectées par technique BiFC n'ont pu être obtenues par la technique double-hybride en levure (Cutcliffe *et al.*, 2011). Pour expliquer cette différence de résultat, nous pouvons formuler l'hypothèse que les fusions utilisées pourraient provoquer une déstabilisation de la structuration des protéines, par l'apport de séquences à encombrement différents ou bien encore par la nécessité de la présence de co-facteurs additionnels présents *in planta* mais pas en levure (Cutcliffe *et al.*, 2011).

Possédant un intérêt majeur pour la suite de notre étude, les capacités d'homodimérisation des RR18, 19 et 22 ainsi que les hétérodimérisations observées entre ces différents RR doivent être validées en priorité. De plus, certaines absences d'interaction observées permettent de présumer d'une certaine spécificité d'interaction des RR-B (Figure 39), telles que l'absence d'interaction possible entre la paire RR12-13 et le RR22 par exemple ou 18-19 vis-à-vis de la paire 14-21. Afin de valider ces absences d'interaction, ces tests doivent être reproduits *in planta*, par la technique de BiFC. A ce jour, la majorité des clonages moléculaires nécessaires ont été obtenus et les expérimentations seront réalisées prochainement, aboutissant à une valorisation par publication.

Malgré la démonstration de diverses capacités de dimérisation, la preuve d'une interaction effective des RR-B reste à démontrer. Une première piste peut nous être donnée en comparant l'expression génique des différents RR en fonction des organes, du développement ou en réponse à une contrainte osmotique. En effet, la présence simultanée des mêmes partenaires au sein du même tissu par exemple pour s'assurer de la réalité de cette interaction doit être validée. Cette interaction peut déjà être orientée par l'étude de la co-expression des transcrits des différents partenaires. En effet, les transcrits des RR15, 21 et 22 n'ont pas été détectés lors d'une précédente étude (Bertheau *et al.*, 2012), permettant d'émettre l'hypothèse que ces partenaires ne seront pas forcément impliqués dans la voie de signalisation au sein des différents organes étudiés.

En conclusion :

Nous avons ainsi au cours de ce travail répondu aux questions posées concernant les capacités de dimérisation de la totalité des RR-B de peuplier en mettant en évidence :

- La capacité d'homodimérisation de tous les RR-B de peuplier avec cependant deux interrogations pour les RR15 et 19. En effet, n'ayant pas obtenu le RR19 dans les deux configurations, nous n'avons pas encore de réponse pour ce RR. La construction étant obtenue à ce jour, les expériences devront être réalisées très prochainement. Concernant le RR15, la très faible capacité d'interaction observée pour ce RR questionne quant à sa capacité de fonctionnement sous sa forme homodimère. Cependant, cette faible interaction peut être compensée par une expression très forte *in planta* qui pourrait conduire à son activité de facteur de transcription. D'autre part, une interaction sous la forme d'hétérodimère peut également permettre l'implication de ce RR dans des voies de signalisation.
- La capacité d'hétérodimérisation des RR-B de peuplier au sein d'une même paire et entre les membres des différentes paires. . Ces capacités peuvent ainsi conduire la plante à une meilleure adaptation aux *stimuli* environnementaux.
- L'absence de dimérisation entre certaines paires de RR-B, qui vient conforter l'hypothèse d'une spécificité de ces RR dans des voies de signalisation.

Ce dernier résultat vient appuyer l'idée que seulement certains les RR-B pourraient intervenir dans la voie de signalisation liée à la sécheresse. Ainsi, notre hypothèse que les RR18, 19 et 22 seraient impliqués dans cette voie est corroborée à la fois par la bibliographie (Veerabagu *et al.*, 2014) mais également par le biais de nos résultats.

Un des challenges à relever sera de déterminer le rôle de ces processus d'hétérodimérisation ou d'absence de dimérisation dans les spécificités de voies de signalisation dont en particulier celle de l'osmosensing.

Chapitre 2 : étude de la fonctionnalité des RR-B par des approches biologiques

Section I - Etude de la capacité d'activation de la transcription de promoteurs cibles par les RR13, 18, 19 et 22

I.1. Introduction

Par une méthode de *trans*-activation sur des suspensions cellulaires de pervenche de Madagascar [Ginis et collaborateurs](#) ont pu démontrer en 2012 que le RR5 de cette espèce, RR-B homologue du RR13 de peuplier, était capable de réguler *via* sa fixation à des motifs de type 5'-(A/G)GAT(T/C)-3', le promoteur du gène HDS impliqué dans la voie de biosynthèse des vinca-alcaloïdes, en réponse aux cytokinines. Les expériences ayant été menées sur des suspensions cellulaires (C20D) sensibles aux hormones telles que les cytokinines, nous avons établi une collaboration avec l'équipe BBV de Tours pour mener à bien notre travail. En effet, ne disposant ni de suspensions cellulaires de peuplier ni de méthode de transformation efficace compatibles avec l'approche de *trans*-activation, nous nous sommes orientés vers l'utilisation de système d'étude de la *trans*-activation en systèmes hétérologues.

Le promoteur de l'*ARR6* a été isolé chez *Arabidopsis* et différents travaux ont permis de montrer que l'*ARR2*, homologue fonctionnel chez *Arabidopsis* du RR13, était capable de réguler ce promoteur, et ce, en réponse aux cytokinines ([Kim et al., 2006](#)). Une analyse de la séquence de ce promoteur a en effet permis de mettre en évidence la présence de séquences consensus de type 5'-(A/G)GAT(T/C)-3' ([Taniguchi et al., 2007](#) ; [Ramireddy et al., 2013](#)). L'utilisation dans notre travail de ce système très bien connu nous permet d'avoir un contrôle dans les expériences de *trans*-activation.

Le promoteur de *HK1a* a été caractérisé au cours de cette thèse et fait également l'objet de cette étude. En effet, ce gène est régulé dès 5 min de stress par application de PEG₆₀₀₀ dans le milieu de culture ([Chefdor et al., 2006](#) ; Thèse [L. Bertheau, 2013](#)) et semble donc impliqué dans la voie osmosensing.

Afin de déterminer la capacité d'interaction et de *trans*-activation des RR-B sur des promoteurs cibles, nous avons réalisé tout d'abord des fusions transcriptionnelles du promoteur des deux gènes *ARR6* et *HK1a* avec le gène rapporteur *GUS*.

Les constructions permettant les fusions transcriptionnelles et la surexpression des facteurs de transcription ont été ensuite introduites de manière transitoire dans la lignée cellulaire C20D de pervenche de Madagascar (*C. roseus*).

En 2014, [Nassuth et collaborateurs](#) publient la mise au point d'un nouveau système d'étude de la capacité transactivatrice de gènes après agroinfiltration de feuilles de tabac. Ces résultats nous ont particulièrement intéressés car nous y avons vu une opportunité d'une part, de pouvoir adapter le système sur des feuilles de peuplier et utiliser plus facilement cette méthode dans notre laboratoire.

Les facteurs de transcription que nous souhaitons étudier ont donc été clonés dans les vecteurs de surexpression et de fusions transcriptionnelles permettant l'étude dans des feuilles de tabac (*N. benthamiana*).

I.2. Contexte de l'étude et objectifs

La collaboration avec le laboratoire BBV de Tours avait permis d'établir, lors d'expériences préliminaires réalisées sur les suspensions cellulaires de *C. roseus*, que le RR13 et l'*ARR2* étaient capables de réguler l'activité du promoteur de l'*ARR6*. En effet, dans des cellules cultivées sans

cytokinines (conditions contrôles), le niveau d'activité du promoteur de l'ARR6 était augmenté significativement lorsque chaque RR-B était surexprimé. (Thèse L. Bertheau, 2013).

A l'inverse, le niveau d'activité du promoteur de l'ARR6 n'est pas modifié par la surexpression de RR18 dans ces mêmes conditions (Figure 40).

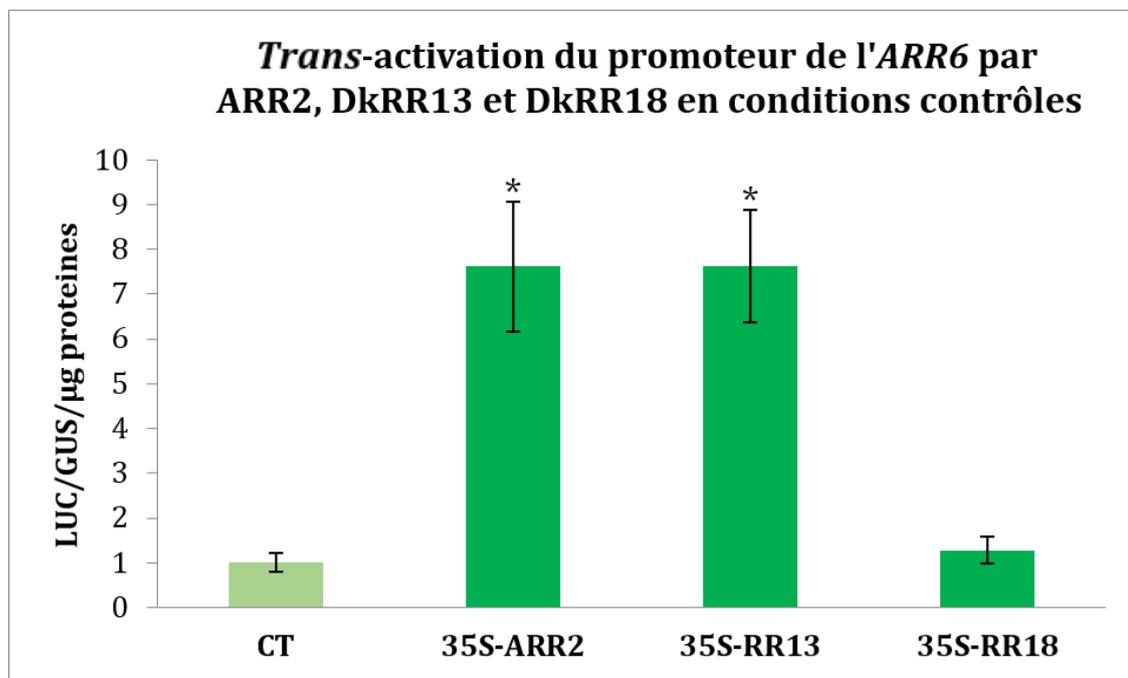


Figure 40 : effet de la surexpression des protéines ARR2 d'Arabidopsis, RR13 et RR18 de peuplier sur le niveau d'expression du gène rapporteur luciférase sous le contrôle du promoteur de l'ARR6 dans les cellules de *C. roseus* en conditions contrôles.

Les cellules ont été co-transformées avec le vecteur permettant la fusion transcriptionnelle du promoteur de l'ARR6 avec le gène rapporteur luciférase (LUC), associé au vecteur de normalisation de l'efficacité de la transformation contenant le promoteur constitutivement exprimé de l'ubiquitine associé au gène rapporteur de la β -glucuronidase (pUBI-GUS) ainsi qu'un vecteur de surexpression contenant le promoteur constitutif 35S, soit vide (CT) ou contenant l'ADNc codant pour chaque RR-B (35S-ARR2, 35S-RR13 ou 35S-RR18). Les cellules ont été cultivées sur un milieu en absence de 2,4D (conditions contrôles). L'activité LUC de chaque événement de transformation est normalisée par l'activité GUS puis rapportée à la quantité de protéines exprimée dans chaque cellule transformée. Le ratio d'activité GUS/LUC/quantité de protéines moyen obtenu à partir des cellules co-transformées ainsi que l'écart-type de chaque condition sont calculés pour $n=5$ (n : nombre d'événements de transformation transitoire réalisés pour chaque condition). Le vecteur vide est choisi comme référence pour comparaison avec toutes les conditions et un test t est réalisé. Les valeurs portant un astérisque sont significativement différentes de la condition témoin au seuil de $P<0,05$. Figure complétée d'après la thèse de L. Bertheau, 2013.

Ces résultats corroborent la capacité de fixation du RR13 de peuplier au motif 5'(A/G)GAT(T/C)3', résultat précédemment obtenu *in vitro* via la technique EMSA (Thèse L. Bertheau, 2013), ainsi que son implication dans la voie cytokinique comme montrée par Ramírez-Carvajal et collaborateur en 2009.

Par contre, en ce qui concerne le RR18, ces premiers résultats révèlent qu'il n'est pas capable de réguler l'activité du promoteur de l'ARR6 dans les conditions testées. Deux hypothèses peuvent être posées :

- Le RR18 ne serait tout simplement pas capable de se fixer au motif de type 5'-(A/G)GAT(T/C)-3', et ne serait donc pas impliqué dans la réponse aux cytokinines. Cette hypothèse n'est cependant pas favorisée par la littérature puisque dans le cas de l'homologue de ce RR chez *Arabidopsis*, une implication dans la réponse à cette phytohormone a pu être démontrée

(Veerabagu *et al.*, 2012). Il se pourrait toutefois qu'en raison de la divergence pouvant exister entre les plantes herbacées et ligneuses, le rôle de ce RR ait été modifié chez le peuplier par rapport à *Arabidopsis*.

- Les conditions testées ne permettent pas la fixation de ce RR-B et un stimulus ou la présence de co-facteurs pourraient par exemple être nécessaires.

De ce fait, l'étude de ce RR nécessite de trouver un promoteur cible en rapport avec l'un de ses rôles suspectés, soit un promoteur de gènes de réponse à la sécheresse.

Les objectifs que nous nous sommes fixés au cours de cette thèse visaient à déterminer la fonctionnalité biologique des RR18, 19 et 22 au travers de la caractérisation de leur activité transcriptionnelle d'un part en condition témoin et d'autre part en condition de stress.

Au vu des résultats préliminaires que nous avons pu obtenir par le système de *trans*-activation dans les cellules de *C. roseus*, l'apport d'optimisations était nécessaire afin de démontrer dans un premier temps que l'activité transcriptionnelle du RR13 était bien stimulée par apport de cytokinine comme escompté en raison de l'homologie fonctionnelle entre RR13 et ARR2.

Le rôle du RR13 dans la signalisation cytokinique étant bien documentée, la réalisation de telles expériences nous permettait de mettre au point les conditions expérimentales, étape nécessaire pour pouvoir, dans un deuxième temps, étendre nos études aux autres RR et en particulier aux RR18, 19 et 22.

Notre second objectif était d'étudier la régulation de deux gènes potentiellement impliqués dans la voie osmosensing, *HK1a* et *RR18*, par les RR13, 18, 19 et 22, et d'aborder l'impact d'un stress osmotique sur l'activité de ces gènes.

Ce dernier objectif, permettrait ainsi de déterminer si le gène *HK1a* pourrait faire l'objet d'un rétrocontrôle positif *via* les RR-B qu'il pouvait lui-même activer.

I.3. Résultats

I.3.a - Régulation de l'activité des promoteurs de *HK1a* et de l'*ARR6* par 3 RR-B de peuplier dans les cellules de *C. roseus*

Les résultats précédemment obtenus (Thèse L. Bertheau, 2013) ayant montré la capacité de *trans*-activation du RR13 sur le promoteur d'un gène impliqué dans la signalisation des CK, nous avons réalisé la fusion transcriptionnelle du promoteur *HK1a* isolé lors de ce travail de thèse (Partie I, chapitre 2) avec le gène rapporteur LUC. Les cellules de *C. roseus* ont alors été co-transformées de manière transitoire avec cette construction et le vecteur permettant la surexpression du RR13, puis cultivées sur un milieu sans hormone 2,4D et récoltées 24 h après la transformation pour des mesures d'expression transitoire par fluorimétrie et par luminométrie (Figure 41).

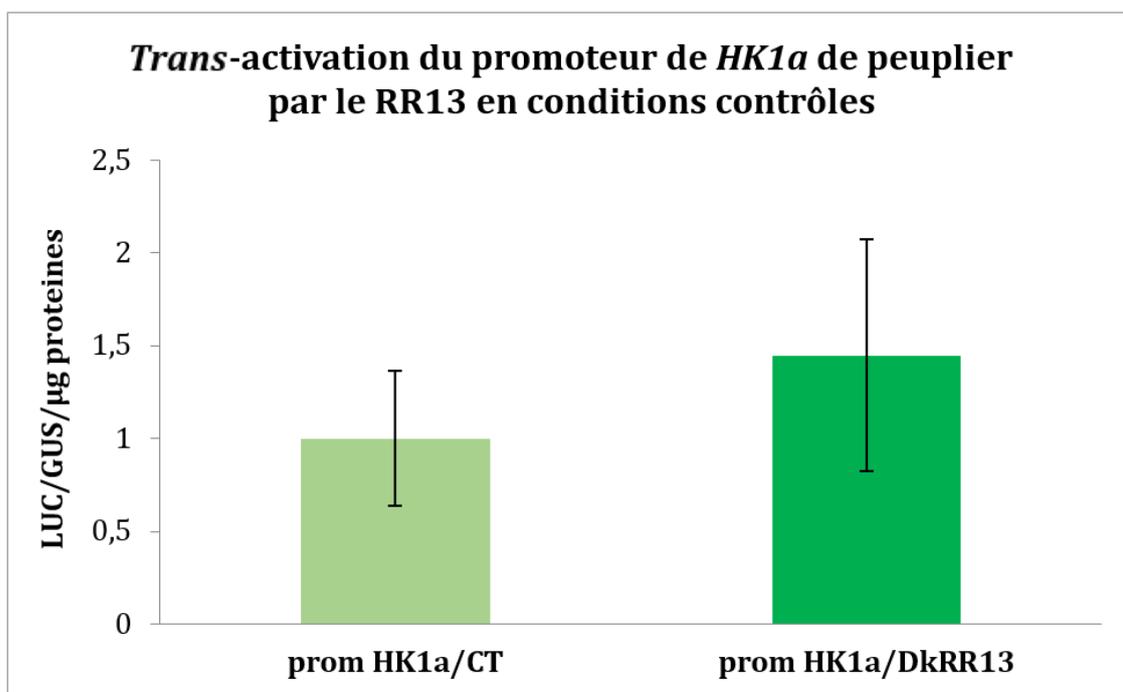
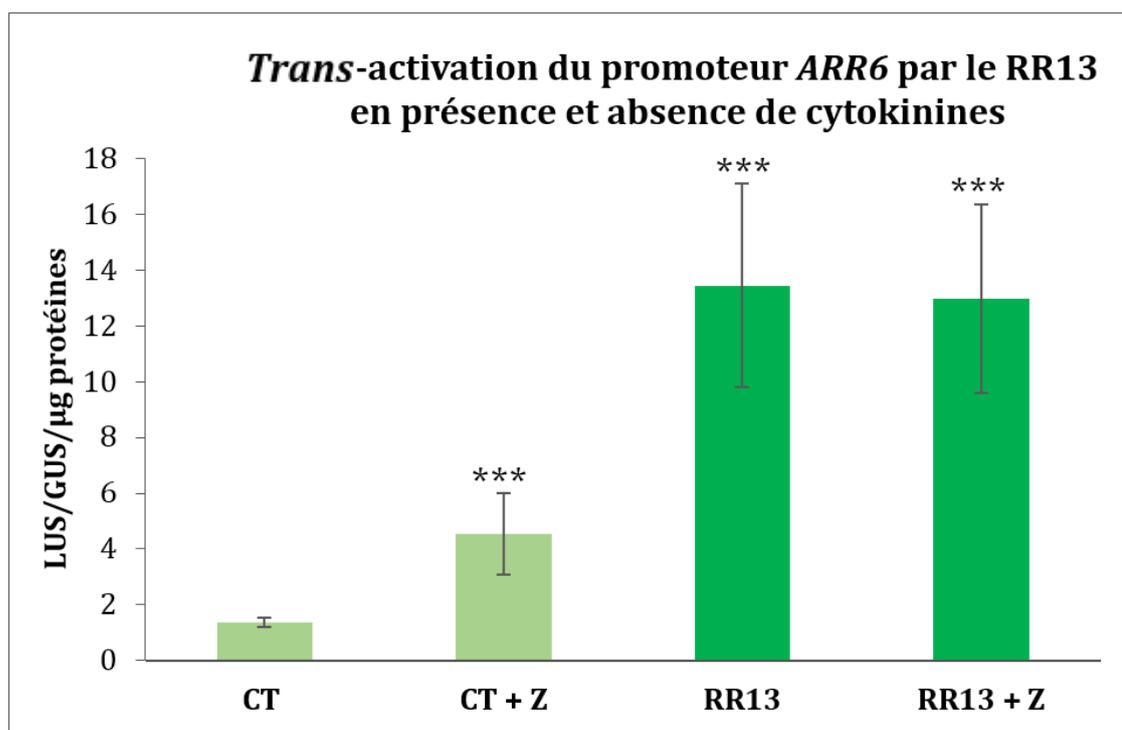


Figure 41 : effet de RR13 sur le niveau d'expression du gène rapporteur sous le contrôle du promoteur de *HK1a* dans les cellules de *C. roseus* co-transformées transitoirement.

La transformation a été effectuée avec le vecteur permettant la fusion transcriptionnelle du promoteur de *HK1a* avec le gène rapporteur *LUC* (*promHK1a*), associé au vecteur de normalisation de l'efficacité de la transformation contenant le promoteur constitutivement exprimé de l'ubiquitine associé au gène rapporteur de la β -glucuronidase (*pUBI-GUS*) ainsi qu'un vecteur de surexpression ($1\mu\text{g}$) vide (*CT*) ou contenant l'ADNc codant le RR13 (*DkRR13*). Les cellules ont été cultivées sur un milieu sans 2.4D (conditions contrôles). L'activité *LUC* de chaque événement de transformation est normalisée par l'activité *GUS* puis rapportée à la quantité de protéines exprimée dans chaque cellule transformée. Le ratio d'activité *GUS/LUC*/quantité de protéines moyen obtenu à partir des cellules co-transformées ainsi que l'écart-type de chaque condition sont calculés pour $n=5$ (n : nombre d'événements de transformation transitoire réalisés pour chaque condition). Le vecteur vide est choisi comme référence pour comparaison avec toutes les conditions et un test *t* est réalisé.

L'analyse des résultats obtenus dans la figure 41 montre que l'activité du promoteur de *HK1a* n'est pas affectée de manière significative par la surexpression du RR13. Dans nos conditions expérimentales, il semblerait que le gène *HK1a* ne soit pas régulé par le RR13.

Dans l'objectif d'analyser dans un modèle contrôle l'impact des cytokinines sur les capacités transactionnelles du RR13, les cellules de *C. roseus* ont été co-transformées avec le vecteur permettant la fusion transcriptionnelle du promoteur de l'*ARR6* et le vecteur de surexpression du RR13. Les cellules ont été cultivées sur un milieu sans 2.4D supplémenté ou non en cytokinine (zéatine) puis récoltées 24 h après la transformation pour des mesures d'expression transitoire par fluorimétrie et par luminométrie.



*Figure 42 : effet du RR13 de peuplier sur le niveau d'expression du gène rapporteur sous le contrôle du promoteur de l'ARR6 dans les cellules de *C. roseus* co-transformées transitoirement en présence ou non de cytokinines.*

La transformation a été effectuée avec le vecteur permettant la fusion transcriptionnelle du promoteur de l'ARR6 avec le gène rapporteur LUC, associé au vecteur de normalisation de l'efficacité de la transformation contenant le promoteur constitutivement exprimé de l'ubiquitine associé au gène rapporteur de la β -glucuronidase (pUBI-GUS) ainsi qu'un vecteur de surexpression (1 μ g) vide (CT) ou contenant l'ADNc codant le RR13 (RR13). Les cellules ont été cultivées sur un milieu sans 2.4D en présence (+Z) ou absence d'une cytokinine, la zéatine. L'activité LUC de chaque évènement de transformation est normalisée par l'activité GUS puis rapportée à la quantité de protéines exprimée dans chaque cellule transformée. Le ratio d'activité GUS/LUC/quantité de protéines moyen obtenu à partir des cellules co-transformées ainsi que l'écart-type de chaque condition sont calculés pour n=5 (n : nombre d'évènements de transformation transitoire réalisés pour chaque condition). Le vecteur vide est choisi comme référence pour comparaison avec toutes les conditions et un test t est réalisé. Les valeurs portant trois astérisque sont significativement différentes au seuil de $P < 0,001$.

Les résultats présentés en figure 42 révèlent que l'activité du promoteur de l'ARR6 est augmentée en présence de CK dans la condition contrôle, cette observation pouvant être due aux RR internes aux cellules.

De plus, l'activité de ce promoteur est augmentée d'environ 7 fois lorsque le RR13 est surexprimé par rapport au témoin.

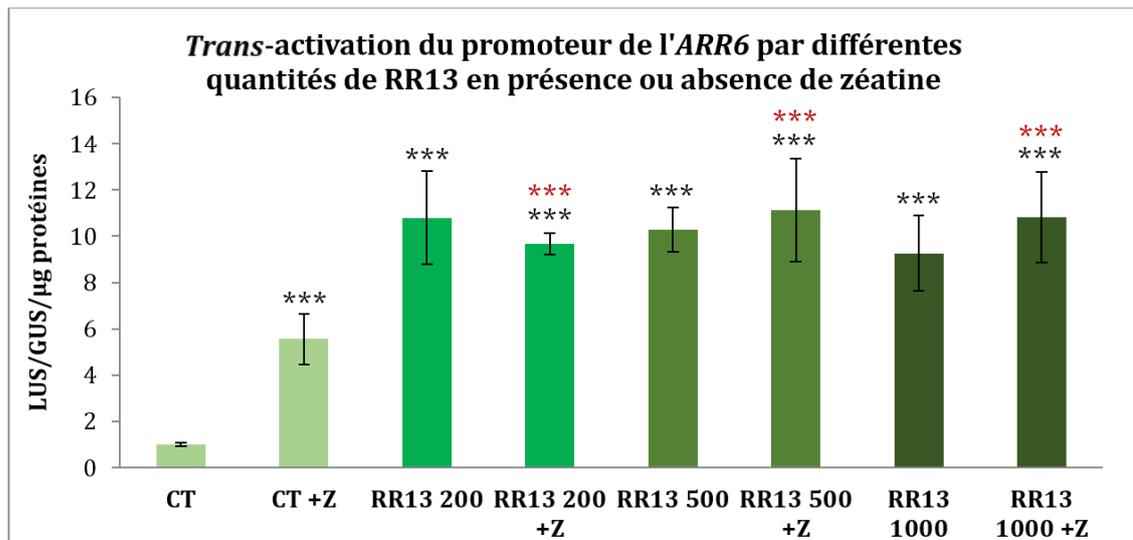
Toutefois, en présence de RR13 surexprimé, l'ajout de cytokinine ne modifie pas le niveau d'activité du promoteur par rapport à la condition sans apport de zéatine.

L'ensemble de ces résultats suggère que dans notre système cellulaire :

- soit la présence de cytokinine n'affecte pas la capacité de *trans*-activation de RR13, un résultat surprenant puisque la littérature rapporte que deux homologues de ce RR-B, CrRR5 chez *C. roseus* et l'ARR2 chez *Arabidopsis* ont un effet plus important en présence de cytokinines (Ginis *et al.*, 2012 ; Hwang et Sheen 2001),

- soit l'activité du promoteur de l'ARR6 a atteint un seuil. Cette activité « seuil » pourrait être due à nos conditions expérimentales et en particulier à une trop grande production de RR13 qui saturerait le promoteur et provoquerait une activité maximale, empêchant de détecter toute induction supplémentaire.

Pour tester cette hypothèse, nous avons réalisé des expériences de co-transformations transitoires en bombardant les cellules de *C. roseus* cultivées en absence ou présence de cytokinines avec une quantité croissante de vecteur de surexpression de RR13 (de 200 ng à 1 µg, cette dernière quantité étant celle utilisée jusqu'à présent) (*Figure 43*).



*Figure 43 : effet de la co-transformation transitoire dans les cellules de *C. roseus* cultivées en absence ou présence de cytokinines, de différentes quantités de vecteur de surexpression du RR13 de peuplier sur le niveau d'expression du gène rapporteur sous le contrôle du promoteur ARR6.*

La transformation a été effectuée avec le vecteur permettant la fusion transcriptionnelle du promoteur de l'ARR6 avec le gène rapporteur LUC, associé au vecteur de normalisation de l'efficacité de la transformation contenant le promoteur constitutivement exprimé de l'ubiquitine associé au gène rapporteur de la β -glucuronidase (pUBI-GUS) ainsi qu'un vecteur de surexpression (1 µg) vide (CT) ou contenant l'ADNc codant le RR13 à différentes concentrations (RR13 200 à RR13 1000 ng). Les cellules ont été cultivées sur un milieu sans 2.4D en présence (+Z) ou absence d'une cytokinine, la zéatine. L'activité LUC de chaque événement de transformation est normalisée par l'activité GUS puis rapportée à la quantité de protéines exprimée dans chaque cellule transformée. Le ratio d'activité GUS/LUC/quantité de protéines moyen obtenu à partir des cellules co-transformées ainsi que l'écart-type de chaque condition sont calculés pour $n=5$ (n : nombre d'événements de transformation transitoire réalisés pour chaque condition). Le niveau obtenu pour le vecteur vide en absence de zéatine est choisi comme référence pour comparaison avec toutes les conditions et un premier test t est réalisé. Chaque condition en absence de zéatine est comparée à la même condition en présence de zéatine et un test t est également réalisé. Enfin le niveau d'expression moyen obtenu avec le vecteur vide en présence de zéatine est comparé au niveau d'expression de chaque condition en présence de zéatine. Les valeurs portant des astérisques noirs sont significativement différentes du contrôle CT sans zéatine au seuil de $P<0,001$, les valeurs portant des astérisques rouges sont significativement différentes du contrôle en présence de CK au seuil de $P<0,001$.

Les résultats présentés dans la figure 43 montrent que quelque soient les concentrations que nous avons testées pour le RR13, l'activité du promoteur de l'ARR6 en présence du RR13 surexprimé n'est toujours pas modifiée lorsque des cytokinines sont ajoutées au milieu de culture des cellules.

Ainsi, nous pouvions penser que soit la quantité de facteur de transcription était toujours en excès, soit ces résultats reflétaient un autre problème lié à la cinétique d'application de la zéatine. Au

cours de nos expériences précédentes, les cytokinines ont toujours été appliquées 24 h avant les transformations soit 48 h avant récolte.

Nous avons alors co-transformé les cellules de *C. roseus* avec le vecteur permettant la fusion transcriptionnelle du promoteur de l'ARR6 avec seulement 100 ng de vecteur permettant la surexpression de l'ARR2 et 24 h d'application de la zéatine (*Figure 44*).

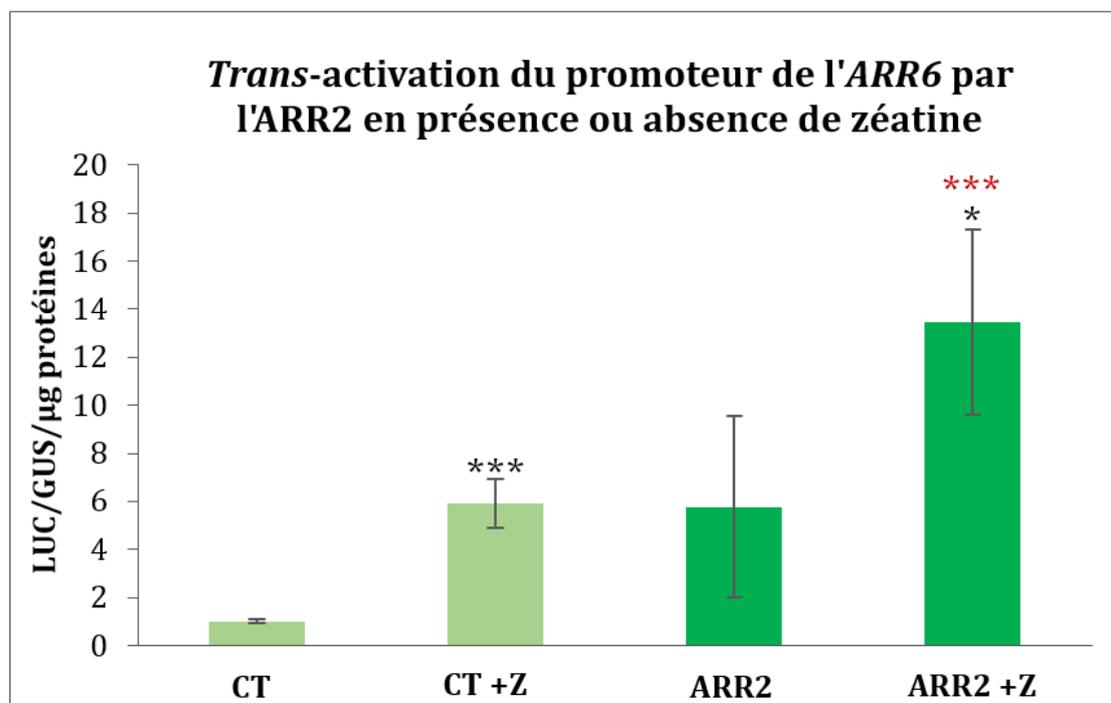


Figure 44 : analyse de la capacité de trans-activation du système contrôle ARR2/promoteur ARR6 comparée aux témoins respectifs en absence et en présence de cytokinines.

La transformation a été effectuée avec le vecteur permettant la fusion transcriptionnelle du promoteur de l'ARR6 avec le gène rapporteur LUC, associé au vecteur de normalisation de l'efficacité de la transformation contenant le promoteur constitutivement exprimé de l'ubiquitine associé au gène rapporteur de la β -glucuronidase (pUBI-GUS) ainsi qu'un vecteur de surexpression (100 ng) vide (CT) ou contenant l'ADNc codant l'ARR2. Les cellules ont été cultivées sur un milieu sans 2.4D en présence (+Z) ou absence d'une cytokinine, la zéatine. L'activité LUC de chaque événement de transformation est normalisée par l'activité GUS puis rapportée à la quantité de protéines exprimée dans chaque cellule transformée. Le ratio d'activité GUS/LUC/quantité de protéines moyen obtenu à partir des cellules co-transformées ainsi que l'écart-type de chaque condition sont calculés pour $n=5$ (n : nombre d'événements de transformation transitoire réalisés pour chaque condition). Le niveau obtenu pour le vecteur vide en absence de zéatine est choisi comme référence pour comparaison avec toutes les conditions et un premier test t est réalisé. Chaque condition en absence de zéatine est comparée à la même condition en présence de zéatine et un test t est également réalisé. Enfin le niveau d'expression moyen obtenu avec le vecteur vide en présence de zéatine est comparé au niveau d'expression de chaque condition en présence de zéatine. Les valeurs portant des astérisques noirs sont significativement différentes du contrôle de chaque condition sans zéatine au seuil de $P<0,001$ pour *** et au seuil de $P<0,01$ pour *, les valeurs portant des astérisques rouges sont significativement différentes du contrôle en présence de CK au seuil de $P<0,001$.

Les données fluorimétriques révèlent que l'activité du promoteur de l'ARR6 est augmentée d'un facteur 2 en présence de la surexpression de l'ARR2 en réponse aux cytokinines, comme attendu et validant nos nouvelles conditions expérimentales.

Contrairement à ce qui avait été obtenu en résultat préliminaire de notre étude (*Figure 40 du contexte de l'étude*), aucune différence significative d'activation du gène rapporteur n'a pu être

détectée entre la condition plasmide vide et la condition ARR2. Cette absence de significativité peut être imputable à la diminution notable de quantité de plasmide effecteur utilisée dans cette expérience par rapport à la première (100 ng au lieu de 1 µg). Ce résultat pourrait en effet laisser penser que nos conditions initiales devaient être proches d'un état saturant. Cependant, la non-significativité de ces résultats repose sur la grande variabilité des mesures effectuées reflétées par l'importance de la représentation graphique de l'écart type.

En conclusion, nous pouvons établir que :

- Nous avons confirmé la capacité de *trans*-activation du RR13
- Nos conditions expérimentales pour réaliser les tests de *trans*-activation utilisées jusque-là n'étaient probablement pas optimales puisque nous avons pu montrer une saturation du système et un temps d'application des cytokines trop long. En conséquence nous avons trouvé les conditions optimales pour continuer notre étude.

Forts de nos résultats, nous avons envisagé la poursuite de nos expériences, cependant nous avons été confrontés à un problème majeur inhérent au matériel végétal. En effet, l'étape de transformation par biolistique est une étape indispensable et cruciale conditionnant le reste de l'expérience. Cette étape nécessite d'obtenir un tapis cellulaire fin et homogène. Or, il s'avère qu'au moment de notre étude et pendant environ un an, les suspensions cellulaires C20D utilisées se sont altérées et présentaient une croissance totalement hétérogène. Les tapis cellulaires étaient inexploitable pour des expériences de biolistique, les données obtenues étant d'une forte variabilité.

De plus, le système de normalisation de cette technique comportait le biais connu de tous, où l'on suppose que l'étape de transformation permette d'introduire les trois plasmides dans la cellule en quantité égale. Or ce fait n'est absolument pas garanti.

Nous nous sommes focalisés sur la mise en place et l'exploitation d'un autre système végétal et d'un autre système d'étude de la capacité de *trans*-activation des facteurs de transcription effectué, par le biais de la transformation transitoire de feuilles de tabac par agro-infiltration récemment publié (Nassuth *et al.*, 2014) Dans le cas de cette nouvelle méthode, l'intégration de chaque plasmide peut être vérifiée puisque chaque plasmide contient un gène propre de normalisation et permet donc de s'affranchir du biais précédent. Les résultats de cette approche sont présentés dans le paragraphe ci-dessous.

1.3.b - Régulation de l'activité des promoteurs de *HK1a* et *RR18* par les RR -B dans les cellules de *N. benthamiana*

La formation à cette technique et son utilisation ont été l'occasion d'un séjour d'un mois dans le laboratoire du département de Biologie Moléculaire et Cellulaire de l'Université de Guelph au Canada, sous la supervision du professeur Nassuth. Lors de ce séjour, la technique a préalablement été réalisée dans les conditions contrôles (Nassuth *et al.*, 2014) puis les tests sur les deux promoteurs construits *HK1a* et *RR18* ont été effectués.

La technique mise au point est réalisée sur des feuilles de plants de tabac. La transformation transitoire est réalisée par agroinfiltration permettant l'intégration de deux plasmides, appelés par la suite plasmide effecteur et rapporteur, obtenus chacun par modification du plasmide pCAMBIA 1305.1 (*Figure 45*).

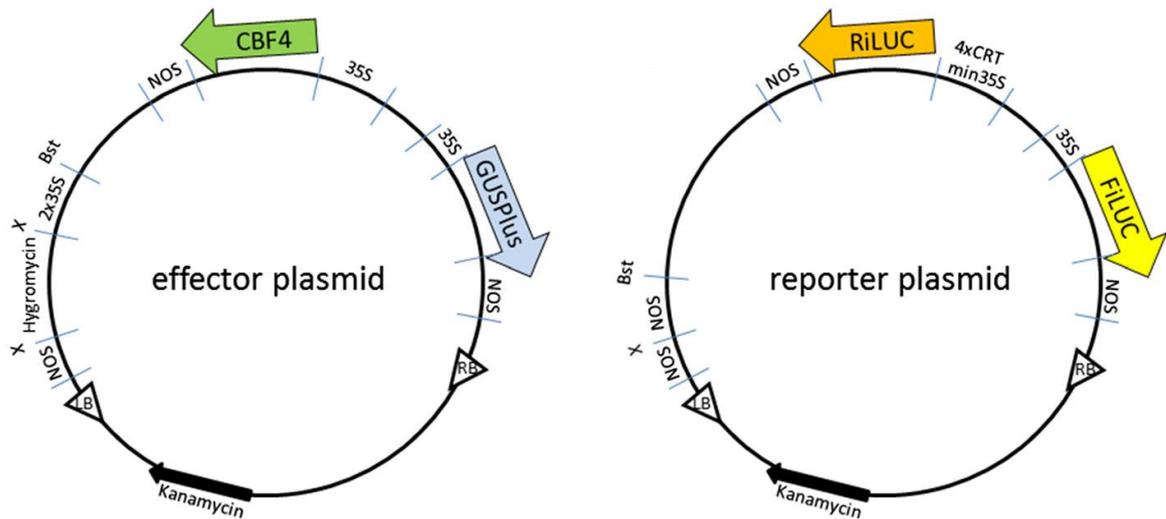


Figure 45 : cartographie des vecteurs utilisés pour l'étude de la capacité de trans-activation des facteurs de transcription CBF1 et CBF4 sur la sonde synthétique M2.

Cette sonde correspond à 4 répétitions du motif CRT (4xCRT) et est associée à un promoteur 35S de structure minimale ainsi que le terminateur de la nopaline synthase (NOS). Cette construction est clonée au sein du plasmide rapporteur, en amont du gène rapporteur RiLUC permettant d'évaluer l'activité promotrice provoquée par le facteur de transcription. L'expression du facteur de transcription est sous dépendance d'un promoteur constitutif fort 35S et d'un terminateur NOS et est cloné au sein du plasmide effecteur comprenant le gène de normalisation. Ces plasmides contiennent le gène de sélection bactérien kanamycine et les gènes FiLUC et GUSPlus permettant respectivement de quantifier la présence du plasmide rapporteur et effecteur. Figure extraite de Nassuth *et al.*, 2014.

Afin d'utiliser cette technique pour répondre à notre problématique de caractérisation des RR18, 19 et 22 vis-à-vis de cibles moléculaires promotrices définies ainsi que la finalisation de l'étude de la capacité de fixation du RR13 précédemment entreprise, les différentes constructions des plasmides effecteurs de cette nouvelle technique contenant les RR13, 18, 19 et 22 ont été réalisées.

Sur la base de la réactivité du RR18 à l'apparition d'une contrainte osmotique et de par son implication dans les réponses à ce phénomène (Bertheau *et al.*, 2015 ; Veerabagu *et al.*, 2012), la capacité d'action des RR 13, 18, 19 et 22 vis-à-vis du promoteur de ce RR-B a été testé.

Ainsi, les promoteurs de *HK1a* et du *RR18* ont été clonés dans le plasmide rapporteur afin de former une fusion transcriptionnelle entre ces promoteurs et le gène rapporteur RiLUC et les RR-B précédemment évoqués ont été clonés dans le plasmide effecteur qui permet leur surexpression. Le contrôle positif utilisé lors des expériences correspond à l'interaction du couple **C-repeat Binding Factor (CBF)/CRT**, dans lequel le CBF est le facteur de transcription reconnaissant un site appelé **CRT**.

Les constructions plasmidiques ont chacune été intégrées dans la souche d'*Agrobacterium* EHA105 puis les cultures de chaque souche bactérienne pour chacun des partenaires à tester ont été réalisées. Les feuilles de trois plants de tabac ont été infiltrées par un mélange contenant les suspensions bactériennes de chaque combinaison effecteur/rapporteur. Les plants ont été laissés en culture pendant 2 jours puis 4 échantillons provenant des feuilles de tabac transformées ont été récoltés pour des mesures d'expression transitoire par fluorimétrie et par luminométrie.

Dans un premier temps, nous avons validé le contrôle positif du système, CBF/4xCRT (Nassuth *et al.*, 2014) et en parallèle, vérifié s'il existait ou non une interaction de nos facteurs de transcription avec le motif 4xCRT. Les résultats obtenus sont présentés en figure 46 ci-dessous.

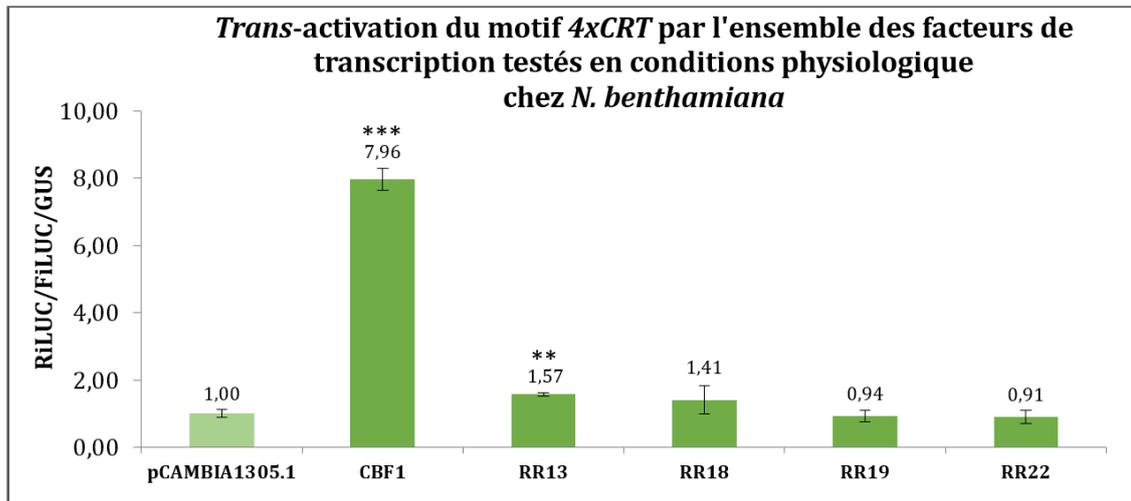


Figure 46 : analyse de la capacité de trans-activation de l'ensemble des protéines sur la sonde M2 (4xCRT) comparée aux témoins négatif et positif.

Dans cette expérience, l'ensemble des plasmides effecteurs contrôles et tests ont été mis un à un en présence du plasmide rapporteur contenant la sonde M2 4xCRT fusionnée au gène rapporteur RiLUC. PCAMBIA 1305.1 correspond au plasmide effecteur vide et CBF1 au contrôle positif. Les deux plasmides contiennent chacun un gène distinct de normalisation, GUSPlus pour le plasmide effecteur et FiLUC pour le plasmide rapporteur. Chaque condition a été effectuée en triplicat et la moyenne ainsi que l'erreur standard de chaque condition ont été calculées. Les résultats ont été normalisés par rapport à la moyenne de la condition contrôle négatif et sont représentées par les valeurs situées au-dessus de chaque condition. La significativité des différences observées entre chaque condition et la condition témoin est déterminée par usage d'un test de Student. *** $P \leq 0,001$; ** $P \leq 0,01$.

L'analyse de la figure 46 révèle que lors de cette expérience, l'expression du gène rapporteur RiLUC est 8 fois plus importante lorsque CBF1 est surexprimée dans les feuilles que dans les conditions contrôles (vecteur vide) confirmant la fixation de CBF1 sur le motif 4xCRT dans les mêmes proportions relatives que ce qui est observé dans la bibliographie (Nassuth *et al.*, 2014) et permettant de déterminer que le système est fonctionnel.

Une augmentation de l'expression du gène RiLUC est aussi observée en présence du RR13, suggérant que ce RR serait capable de reconnaître partiellement le motif 4xCRT (TGCCGACATTGCCGACATTGCCGACATTGCCGACAT).

Dans les feuilles surexprimant les autres RR, l'expression du gène rapporteur n'est significativement pas différente comparée aux feuilles transformées avec un vecteur vide.

Il semblerait donc qu'à l'exception du RR13, les RR18, 19 et 22 ne se fixent pas au motif 4xCRT.

Nous avons alors procédé à des expériences de *trans*-activation en utilisant le promoteur de *HK1a*. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 47 ci-dessous.

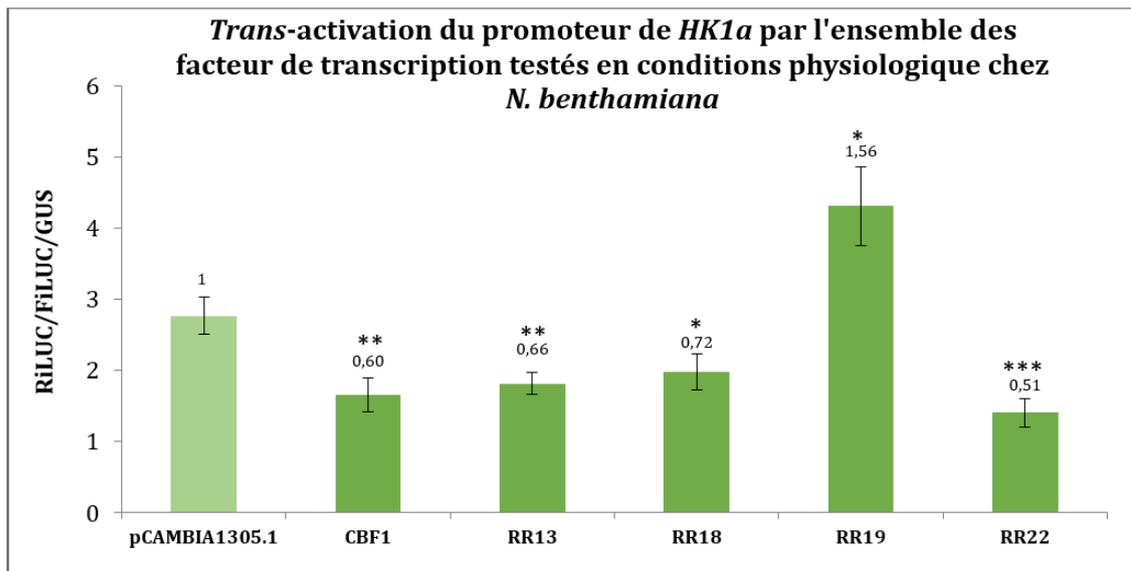


Figure 47 : analyse de la capacité de trans-activation de l'ensemble des protéines sur le promoteur de *HK1a*.

Dans cette expérience, l'ensemble des plasmides effecteurs contrôles et tests ont été mis un à un en présence du plasmide effecteur contenant le promoteur de *HK1a*. PCAMBIA 1305.1 correspond au plasmide effecteur vide. Chaque condition a été effectuée en tripliquat et la moyenne ainsi que l'erreur standard de chaque condition ont été calculées. Les résultats ont été normalisés par rapport à la moyenne de la condition contrôle négatif et sont représentés par les valeurs situées au-dessus de chaque condition. La significativité des différences observées entre chaque condition et la condition témoin est déterminée par usage d'un test de Student. *** $P \leq 0,01$; ** $0,01 < P \leq 0,05$; * $0,05 < P \leq 0,1$.

Après analyse des données fluorimétriques et luminométriques, il semblerait que la surexpression de RR 13, 18, et 22 diminue l'expression du gène RiLUC sous le contrôle du promoteur *HK1a* comparée aux données obtenues avec un vecteur vide. Ainsi, ces RR-B ne sembleraient pas reconnaître de séquences fixatrices sur le promoteur de *HK1a* et ne participerait pas à l'activation de ce gène. Toutefois, cette diminution est aussi observée avec la surexpression du contrôle CBF1, suggérant un problème survenu lors de l'expérience. En analysant les valeurs obtenues pour la capacité de *trans*-activation du plasmide vide sur le promoteur de *HK1a*, nous pouvons situer de manière certaine le problème à ce niveau.

La surexpression de RR19 permet, en revanche, une augmentation de l'expression du gène RiLUC sous le contrôle de *HK1a* suggérant que le RR19 est capable de réguler le promoteur *HK1a*. Ce résultat est cohérent avec le fait que l'on retrouve des boîtes de fixation consensus ou boîtes 5'-(A/G)GAT(T/C)-3' sur le promoteur du gène *HK1a* comme explicité en partie I, chapitre 2 de ce manuscrit.

Au vue des difficultés d'interprétation des contrôles vecteur vide/ promoteur de *HK1a* et CBF1/ promoteur de *HK1a*, l'ensemble ces tests devront être réalisés de nouveau en s'assurant de la validité de ceux-ci.

Afin de déterminer si le promoteur du *RR18* pouvait être une cible de ces différents RR, des expériences de *trans*-activation ont aussi été réalisées chez le tabac et sont présentées dans la figure 48.

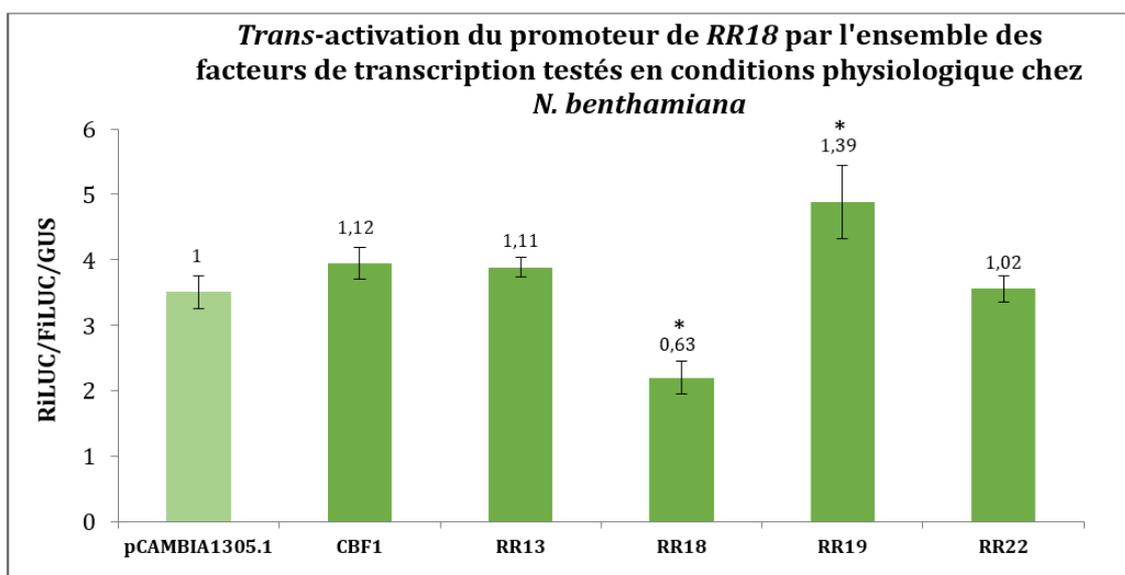


Figure 48 : analyse de la capacité de trans-activation de l'ensemble des protéines sur le promoteur du RR18. Dans cette expérience, l'ensemble des plasmides effecteurs contrôles et tests ont été mis un à un en présence du plasmide effecteur contenant le promoteur de RR18. PCAMBIA 1305.1 correspond au plasmide effecteur vide. Chaque condition a été effectuée en triplicat et la moyenne ainsi que l'erreur standard de chaque condition ont été calculées. Les résultats ont été normalisés par rapport à la moyenne de la condition contrôle négatif et sont représentés par les valeurs situées au-dessus de chaque condition. La significativité des différences observées entre chaque condition et la condition témoin est déterminée par usage d'un test de Student. *0,05 < P ≤ 0,1.

Les résultats obtenus par dosage fluorimétrique et luminométrique montrent qu'encore une fois, les niveaux d'expression du gène FiLUC en conditions contrôles (vecteur vide/promoteur du RR18 et CBF1/promoteur du RR18) sont anormaux.

Cependant, des tendances peuvent être dégagées de cette expérience. On peut ainsi penser d'une part que les RR13 et RR22 ont une action similaire sur le promoteur du RR18 et d'autre part, que le RR19 semble pouvoir se fixer sur le promoteur du RR18 et augmenter son activité. Enfin, de manière intéressante, le RR18 semble réguler son propre promoteur en diminuant son activité.

De même que pour la première expérience, ces deux expérimentations n'ont été réalisées qu'une seule fois et avec des témoins négatifs qui ne correspondent pas à ce qui a pu être obtenu classiquement.

Nous devons donc rester très prudents quant aux interprétations de ces expériences. Ces problèmes sont sûrement liés à l'initiation à la technique mais l'ensemble de l'expérience est encourageante pour la suite du travail et pourra être transposée ici dans le laboratoire afin de parfaire ces résultats et de transposer le système sur le modèle peuplier afin de se situer dans des conditions d'homologie de système (à l'inverse des deux systèmes hétérologues présentés ici).

I.4. Discussion

Afin de répondre à nos objectifs concernant la mise en évidence du fonctionnement des RR isolés, RR18, 19 et 22 et de la mise évidence de leur implication dans la voie osmosensing, nous avons adopté la stratégie d'étudier leur capacité de *trans*-activation *via* l'utilisation d'un système d'activation gène rapporteur.

Lors de précédents travaux, des données préliminaires avaient montré que RR13 était capable de reconnaître la séquence consensus 5'(A/G)GAT(T/C)3' et de réguler l'activité du promoteur ARR6.

La première technique utilisée nous a permis d'effectuer la continuité du travail précédent, mais a rapidement montré des limites, évoquées précédemment.

De ce fait, l'utilisation du nouveau système rapporteur dans le modèle tabac nous a permis d'entrevoir des perspectives très intéressantes pour ce travail. De nombreux avantages ont pu être avancés en faveur de l'utilisation de ce système.

Tout d'abord, la technique de transformation utilisée, l'agroinfiltration, est une technique qui a déjà été élaborée et optimisée chez le peuplier pour différentes problématiques (Takata and Eriksson, 2012 ; Shen *et al.*, 2015).

Ensuite, dans ce système, la nouveauté réside dans le fait que la normalisation des résultats ne nécessite plus l'utilisation du troisième plasmide de la technique précédente, contrôle de l'étape de transformation et siège du biais évident de la technique.

De plus, la probabilité d'obtenir l'évènement correct de transformation par les 2 partenaires est plus importante qu'avec 3 plasmides, permettant potentiellement d'augmenter le taux d'efficacité de la transformation pour une même construction.

Lors de nos expériences, la capacité du RR13 à reconnaître la séquence consensus 5'(A/G)GAT(T/C)3' et à réguler l'activité du promoteur de l'ARR6 a pu être confirmée.

Par contre, nos résultats suggèrent que le RR13 n'est pas capable de réguler les promoteurs *HK1a* et *RR18*.

Il est toutefois intéressant de noter que *via* l'utilisation du système de *trans*-activation dans les feuilles de tabac, RR13 semblait activer l'expression du gène rapporteur *via* sa fixation à la sonde M2 contenant 4 répétitions du motif CRT impliqué dans la tolérance au froid. Ce motif, 5'-TGCCGACATT-3', répété 4 fois dans la sonde M2 : 5'-TGCCGACATTGCCGACATTGCCGACATTGCCGACATTGCCGACATT-3' ne contient pas le motif consensus de fixation des RR-B. Cependant, un motif ACATT, faiblement homologue au motif NGATT se trouve répété 3 fois au sein de cette sonde et pourrait peut-être expliquer la faible activation tout de même observée pour le RR13. Cependant, le cœur GAT du motif des RR-B semblait être un élément nécessaire à la fixation efficace de ces protéines (Sakai *et al.*, 2000 ; Hosoda *et al.*, 2002 ; Imamura *et al.*, 2003 ; Taniguchi *et al.*, 2007 ; Thèse L. Bertheau, 2013). L'analyse de la fixation du RR M_tRR1 de *Medicago truncatula* a par contre mis en évidence une séquence consensus plus longue (d'environ 12 pb) et légèrement différente de celle déjà publiée pour *Arabidopsis* dont le cœur est 5'(A/G)AGA(T/C)3' (Ariel *et al.*, 2012). Ce résultat met en évidence une certaine variabilité des séquences fixatrices peut être en fonction du modèle végétal étudié et l'importance des zones environnantes le cœur du consensus.

Nos études ont aussi montré que CBF1, facteur de transcription impliqué dans la tolérance au froid chez le raisin, ne semble pas capable de répondre lorsqu'il est mis en présence de promoteurs de gènes potentiellement impliqués dans la réponse au stress osmotique. Cette réponse n'était pas forcément évidente, au vue des dialogues possibles entre les différentes voies de signalisations.

De plus, le RR19 pourrait être un facteur de transcription important, puisque il semble réguler l'activité des promoteurs de *HK1a* et du *RR18*, qui sont potentiellement impliqués dans la réponse au stress osmotique.

Enfin, les RR 18 et 22 ne paraissent pas être capables de se fixer au promoteur de *HK1a*. Toutefois, le RR18 semble réguler le promoteur de son propre gène suggérant une auto-régulation négative.

L'ensemble de ces résultats nécessite une confirmation puisque beaucoup d'expériences n'ont été réalisées qu'une fois, en particulier en ce qui concerne le système de *trans*-activation en cellules de tabac, et que pour certaines, des anomalies dans les contrôles ont été observées.

En outre, les différents partenaires ont été mis en contact au sein des cellules de tabac pendant 2 jours avant récolte des échantillons. Ce délai correspond au temps minimal pour que l'ensemble des

protéines soient synthétisées en quantité suffisante pour la détection lors de l'utilisation des partenaires présents chez le raisin. Cependant, une possibilité d'incubation de 4 jours est possible, pouvant putativement permettre une augmentation des niveaux de production des différents rapporteurs et ainsi des résultats plus probants.

Cette technique, en cours de mise en place dans notre laboratoire pour nous permettre de continuer les expériences, présente plusieurs avantages listés précédemment, dont l'utilisation des organes végétaux et en particulier des feuilles, ce qui nous permet de nous affranchir des suspensions cellulaires, toujours très versatiles.

La poursuite de l'approche *trans*-activation par biolistique aurait pu être envisagées sur des cellules de peuplier en suspension, mais dans ce cas le protocole de transformation par biolistique de ces cellules auraient dû être mis au point, ce qui aurait demandé beaucoup de temps sachant que nous ne disposons pas au départ de souches cellulaires de peuplier stabilisées. Ayant été confrontés à la variabilité de comportement des suspensions cellulaires de *C. roseus*, nous aurions dans le cas du peuplier tout aussi bien pu être confronté au même problème, d'où l'idée de ne pas se lancer dans cette voie.

Nous pourrions ainsi adapter la nouvelle technique testé à la transformation de feuilles de peuplier, permettant le travail en système homologue et nous évitant peut être ainsi de passer à côté de certaines interactions.

Des tests de *trans*-activation pourront aussi être réalisés concernant la capacité des effecteurs présentés dans ce manuscrit à interagir avec d'autres promoteurs d'intérêt au laboratoire, tels que les promoteurs des *RR19* et *22*, dont la caractérisation est un objectif majeur de ce manuscrit, ainsi que le promoteur du *RR13*, *RR* dont la caractérisation a déjà été grandement avancée au laboratoire. Comparativement à ce qui a pu être observé pour *ARR18* dont l'implication dans la voie cytokinique a pu être avancée (Veerabagu *et al.*, 2012), nous pourrions tester la capacité du *RR18* à transactiver le promoteur du *RR13* afin de déterminer si ce *RR* se trouve à l'interface des deux voies de signalisation. La récupération des séquences promotrices de l'ensemble de ces partenaires pour le clone 717-1B4 du génotype *Populus tremula x P. alba* est en cours au laboratoire et devrait être favorisée par la mise à disposition récente du génome de ce génotype (Zhou *et al.*, 2015 ; Xue *et al.*, 2015).

Enfin, par l'usage de cette stratégie, nous pourrions également envisager l'étude de la coopération entre facteurs de transcription vis-à-vis d'une même cible moléculaire, puisque la co-transformation des partenaires à tester au sein du tabac peut être réalisée en incluant deux ou trois plasmides effecteurs. Cette possibilité est particulièrement utile dans l'hypothèse où un co-facteur additionnel serait nécessaire à la capacité de *trans*-activation d'un des facteurs de transcription testés. Cependant, il faudra être vigilant sur la proportion de chaque effecteur apporté dans la cellule, puisque le gène rapporteur utilisé permettant d'apprécier la présence du plasmide serait le même.

L'étude réalisée sur les CBF dans le cas de la voie de signalisation au froid a conduit à la mise en évidence que différents CBF semblent reconnaître des variations minimales du motif consensus CRT (Nassuth *et al.*, 2014). Ces résultats corroborent parfaitement notre hypothèse selon laquelle les *RR* pourraient reconnaître des séquences spécifiques, aboutissant à des spécificités de réponse et de voie.

Au final, l'étude de ce système aura permis d'obtenir de nouvelles perspectives concernant l'étude de la capacité de fixation des *RR-B* sur des promoteurs cibles, tant par l'apport de réponses potentielles (*RR18* et *19*), mais également par les perspectives offertes par la technique testée. De plus, cette opportunité aura permis d'établir un contact avec le laboratoire du professeur Nassuth, qui pourra perdurer dans le laboratoire.

Les résultats obtenus présumant de la présence d'une fonctionnalité transactivatrice des RR-B sur des cibles déterminées, *a minima* pour les RR18 et 19, l'analyse du rôle potentiel de ces protéines au sein de la plante entière a ensuite été analysée par une approche perte de fonction par stratégie RNAi et sera développée dans la section suivante.

Section II - Etude de l'impact de l'extinction des *RR18, 19* et *22*

II.1. Introduction

La technique RNAi est une méthode de choix pour étudier la fonction d'un gène dans différents processus biologiques (Waterhouse and Helliwell, 2003) car elle permet d'éteindre l'expression de ce gène, souvent de manière spécifique et d'observer les conséquences de cette extinction.

Cette technique a été découverte accidentellement dans le domaine végétal en 1990 par Napoli et ses collaborateurs lors d'une étude visant à accentuer la couleur de pétunias et aboutissant à l'apparition de pétunias totalement blancs. De nombreuses améliorations ont depuis permis d'aboutir au système actuel, appelé mise sous silence post transcriptionnelle de gènes ou Post-Transcriptional Gene Silencing (PTGS) chez les plantes.

Utilisant la machinerie cellulaire végétale, le mécanisme du PTGS peut être initié par la présence d'ARN synthétique double brin en épingle à cheveux ou **hairpin RNA (hpRNA)** ou bien par un ARN contenu dans un vecteur dérivant d'un virus ou **Virus-Induced Gene Silencing (VIGS)**. Ces **ARN double brins (ARNdb)** seront reconnus par une ribonucléase de type III, Dicer, permettant le clivage de ces longs en ARNdb plus petits (21 à 25 paires de bases) appelés **small interference RNA (siRNA)** (Portilho and Almeida, 2011). Cette protéine est aussi responsable du transfert de ces siRNA sur un complexe protéique appelé **RNA-Induced Silencing Complex (RISC)**. Ce complexe permettra l'élimination d'un brin d'ARN, afin de ne conserver que le brin permettant le guidage du complexe vers sa cible ARNm, appelé brin guide. Dans le cas d'une complémentarité parfaite de séquence entre le siRNA et l'ARNm, la destruction de ce dernier est opérée par le complexe RISC. Dans le cas contraire et même dans le cas de divergence de quelques bases, le complexe RISC reste fixé sur l'ARNm sans provoquer sa dégradation mais permet cependant d'empêcher la traduction de se produire (Figure 49).

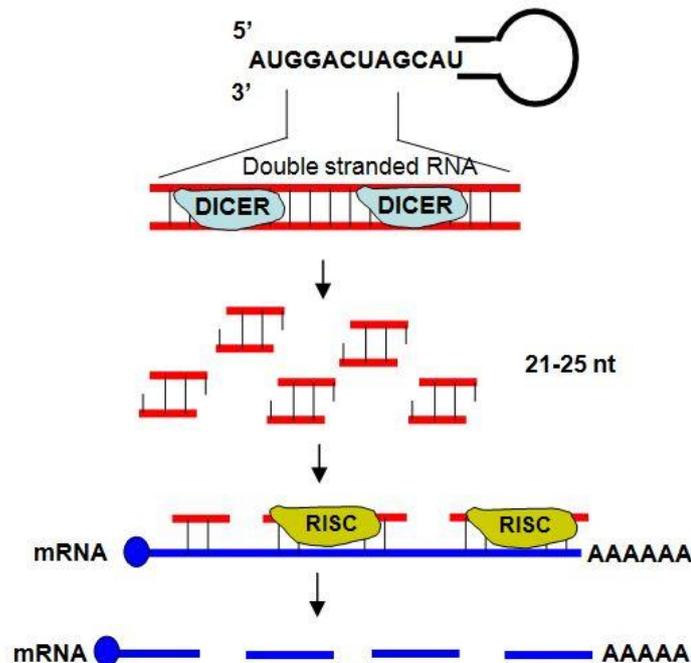


Figure 49 : schéma représentant la dégradation d'un ARN double brin en épingle à cheveux par la machinerie cellulaire et extinction de l'expression du gène cible par destruction de son ARN messager.

Les structures en épingle à cheveux sont maturées pour obtenir des ARN doubles brins qui seront ensuite clivés par l'enzyme DICER. Au niveau des petits ARN résultants, seul un brin (sens) est pris en charge par le complexe protéique RISC qui permettra alors le guidage de l'ensemble vers la séquence ARN cible au sein du messager. Ce dernier sera finalement clivé. Figure extraite de Portilho and Almeida, 2011.

Une manière d'introduire stablement du matériel génétique dans un végétal consiste en l'utilisation de souches d'*Agrobacterium* contenant un plasmide permettant la synthèse d'un ARN double brin en épingle à cheveux (Hoffman *et al.*, 2006). Cette technique a fait ses preuves dans de nombreuses études en permettant d'établir le rôle de certaines protéines dans les processus de maturation (Hoffman *et al.*, 2006).

Dans le cas du peuplier, la technique d'agrotransformation a été décrite pour la première fois en 1986 (Parsons *et al.*, 1986) et a depuis été largement reprise et optimisée pour mettre en évidence la fonction de facteurs de transcription dans des processus divers (Deblock, 1990 ; Howe *et al.*, 1994 ; Confalonieri *et al.*, 1995; 1997; Han *et al.*, 2000 ; Spokevicius *et al.*, 2006 ; Nishiguchi *et al.*, 2006 ; Song *et al.*, 2006 ; Cseke *et al.*, 2007 ; Busov *et al.*, 2010 ; Foster *et al.*, 2014 ; Shen *et al.*, 2015 ; Liu *et al.*, 2016 ; Lu *et al.*, 2016).

II.2. Contexte d'étude et objectifs

A l'exception d'une étude réalisée sur le MSP de *C. roseus* permettant la transduction du signal CK et ciblant l'expression de HPT1 par stratégie RNAi constitutive (Papon *et al.*, 2004) ou inductible (Amini *et al.*, 2012), aucun partenaire de MSP végétal n'a préalablement été caractérisé par l'utilisation de cette technique.

Nos objectifs clairement exposés précédemment visent à déterminer le rôle des RR18, 19 et 22 dans la voie de signalisation osmosensing. Nous avons donc envisagé l'extinction de ces gènes par stratégie RNAi pour ces 3 RR-B précédemment considérés dans notre étude.

Cette stratégie nécessitant une étape d'agroinfection, nous avons utilisé le génotype *Populus tremula* x *P. alba* clone 717-1B4 en raison de sa bonne aptitude à l'infection par *Agrobacterium*.

Les RR-B isolés, l'ont été chez le génotype Dorskamp, et en conséquence, afin de réaliser nos constructions RNAi, une première étape consiste à rechercher les séquences correspondantes dans le génotype à transformer. Les étapes suivantes correspondent aux étapes classiques utilisées dans ce type de stratégie, à savoir, clonage, transformation de la souche d'*Agrobacterium*, transformation d'explants de peuplier et sélection comme explicité dans la partie Matériel et Méthodes.

II.3. Résultats

II.3.a - Constructions plasmidiques pour obtention du hairpin

II.3.a - i - Obtention et analyse des séquences 3' non traduites des RR18, 19 et 22 pour le génotype *Populus tremula* x *P. alba* clone 717-1B4

Pour chaque RR-B, un couple d'amorces situé en fin de codant et en fin de 3' non traduit a été choisi par rapport au génotype *P. trichocarpa*. Les séquences obtenues ont été analysées permettant de déduire des pourcentages d'homologie de séquence très forts entre les deux génotypes *P. trichocarpa* et *Populus tremula* x *P. alba* clone 717-1B4, soit 98,82%, 96,86% et 91,94% respectivement pour les RR18, 19 et 22 (Figures S7, S8 et S9 de l'ANNEXE 2 et ANNEXE 9).

II.3.a - ii - Obtention de zones spécifiques pour la construction du hairpin

L'obtention de ces séquences était un prérequis pour la détermination de zones spécifiques à chaque RR pour l'obtention de fragment RNAi (ANNEXE 9) ainsi qu'une zone conservée dans le codant du duplicat RR18/19 (ANNEXE 9).

Les analyses des séquences des RR-B de 717-1B4 confirment la forte homologie entre les *RR18* et *19* puisque ces deux *RR*, sur la portion d'ADN étudiée, partagent un pourcentage d'identité de séquences de 73,72 % alors que la comparaison des séquences des *RR18* et *19* avec le *RR22* ne montre que 48 % d'identité.

Cette très forte identité rend difficile l'obtention de séquences spécifiques cependant nous avons pu déterminer des zones présentant tout de même des différences. Des amorces ont donc été synthétisées afin d'amplifier une portion de chaque séquence 3' non traduite et les trois zones ciblées ont donc une taille respective de 272 pb, 292 pb et 374 pb pour les *RR18*, *19* et *22*.

Ces zones spécifiques obtenues, nous avons cloné ces fragments dans le plasmide pK7GWIWG2D(II) pour la réalisation de la conjugaison triparentale afin de procéder aux étapes d'agrotransformations expliquées dans le chapitre Matériels et Méthodes.

II.3.b - Obtention de lignées transformées

Le matériel végétal sous forme d'explants préalablement blessés est transformé par chaque souche *Agrobacterium*. Après dépôt sur un milieu permettant d'induire la formation de cals, une analyse de fluorescence a été réalisée comme explicité dans le chapitre Matériels et Méthodes. Un contrôle de transformation a été réalisé avec le plasmide pH8-CAD ne contenant pas de cassette enhanced GFP (eGFP) (ANNEXE 4).

Les résultats de transformation pour chaque RR sont montrés en figure 50 ci-dessous.

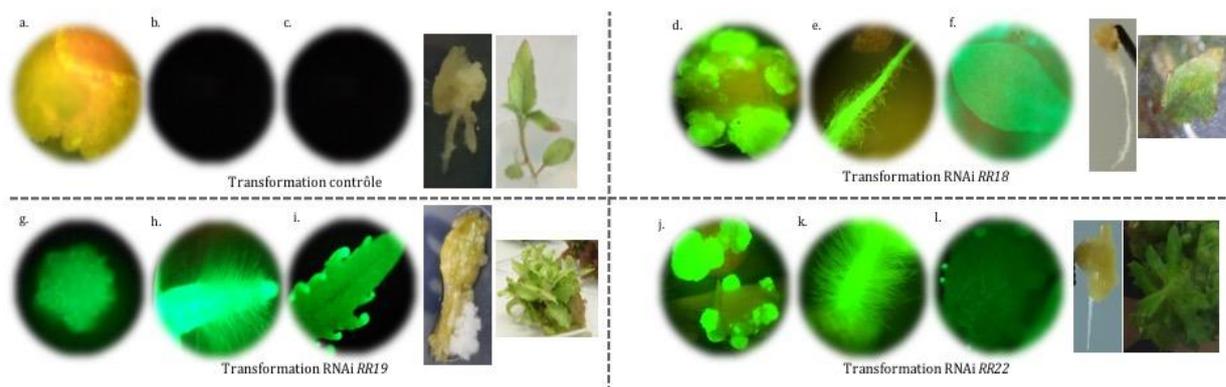


Figure 50 : analyse des transformants contrôle et RNAi RR18, 19 et 22.

La fluorescence des cals témoins (a.) a été comparée à celle obtenue pour les cals contenant les constructions RNAi individuelles des *RR18* (d.), *19* (g.) et *22* (j.). Les fluorescences obtenues dans les feuilles et les racines néoformées pour la condition contrôle (b. et c.) ont également été comparées aux fluorescences obtenues pour les constructions RNAi individuelles des *RR18* (e. et f.), *19* (h. et i.) et *22* (k. et l.).

Lors de l'analyse du niveau de fluorescence obtenu après transformation avec le plasmide contrôle, nous pouvons visualiser une fluorescence jaune (Figure 50a). Cette fluorescence peut être attribuée à l'autofluorescence des tissus, provoquée par les composants de la paroi cellulaire. Cependant, cette fluorescence se révèle extrêmement différente de la fluorescence de la GFP. Postérieurement à cette observation, le laboratoire a obtenu un filtre, permettant d'éliminer l'autofluorescence des tissus. C'est ainsi que les échantillons contrôles b. et c. ont été réalisés.

Nos conditions d'induction hormonale ont pu permettre l'organogenèse (racines et feuilles) dont la fluorescence a été confirmée (Figure 50 e, f, h, i, k et l). Ainsi les tissus néoformés possèdent bien la construction à intégrer (ADN de transfert portant le hairpin d'intérêt et le gène eGFP sous contrôle d'un promoteur 35S).

Nous avons pu mettre en place des lignées monoclonales.

II.3.c - Vérification de l'extinction de gène par RT-PCR

Afin de continuer notre étude, l'étape importante consiste à valider l'extinction de nos gènes d'intérêt. Pour ce faire, l'absence d'expression des messagers respectifs doit être validée. La technique la plus simple pour y arriver consiste à détecter par RT-PCR la présence ou l'absence des ARNm correspondants.

Le niveau d'extinction des transcrits doit être déterminé par rapport à un niveau d'expression de base qui correspond au niveau de ces mêmes messagers dans le témoin de transformation.

La détection des messagers du RR18 étant difficile en condition témoin, et notre but étant de visualiser une extinction de ce gène, il apparaît important de pouvoir avoir des conditions expérimentales permettant de détecter en quantité ces messagers afin par la suite de visualiser la diminution ou la disparition de ceux-ci en lignée RNAi. Nous avons donc dû adapter notre protocole de RT-PCR car les conditions de RT-PCR classiques ne nous permettaient pas de détecter de signaux en condition témoin. Nous avons ainsi optimisé nos conditions expérimentales et réussi à obtenir des amplifications détectables dans le matériel cal pour tous les RR-B. en travaillant à partir de 4 µg d'ARN totaux et 40 cycles de PCR.

Les résultats obtenus sont présentés en figure 51.

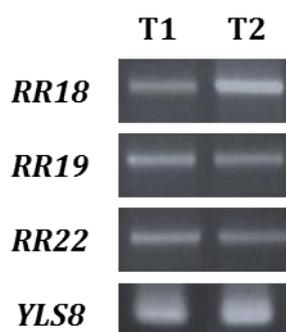


Figure 51 : analyse des niveaux d'expression obtenus pour les RR18, 19 et 22 dans deux lignées témoin de transformation.

T1 et T2 représentent les deux lignées testées. YLS8 correspond au témoin de PCR. 40 cycles de PCR ont été effectués sur 1µL d'une matrice ADNc réalisée à partir de 4 µg d'ARN totaux.

Ces étapes d'optimisation étaient fondamentales car conditionnant toutes les étapes de validation de nos lignées transgéniques. Nous avons ainsi mis au point les conditions expérimentales optimales afin de procéder au criblage des lignées.

Ne disposant à ce jour que de peu de matériel végétal, nous n'avons pas encore pu procéder à des extractions d'ARN en quantité suffisante afin de permettre la mise en place des PCR de vérification. En effet, pour obtenir 4 µg d'ARN totaux pour le matériel végétal témoin, 1 g de matériel frais a dû être broyé et dans le cas des lignées transgéniques, lorsque cette quantité était disponible, les rendements en ARN totaux récupérés n'ont pas été suffisants pour effectuer l'étape de rétro-transcription.

Ce travail de propagation du matériel végétal est en cours actuellement et permettra d'ici peu d'obtenir un nombre suffisant de boutures pour pouvoir à la fois propager le matériel pour conservation et extraire les ARN totaux en quantité suffisante.

II.4. Discussion

Lors de cette étude, nous avons pu isoler avec succès les séquences situées en 3' non traduit de chacun des 3 RR-B pour le géotype *Populus tremula* x *P. alba* clone 717-1B4 considérés dans notre étude.

Nous avons réussi à déterminer des zones de spécificité afin de construire nos hairpin en dépit de la très forte homologie observée entre les séquences. Nous avons au début de ce travail souhaité éteindre la paire 18-19 et avons réussi à obtenir une séquence ciblant de façon spécifique cette paire.

Les études menées chez *Arabidopsis*, sur le rôle des RR-B portent souvent sur des mutants perte de fonctions, certes simples, mais souvent double voire triple. En effet, la mise en évidence du rôle de régulateur négatif des ARR1, 10 et 12 dans la réponse de cette plante à la sécheresse a été menée à partir de triple mutants *arr1;arr10;arr12* (Nguyen *et al.*, 2016). Nous avons également envisagé cette approche afin d'éteindre la paire 18-19 ainsi que les 3 RR 18, 19 et 22 simultanément. Nous avons réussi à sélectionner une zone de spécifié pour réaliser la stratégie double mais des difficultés rencontrées pour le clonage ont ralenti notre démarche vis-à-vis de ce RR, cependant nos constructions sont en cours et cette approche pourra se prolonger après ma thèse. Par contre, la plus grande variabilité du RR22 n'a pas permis d'identifier une zone conjointe pour l'extinction triple. De par sa différence avec les RR18 et 19, ce RR22 pourrait très bien avoir un rôle différent de celui du 18 et du 19 et qu'il n'y ait pas de redondance de fonction entre ces RR-B. Dans ce cas, la lignée RNAi du RR22 devrait nous permettre à elle seul de déterminer du rôle de ce RR.

Nous avons réussi à réaliser nos transformations et obtenir des régénérations de chacune des conditions testées. Ce point est particulièrement important car il a été observé chez des doubles mutants perte de fonction *arr1;arr12* d'*Arabidopsis*, une très faible propension à former des cals et à régénérer des plantules entières (Hill *et al.*, 2013 ; Hill and Schaller 2013). Cette difficulté pouvait être contournée par surexpression dans ces doubles mutants de l'ARR10. Ces travaux montraient donc l'implication de ces RR-B dans le développement de par leur implication dans la voie cytokininique et de ce fait la régénération de plants de peuplier transformés n'exprimant plus les RR18, 19 et 22 pouvait être compromise si ceux avait eu également un rôle prépondérant dans cette voie.

Ainsi, de manière indirecte, nous pouvons supposer par ce biais que les RR18, 19 et 22 ne sont à priori par impliqués dans la signalisation cytokininique, ou en tout cas pas dans des processus de développement induits par les cytokinines au cours de ces étapes de régénération comme cela est le cas pour les ARR1, 10 et 12 d'*Arabidopsis*. Par contre, la non-implication du RR18 de peuplier dans la voie cytokininique sera à investiguer car au vu des travaux menés sur l'ARR18, ce RR-B semblerait bien lié au signal cytokininique. En effet il semblerait que les cytokinines diminuent l'élongation racinaire via l'ARR18 (Veerabagu *et al.*, 2012) mais que ce RR-B permette la germination, donc l'émergence de la racine primaire via son élongation lors d'un stress osmotique (Veerabagu *et al.*, 2014). Ces deux travaux semblent indiquer que ce RR-B est un facteur de transcription recruté par les deux voies de signalisation mais que les gènes régulés sont différents en fonction du signal. En effet, les gènes permettant l'élongation racinaires semblent être régulés par ce même facteur de transcription, soit négativement lors d'un apport en cytokininique, soit de manière positive lors d'un stress osmotique. En ce qui concerne le RR18 de peuplier, la régulation de ce gène par le stress osmotique (Bertheau *et al.*, 2015) et par les cytokinines (Ramírez-Carvajal *et al.*, 2008) comme discuté précédemment, est un argument en faveur du fait que ce RR puisse se situer à l'interface des deux voies de signalisation.

En conséquence, le succès des régénérations de plants RNAi pour les RR18, 19 et 22 est un point particulièrement positif pour la suite de nos travaux.

Nous devons, toutefois réaliser la vérification de l'extinction totale ou partielle des gènes de RR-B afin de procéder à la caractérisation de ces lignées. Nos conditions expérimentales étant

maintenant optimale, nous pourrions très rapidement pouvoir procéder aux expérimentations une fois les lignées caractérisées pour leur extinction.

Dans la même idée de borner avec précision le champ d'action de chaque RR-B, il pourrait être judicieux de pouvoir réintroduire dans chaque lignée mutante pour un RR correctement caractérisée le transgène d'un autre RR-B. Ainsi, pour la lignée RNAi pour le *RR18*, réintroduire par exemple le transgène permettant l'expression du *RR19* et observer le phénotype potentiellement obtenu, à l'exemple de ce qui a été effectué pour les mutants *ARR1*, *10* et *12* (Hill and Schaller 2013 ; Nguyen *et al.*, 2016).

Conclusion générale Partie II

Afin de caractériser les RR18, 19 et 22 choisis dans la partie I comme candidats à une implication dans la réponse à la sécheresse, une étude fonctionnelle a été réalisée. Celle-ci a été mise en œuvre selon deux approches complémentaires, structurale et biologique.

Nos objectifs dans cette étude étaient multiples et visaient à montrer :

- d'une part la fonctionnalité des RR-B *via* la démonstration de la fonctionnalité de leurs domaines par le biais de :
 - 1- leur capacité de fixation à l'ADN via le domaine GARP et l'identification de motifs ADN de fixation des RR-B pouvant être spécifique de la réponse à la sécheresse,
 - 2- leur capacité de dimérisation.
- d'autre part la fonctionnalité des RR-B *in planta*, en tant que facteur de transcription en montrant leur capacité à activer la transcription de gènes cibles par fixation sur leurs promoteurs, ou en étudiant leurs rôles biologiques en recherchant l'impact biologique de leur absence.

Au cours de notre étude des domaines fonctionnels, si nous n'avons pas pu démontrer la capacité de fixation des RR18, 19 et 22 sur des motifs ADN par le biais de la technique gel retard, nous avons de manière détournée, *via* l'approche biologique, observé la capacité de fixation du RR19 sur des promoteurs d'intérêt puisque liés à la réponse au stress hydrique (*HK1a* et *RR18*). Si ces résultats sont confirmés, nous pourrions rechercher les motifs ADN de fixation de ce RR sur les promoteurs. Nous pourrions ainsi aboutir à l'identification de ces motifs afin de répondre à notre question de départ visant à déterminer si ces motifs sont réellement différents des motifs impliqués dans la réponse aux cytokinines.

De plus l'étude de la capacité de dimérisation, nous a montré que ce RR pouvait homodimériser mais également hétérodimériser avec 5 autres RR-B, pouvant ainsi conduire à des modulations de réponses. Cette modulation prend toute son importance en termes d'adaptabilité des plantes aux contraintes environnementales. Nous avons également pu observer des absences d'interaction notables, pouvant suggérer des fonctionnalités au sein de voies de signalisation différentes de certains de ces RR-B. Cette étude a permis la mise en place d'une première version de l'interactome de dimérisation des RR-B de peuplier, et celui-ci sera validée dans un système plante afin d'être publié.

A l'inverse, l'absence de transactivation de ces mêmes promoteurs (*HK1a* et *RR18*) pour le RR13 suggère de manière surprenante que ce RR ne serait pas impliqué dans les mécanismes de régulation de ces gènes. Le RR13, dont l'implication dans la voie cytokinines est avérée pourrait ne pas être impliqué dans la voie stress osmotique en dépit de sa régulation par ce stress. Ce résultat est à vérifier par le biais de l'utilisation d'autres promoteurs de gènes connus pour être des marqueurs de la réponse à la sécheresse tels que des gènes codant des déhydrines, des agents osmolytes de type proline, ou encore des aquaporines. Nous avons pu mettre en évidence au cours de travaux antérieurs l'augmentation de la transcription d'un gène codant une déhydrine, *peudhn1*, au cours du stress osmotique causé par l'application du PEG₆₀₀₀ à 50 g/L dès 5 minutes de stress (Caruso et al., 2002). Le promoteur de ce gène a pu être isolé et nous pourrions l'utiliser afin de rechercher la capacité de nos RR-B à transactiver ce gène de référence de la réponse au stress osmotique. Ce RR13, homologue des

ARR1 et 2, pourrait tout comme ces ARR être un régulateur négatif de la réponse au stress osmotique et donc par conséquent au stress hydrique. Si cela était vrai, cela expliquerait alors la non-capacité de transactivation de ce RR-B sur nos deux promoteurs.

Ces deux observations seraient en accord avec l'hypothèse de l'existence de RR-B spécifiques de voies de signalisation.

Enfin, le RR18, dont l'implication de son homologue *Arabidopsis* dans la réponse à la contrainte osmotique a été démontrée (Veerabagu *et al.*, 2014), ne présente qu'un panel restreint de partenaire puisqu'il n'est capable de dimériser qu'avec 4 partenaires, dont de façon importante avec le RR19 et 22 et que très faiblement avec les RR12 et 13. Son incapacité à réguler la transcription du gène *HK1a* lors des tests de transactivation montre d'une part son incapacité à fixer les boîtes de fixation des RR-B repérés sur le promoteur. D'autre part, la régulation précoce du gène *HK1a*, dès 5 minutes de stress, nécessite l'intervention d'un facteur de transcription déjà présent au sein de la cellule au moment de l'application du stress, or la régulation très tardive du gène *RR18* et la difficulté à l'isoler en condition témoin sont des arguments en faveur de l'hypothèse que le RR18 ne semble pas impliqué dans la régulation du gène *HK1a*, ni dans la sienne. Des tests de transactivation devront également être envisagés pour ce RR18 vis-à-vis du promoteur de *peudhn1*.

L'analyse de l'impact de l'extinction des transcrits des *RR18*, *19* et *22* par technique ARN interférent a été initiée au laboratoire. Cette approche, nécessitant de nombreuses étapes intermédiaire, n'a pu être finalisée dans le temps qui m'était imparti. Cependant, nous avons d'ores et déjà obtenu une information sur une partie de la séquence non codante pour ces trois RR-B dans un génotype dont la séquence n'était pas disponible au moment de l'étude. De plus, l'ensemble des constructions intermédiaires nécessaires à la technique ARN interférent ont pu être finalisée et des lignées transgéniques stables pour chacun de ces trois *RR-B* ont été obtenues et pourront à présent être utilisées au laboratoire. La caractérisation du niveau d'extinction des transcrits, ainsi que du locus d'insertion de la construction permettant la synthèse de l'ARN interférent restent des points majeurs à élucider. Ces vérifications seront donc effectuées prochainement au laboratoire.

Au vue des caractérisations effectuées, nous pouvons conclure sur une très probable implication du RR19 dans la réponse à la contrainte osmotique chez le peuplier.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

De par le contexte climatique actuel, la sécheresse fait partie des nombreux stress abiotiques auxquels sont soumis les organismes vivants dont les végétaux, et ce de manière de plus en plus fréquente.

Afin de répondre à ces agressions, les plantes mettent en places différentes stratégies, toutes inféodées à une perception efficace de la contrainte et à une transmission de l'information au niveau nucléaire, aussi appelé transduction du signal, tout aussi efficace. Ainsi, l'étude de ces voies de signalisation permettra une meilleure compréhension des mécanismes adaptatifs mis en place par la plante pour faire face à ce type de stress.

Dans le cadre de l'étude d'une voie de signalisation impliquée dans la perception de la contrainte sécheresse, des travaux préalablement réalisés au sein du laboratoire sur le modèle peuplier, ont permis l'identification de différentes protéines appartenant à un système de type MSP. C'est ainsi que deux récepteurs de type histidine-aspartate kinase, HK1a et HK11b ont été isolés ainsi que leurs partenaires navettes, HPt2, 7 et 9 (Chefdor *et al.*, 2006 ; Héricourt *et al.*, 2013 ; Héricourt *et al.*, 2016, soumis). Des facteurs de transcription de type RR-B ont aussi été identifiés et des partenariats préférentiels ont pu être dégagés avec les trois protéines HPts, 2, 7 et 9 (Bertheau *et al.*, 2012 ; Bertheau *et al.*, 2013 ; Bertheau *et al.*, 2015).

La caractérisation de l'ensemble des intervenants de la voie pouvant interagir entre eux, s'avère fondamentale pour la compréhension de la réponse du peuplier face à la sécheresse, et l'étude des RR-B, facteurs de transcription et partenaires ultimes de ce MSP, permettant d'identifier les gènes cibles régulés *via* cette voie, revêt également une importance cruciale.

Ainsi, l'objectif de ce travail de thèse était d'étudier les RR-B selon plusieurs approches complémentaires, afin de déterminer leur importance dans la voie de signalisation liée à la sécheresse.

Le système de signalisation de type MSP est également impliqué dans la perception de phytohormones telles l'éthylène et les cytokinines. Le rôle de ces dernières dans la réponse des plantes face à la sécheresse a désormais été démontrée (Tran *et al.*, 2007, Nguyen *et al.*, 2016 ; Rowe *et al.*, 2016). Dans ce cas, les phytohormones sont perçues spécifiquement par des récepteurs de type histidine-aspartate kinase au niveau d'un domaine appelé domaine CHASE. Une fois activés, les récepteurs transmettent le signal aux RR-B via les protéines HPt.

En conséquence, en regardant l'ensemble des MSP fonctionnant chez les plantes, des signaux différents tels que les phytohormones (éthylène, cytokinines) ou la contrainte osmotique (sécheresse) activent spécifiquement des récepteurs recrutant un pool identique de protéines navettes, les HPts, qui activent elles-mêmes, des facteurs de transcription de la famille des RR-B.

Comme présenté en introduction, l'interconnexion des voies cytokinines et sécheresse est maintenant une évidence. Ainsi, pendant de nombreuses années, les protéines HPts et les RR-B étaient considérés comme des « Hub » de signalisation.

Cependant, les derniers travaux portant sur le lien entre cytokinines et sécheresse montrent bien un rôle de régulateur négatif de ces phytohormones dans le cadre de la réponse à la sécheresse (Tran *et al.*, 2007), *via* certains RR-B dont les ARR1, 10 et 12 (Nguyen *et al.*, 2016).

Au regard de ces données, la question de la conservation de la spécificité du signal durant sa transmission *via* un pool de facteurs de transcription commun est devenu un point fondamental à élucider dans le cadre du fonctionnement de ces voies.

Aussi, concernant la compréhension du fonctionnement de la voie osmosensing, une question majeure porte sur l'existence de RR-B spécifiquement impliqués dans cette voie, non seulement au niveau de leur identité mais aussi au niveau des mécanismes permettant le maintien de la spécificité.

C'est dans ce contexte que s'est articulé ce travail de thèse visant à identifier et caractériser des facteurs de transcription appartenant à la famille des Régulateurs de Réponse de type B impliqués dans la réponse à la sécheresse chez le peuplier.

Nous nous sommes donc fixés deux objectifs majeurs :

- Déterminer quels RR-B pouvaient être spécifiquement impliqués dans la réponse à la sécheresse au travers d'une analyse de leur régulation génique.
- Caractériser ces RR-B candidats en termes de fonctionnalité structurale ou biologique en vue de déterminer leur rôle dans la voie de signalisation de la contrainte osmotique.

I – ETUDE DE LA REGULATION DES *RR-B*

Afin de répondre à notre premier objectif, nous avons abordé la question selon deux approches :

- La première visait à réaliser une analyse exhaustive de la régulation des gènes codant la totalité des *RR-B* par la technique de RT-PCR en temps réel en condition de stress osmotique. Ce travail visait à restreindre la caractérisation fonctionnelle uniquement aux gènes pour lesquels nous aurions observé une augmentation de la transcription.
- La deuxième visait à obtenir des informations tissu-spécifiques de la régulation de ces gènes sous l'action de différents *stimuli* dont un stress osmotique ou les cytokinines par le biais de l'étude de la régulation de leurs promoteurs *via* une approche de transgénèse.

I-1-Première approche : Etude de la régulation des gènes codant les *RR-B*

Au cours de travaux précédents auxquels j'ai participé, nous avons pu montrer, *via* l'approche de RT-PCR en temps réel, l'augmentation de la régulation des gènes *RR13* et *RR18* (Thèse L. Bertheau, 2013 ; Bertheau *et al.*, 2015) lors d'un stress osmotique.

Ce travail a fait l'objet d'une publication dans laquelle je suis co-auteur et qui est présentée en ANNEXE 10.

Ces résultats ont validé le choix du *RR13* et du *RR18* comme facteurs de transcription intéressants et potentiellement importants dans la voie osmosensing.

D'autre part, des résultats préliminaires obtenus par la technique de RT-PCR semi-quantitative, semblent indiquer une régulation du *RR19* au bout de 2 heures de stress par application de PEG₆₀₀₀ dans les feuilles de peuplier. Ces résultats, s'ils sont confirmés, font du *RR19* une cible très intéressante.

I-2- Deuxième approche : Etude de la régulation des promoteurs de *RR-B* cibles

L'approche de transgénèse a été menée sur une sélection de *RR-B*, dont les *RR13*, *18*, *19* et *22*. Le choix des *RR13* et *18* s'est fait sur la base des résultats obtenus au cours de l'étude précédente. Le choix des *RR19* et *22*, s'est par contre fait par le biais de leur proximité de séquence avec le *RR18*. Le rôle avéré de l'*ARR18* en tant que facteur de transcription important dans la perception de la sécheresse chez *Arabidopsis* a conforté ce choix (Veerabagu *et al.*, 2014). De précédents travaux ont montré que la teneur en transcrits du gène *HK1a* lors d'un stress osmotique dans les racines était augmentée en corrélation avec celle des transcrits du *RR13* (Chefdor *et al.*, 2006 ; Thèse L. Bertheau, 2013). Ces résultats suggéraient que le *RR13* pouvait être un facteur de transcription potentiellement régulateur du gène *HK1a*. Nous avons ainsi étendu notre étude aux promoteurs des gènes codant les récepteurs *HK1a* et *HK1b*.

Nous avons ainsi isolé les parties recherchées des promoteurs des gènes *HK1a*, *RR13* et *18* ainsi qu'une partie des zones de promoteur recherchées des gènes *RR19* et *22*.

L'analyse bio-informatique de ces différents promoteurs soit à partir des séquences que nous avons amplifiées, soit des séquences complétées *via* des données *in silico*, a permis de mettre en évidence la présence de sites de fixation des *RR-B*. Ces sites potentiels de fixation contiennent tous la séquence consensus 5'-(A/G)GAT(T/C)-3'.

La présence de ces sites suggère que ces gènes pourraient être régulés lors de stress osmotique ou par les cytokinines *via* la fixation des *RR-B*.

Toutefois, au stade actuel de nos travaux, nous ne pouvons pas encore donner de précisions concernant la spécificité de ces séquences *cis*-régulatrices en fonction des *stimuli* perçus à savoir si ce sont des séquences de fixation de RR-B liés au signal « cytokinines » ou « stress osmotique ».

Récemment, [Ariel et al. \(2012\)](#) ont montré que, si le cœur de cette séquence était commun à plusieurs RR, son environnement pouvait contribuer à la spécificité de fixation des RR. Afin pouvoir déterminer plus précisément la spécificité de ces séquences, des études portant sur la caractérisation fonctionnelle des promoteurs tronqués ou mutés au niveau des séquences de fixation pourront être envisagées à la fois *via* une approche de transgénèse ou *via* une approche de *trans*-activation. Ces séquences pourront alors être mises en relation avec le stress appliqué nous permettant de déterminer les séquences de fixation de RR-B liées à la réponse au stress osmotique.

Concernant le récepteur :

Les transformations de plants de peuplier avec la construction *promHK1a-GUS* ont été réalisées et vérifiées. Des essais préliminaires ont montré une augmentation de l'activité de ce promoteur au niveau des feuilles matures lors de l'application du stress osmotique. De la même manière, une très forte augmentation de l'activité du promoteur de *HK1a* a été observée au niveau du système racinaire des deux lignées testées lors d'un apport en cytokinine (BAP). Ces premiers résultats prometteurs devront être confirmés.

Une étude similaire a été menée avec la région promotrice (d'une taille de 1.6 kb) du promoteur du récepteur AHK1. Cette étude a montré une expression induite du gène rapporteur *GUS* lors de changements des conditions d'osmolarité du milieu extérieur (250 mM de NaCl, déshydratation, eau distillée) et même au froid ([Urao et al., 1999](#)) dans les racines et les pétioles de plantules d'*Arabidopsis*.

L'ensemble de ces résultats confortent l'idée de l'implication de la protéine HK1a dans les processus de perception et de réponse à la contrainte osmotique dans le peuplier ([Chefdor et al., 2006](#) ; [Héricourt et al., 2013](#)) ainsi qu'un lien avec la voie des cytokinines. Ces résultats confirment bien l'interconnexion des voies osmosensing et cytokinines évoquée dans la littérature.

L'étude de l'impact de stress osmotiques d'intensités et de durées variables (cinétique courte et longue) pourra être envisagée afin de déterminer la localisation exacte de l'expression du gène *HK1a*.

Une étude similaire pourra être menée en parallèle avec le promoteur de *HK1b*, afin de déterminer si ces deux gènes paralogues possèdent des spécificités de fonctions l'un vis-à-vis de l'autre *in planta* lors de la contrainte osmotique. Un premier élément de réponse a été obtenu très récemment, puisque des comportements différents (performance différente en termes d'activité kinase et d'osmosensing en levure) ont été observés entre les deux récepteurs ([Héricourt et al., 2016](#)).

L'analyse bio-informatique des promoteurs des deux récepteurs corrobore également cette hypothèse, puisqu'elle a permis de mettre en évidence dans la séquence du promoteur de *HK1b* la présence d'éléments *cis*-régulateurs tels des sites potentiels de réponse à l'ABA, à l'acide salicylique, aux gibbérellines, à l'éthylène et aux basses températures, tous absents du promoteur de *HK1a*.

Il a été établi que chez les espèces végétales, 65% du génome végétal est dupliqué, et que certains gènes sont plus particulièrement concernés par ces phénomènes de duplication comme par exemple les gènes impliqués dans la signalisation cellulaire ([Panchy et al., 2016](#)). L'évènement de duplication est, semble-t-il, responsable de l'apparition de fonctions nouvelles ou de modulation de fonctions préexistantes. Ainsi, la duplication du récepteur HK1 pourrait très bien avoir abouti à la mise en place de deux récepteurs aux fonctions différentes pour permettre une meilleure adaptabilité du peuplier face aux variations environnementales telle la diminution en disponibilité en eau.

Les peupliers transformés exprimant les constructions *promHK1a-GUS* et *promHK1b-GUS* permettront d'étudier la variabilité d'expression de ces gènes lors de différents *stimuli* et nous donneront ainsi la confirmation de rôles différents de ces deux récepteurs.

Concernant les RRs :

Nous disposons actuellement de peupliers transformés avec la construction promRR13-GUS et aurons très prochainement ceux contenant la construction promRR18-GUS. Nous pourrions ainsi réaliser des études d'expression du gène rapporteur *GUS* sous contrôle de ces promoteurs RR13 et RR18. Des expériences similaires seront aussi effectuées lorsque nous aurons isolés les promoteurs des gènes RR19 et RR22 afin de compléter les données relatives à la régulation de ces RR-B.

Les résultats obtenus au cours de cette première partie nous ont donc permis de montrer que les RR13, 18, 19 étaient régulés par le stress osmotique.

Notre objectif de départ visant à sélectionner des RR-B régulés par ce stress afin de réaliser des études plus complètes a été rempli pour ces RR. Nous avons cependant retenu le RR22 pour nos études ultérieures en raison de son homologie avec les RR18 et 19.

La présence de régions *cis*-régulatrices spécifiques des RR-B dans les promoteurs des gènes codant la fois les récepteurs et les RR-B semble indiquer l'importance des RR-B dans la régulation de l'expression de ces gènes.

En conséquence, nous avons focalisé nos études sur les RR13, 18, 19 et 22 afin de déterminer plus spécifiquement quelle était leur implication dans la réponse du peuplier face à la sécheresse.

II- CARACTERISATION FONCTIONNELLE DE RR-B CANDIDATS.

Notre deuxième objectif visait à caractériser ces RR-B candidats en termes de fonctionnalité structurale ou biologique en vue de déterminer leur implication dans la voie de signalisation de la contrainte osmotique. Cet objectif a été abordé selon deux approches :

- la première consistait à déterminer la fonctionnalité des RR-B cibles par le biais de l'étude du fonctionnement de leurs domaines fonctionnels, soit le domaine GARP responsable de la fixation du RR-B sur sa séquence ADN cible, soit le domaine DDK aussi appelé domaine receveur, responsable de la dimérisation du facteur de transcription, condition nécessaire au bon fonctionnement de ces protéines.
- la seconde consistait à déterminer la fonctionnalité des RR-B cibles par l'étude d'une part de leur capacité à activer la transcription de promoteurs liés à la réponse au stress osmotique, et d'autre part, par l'étude de l'impact de leur absence durant le même type de contrainte *in planta*.

II-1-Première approche : Etude des domaines fonctionnels

Etude du domaine GARP

Nous avons envisagé une étude par gel retard de la capacité de fixation des RR18, 19 et 22 sur des séquences ADN déterminées, comme ce qui avait été réalisé pour le RR13 (Thèse L. Bertheau, 2013). Dans cette précédente étude, la capacité de fixation du RR13 sur le motif consensus 5'-(A/G)GAT(T/C)-3', séquence cible des RR-B liés à la signalisation des cytokinines, a pu être démontrée.

Notre premier objectif pour les trois RR était de déterminer leur capacité ou non à se lier à ce motif consensus.

L'approche gel retard nécessite la production en masse des partenaires protéiques à étudier. C'est à cette étape que nous avons rencontré des difficultés, vraisemblablement liées à la nature des différents domaines GARP étudiés. En effet, certaines variations en acides aminés des domaines GARP pourraient être responsables de modifications des propriétés physicochimiques de ce domaine, ayant de ce fait entraîné ces difficultés de production. L'impossibilité d'obtenir une protéine recombinante nous a empêché de pouvoir continuer nos expériences afin d'identifier *in vitro* la séquence spécifique de fixation de RR-B liés au stress osmotique.

Toutefois, la caractérisation fonctionnelle des promoteurs de *HK1a*, *HK1b* et des *RR18*, *19* et *22* notamment via des études d'impact de délétion, semble être une bonne alternative et devrait nous permettre à moyen terme de déterminer plus précisément des zones *cis*-régulatrices impliqués dans la réponse à la sécheresse.

Etude du domaine DDK

Au début de ce travail, nous disposions de peu d'informations quant à la capacité de dimérisation des RR-B. A l'exception de certaines données relatives à la capacité de dimérisation de l'ARR14 (Dortay *et al.*, 2006 ; 2008) et de l'ARR18 (Veerabagu *et al.*, 2012), aucune étude exhaustive n'avait été réalisée.

De précédents travaux de l'équipe ont montré que le domaine DDK est responsable de la dimérisation *via* son interface $\alpha 4$ - $\beta 5$ - $\alpha 5$. La présence d'un motif particulier appelé le motif PIRIE ainsi que son importance dans le processus de dimérisation a pu être déterminée. De plus, l'intérêt crucial du glutamate dans le processus de dimérisation a été démontré par des études de mutagenèse dirigée (changement du glutamate en lysine) (Thèse L. Bertheau, 2013).

Ainsi, la présence du résidu lysine (K) naturellement présent dans ce motif pour certains RR-B nous avait interpellés sur la capacité de ceux-ci à dimériser. C'est ainsi que nous avons décidé dans le cadre de cette approche d'étendre notre étude à l'ensemble des RR-B de peuplier.

Lors de cette étude, nous avons mis en évidence différentes modalités de dimérisation.

1 - L'homodimérisation de tous les RR-B a été observée à l'exception du RR19 qui n'a pu être testée.

Ainsi, la présence du résidu K n'altère pas la capacité de dimérisation vraisemblablement grâce à une répartition différente des charges mises en jeu pour la formation du dimère.

Cependant, nous avons observé une faible capacité d'homodimérisation du RR15 ce qui semble indiquer un mécanisme d'action différent de ce RR-B. La paire 15-16 étant caractérisée par un motif PIRIE, l'apparition d'une double charge négative dans ce motif (EE) doit sûrement nécessiter une double charge positive dans le second monomère au niveau de l'hélice $\alpha 4$ afin de compenser les charges. En comparant les deux séquences des RR15 et 16, il apparait en effet une double charge positive pour le RR16 en fin d'hélice $\alpha 4$ ce qui n'est pas le cas pour le RR15. Cette différence doit probablement être responsable de la faible capacité à homodimériser de ce RR. Ce résultat questionne sur le rôle du RR15 dans une voie de signalisation si celui-ci ne présente qu'une faible capacité à homodimériser.

L'homodimérisation étant un mécanisme majeur du fonctionnement de certains facteurs de transcription dont ceux appartenant au groupe HTH (Hélice-Tour-Hélice) (Beuck *et al.*, 2012), comme cela est le cas pour les RR-B, nous avons ainsi montré la capacité d'homodimérisation de la totalité des RR-B, ceci étant un argument en faveur de leur fonctionnalité.

2 - L'hétérodimérisation entre RR-B au sein d'une même paire a été observée.

Chez le peuplier, notre équipe avait déterminé par une approche phylogénétique que les RR-B existaient sous forme de paires, correspondant à des protéines ayant des séquences possédant de très fortes homologies (Bertheau *et al.*, 2012 ; 2015). Ainsi, tous les RR-B à l'exception du RR22 correspondent à des gènes dupliqués. Comme expliqué pour le récepteur HK1, les facteurs de transcription appartiennent à la catégorie de gènes fortement dupliqués au même titre que la majeure partie des gènes impliqués dans les phénomènes de signalisation (Panchy *et al.*, 2016).

Lors de ce travail, nous avons montré que tous les RR-B étaient donc capables d'hétérodimériser entre paires. Ce résultat était ainsi attendu au vue des très fortes homologies des séquences protéiques. Nous avons constaté que la dimérisation entre RR-B d'une même paire nécessitait un motif situé dans l'hélice $\alpha 4$ strictement identique à l'exception des RR18 et 19. En effet pour cette paire, la modification observée dans le motif cible n'altérait en rien sa capacité de dimérisation en raison probablement de la conservation du caractère hydrophobe de l'acide aminé concerné (méthionine ou leucine).

3- L'hétérodimérisation entre RR-B de paires différentes a été observée

Si l'hétérodimérisation entre deux membres d'une même paire pouvait être attendue, la capacité de former des dimères entre RR-B de paires différentes est un résultat très remarquable. En effet, l'hétérodimérisation est un processus de régulation des facteurs de transcription pouvant aboutir à la modification de spécificité de liaison à l'ADN ou au recrutement de co-facteurs. Ces modifications ont pour objectif d'aboutir à une régulation plus fine de la régulation de la transcription. L'hétérodimérisation pourra ainsi être guidée soit par le signal lui-même, soit par l'expression différentielle des RR-B.

Ce résultat est particulièrement intéressant en termes de régulation d'activité transcriptionnelle et de modulation de réponse des plantes lors de contraintes.

En effet, dans le cadre du MSP, l'hétérodimérisation pourrait permettre d'une part d'accentuer ou d'accélérer la réponse apportée par la plante ou bien de moduler une réponse en fonction d'autres signaux intégratifs. En effet, la détection d'une sécheresse peut par exemple être concomitante avec la détection d'un autre stimulus, pouvant potentiellement permettre le recrutement de plusieurs partenaires issus de voies de signalisation différentes et dont l'interaction pourra produire une réponse « sur mesure » de la plante. Dans la même idée, l'hétérodimérisation pourrait permettre la séquestration d'un partenaire par un phénomène de compétition et ainsi représenter un autre moyen de modulation des réponses apportées.

4 - L'absence d'hétérodimérisation de certains RR-B voire de certaines paires.

Nous avons pu montrer la divergence de comportement de certains RR-B d'une paire comme par exemple le RR18 présentant moins de capacité d'interaction que le 19 ou encore le RR21 par rapport au RR14. Il apparait donc que si l'évolution a permis la mise en place de cette duplication, le comportement différentiel de ces RR conforte l'hypothèse de fonctions différentes des membres d'une paire.

En effet, il est maintenant établi que la duplication de gènes est un processus important pour permettre aux plantes une meilleure adaptabilité aux fluctuations de leur environnement et leur permettre ainsi une meilleure tolérance aux stress biotiques et abiotiques *via* l'acquisition de fonctions nouvelles (Kong *et al.*, 2007 ; Panchy *et al.*, 2016).

Enfin, l'observation d'une absence complète de dimérisation entre certaines paires est un résultat totalement inattendu comme par exemple, l'absence de dimérisation entre la paire 14-21 et les paires 12-13 et 18-19. Ce résultat particulièrement intéressant pourrait permettre la mise en place de voies de signalisation spécifiques par ces RR-B.

Cette étude a permis d'obtenir d'une part un interactome pour les RR-B et de vérifier leur fonctionnalité par la mise en évidence de leur capacité d'homodimérisation et d'hétérodimérisation. D'autre part, nous avons mis en évidence des différences de comportements des RR18, 19 et 22. Ainsi, ces RR-B sont capables d'homodimériser et d'hétérodimériser au sein de la paire (18-19) aussi bien qu'au sein du groupe étendu (18-19-22). De manière très intéressante, ces RR-B ont donc des capacités d'interaction différentes puisque que le RR18 a montré le réseau d'interaction le plus restreint (4 partenaires) comparativement au RR19 (5 partenaires) et au RR22 (6 partenaires). De plus, c'est également le RR18 qui a présenté des forces d'interactions les plus faibles vis-à-vis de ses partenaires. Ces différences de capacité d'interaction sont sans aucun doute le reflet de différences de comportement et de capacité de participation à des voies de signalisation ou de modulation de ces voies de signalisation et seraient à mettre en relation avec les études de localisation d'activités promotrices à réaliser.

Il n'est toutefois pas à exclure que ce type de RR pourrait très bien agir à la fois en tant que facteurs de transcription propre ou en association avec d'autres facteurs de transcription de type RR-B *via* l'hétérodimérisation ou *via* un recrutement d'autres facteurs de transcription. En effet, il a été montré que les RR-B pouvaient être des partenaires d'autres facteurs de transcription, avec l'exemple récent de l'hétérodimérisation de l'ARR18 avec un bZIP (Veerabagu *et al.*, 2014). Ces capacités permettraient un niveau de modulation supplémentaire afin d'aider à la mise en place d'une réponse plus adaptée des plantes à la contrainte.

Cette piste s'avère particulièrement intéressante dans l'optique de mieux comprendre la mise en place de réponses spécifiques.

En perspective de ce travail, et en vue de valoriser nos résultats, nous confirmerons les interactions et absence d'interaction *via* une technique différente (BiFC) afin de les publier. Ceci est envisagé dans les deux mois à venir.

Il serait aussi particulièrement intéressant de rechercher d'autres facteurs de transcription pouvant participer à la formation de complexes transcriptionnels spécifique de la réponse au stress hydrique comme ce qui a pu être observé pour ARR18.

II-2-Deuxième approche : Etude de la fonctionnalité *in planta*

Cette seconde approche consistait à :

1 - Déterminer la fonctionnalité des RR-B cibles par le biais de l'étude de leur capacité à activer la transcription de promoteurs liés à la réponse au stress osmotique

2 - Déterminer la fonction des RR-B en étudiant l'impact de leur absence durant le même type de contrainte *in planta*.

cis-régulatrice soit présent dans ces promoteurs, ces résultats mettent en avant l'importance de la connaissance des séquences étendues afin de déterminer les séquences spécifiques des signaux.

D'autre part, même si les RR18 et 22 ne montrent dans ces premières expériences, aucune capacité de *trans*-activation, il peut être envisagé que ces RR-B fonctionnent par recrutement d'autres facteurs de transcription tels des facteurs de transcription de type Myb puisque des boîtes de fixation de ces facteurs de transcription ont été retrouvées dans le promoteur du gène *HK1a*. Ces mêmes boîtes ont également été retrouvées dans le promoteur du *RR18*. Puisque l'homologue du RR18 chez *Arabidopsis* est capable d'interagir avec un facteur de transcription de type bZIP pour réguler les réponses de la plante à la perception d'une contrainte osmotique (Veerabagu et al. 2014), les RR-B pourraient donc très bien réguler de manière indirecte certains gènes par recrutement de partenaires additionnels.

Enfin, il semblerait que le RR19 puisse être considéré comme un candidat de réel intérêt vis-à-vis d'une implication dans la voie de signalisation osmosensing chez le peuplier. Nos résultats devront être confirmés et la réalisation de ces tests dans le peuplier devrait nous permettre d'étoffer nos conclusions quant à l'importance de ce RR. En effet, la mise en évidence de la régulation de ce RR-B par le stress osmotique (au bout de 2 heures), l'absence de régulation de ce RR-B après apport de cytokinine (Ramírez-Carvajal et al., 2008) ainsi que sa capacité à activer la transcription de gènes liés au stress osmotique, font de ce RR-B un facteur de transcription important.

Ce RR19 pourrait être un RR-B spécifique de la voie osmosensing.

A plus long terme, une approche ChIP pourrait être envisagée si nous montrions une réelle implication de ces gènes dans la voie de signalisation stress osmotique. Cette approche nous donnerait ainsi accès directement à une multitude de gènes cibles de ces RR-B.

II -2- 1 Détermination de l'impact de l'absence de ces RR-B *in planta*

Afin de mettre en évidence l'importance des RR18, 19 et 22 dans la signalisation et la réponse des plantes au stress osmotique, nous avons adopté la stratégie d'extinction de gènes *via* la technique de silencing des messagers, ou ARN interférentiel. Cette stratégie permet d'obtenir des lignées transformées stables, matériel de choix pour l'étude de la fonction d'un gène chez la plante (Waterhouse and Helliwell, 2003).

Afin de mettre en place nos lignées, nous avons dû retrouver les séquences de ces gènes dans le génotype 717-1B4, construire les ARN « en épingle à cheveux » et réaliser les souches d'*Agrobacterium* pour les transformations. Toutes ces étapes ont été réalisées avec succès.

Nous avons également pu obtenir des transformants et régénérer des boutures pour chacune des transformations. Ces étapes de régénération n'étaient pas forcément évidentes à obtenir.

De plus, il est établi que la stratégie d'extinction de gènes par apport d'un ARN en « épingle à cheveux » provoque chez la plante transformée par la même construction des phénotypes et des niveaux d'extinction du messager variables (Stoutdjesdijk et al., 2002). Il a ainsi été montré que les niveaux d'ARNm obtenus pouvaient varier d'un niveau similaire à celui obtenu pour un plant ne contenant pas la construction, à des niveaux indétectables (Stoutdjesdijk et al., 2002 ; Helliwell et al., 2002). Cependant, il semblerait que l'apport d'un intron dans la structure en « épingle à cheveux », comme c'est le cas dans notre stratégie, permette d'aboutir à des effets plus visibles ou mesurable pour 70 à 100% des plants transformés (Wesley et al., 2001 ; Helliwell et al., 2002).

Si nos RR-B ont réellement été éteints, la régénération de boutures de peuplier serait un élément indicateur que ceux-ci ne sont pas impliqués dans des processus développement nécessaires à

la régénération contrôlée par les cytokinines. La difficulté de régénération observée pour les cals d'*Arabidopsis* mutés pour les *ARR1* et *12* confortent cette observation (Hill and Schaller, 2013)

Nous avons donc réussi à obtenir des lignées pour lesquelles nous devons encore vérifier l'extinction de l'expression des gènes *RR18*, *19* et *22*. Ces étapes de vérifications devraient être réalisées très prochainement.

Si cette extinction s'avère positive, nous disposerons donc au laboratoire d'outil important afin d'étudier la fonction et les rôles de ces facteurs de transcription au cours de la signalisation liée au stress osmotique et également au cours de la sécheresse.

En conclusion, au cours de ce travail, nous avons obtenu des résultats permettant d'étoffer nos connaissances du MSP de peuplier.

Les résultats phares de ce travail portent sur :

1 - L'isolement des promoteurs de gènes clés de cette voie de signalisation. Nous avons ainsi pu obtenir des peupliers transformés qui nous permettront de connaître la régulation et l'expression spatio-temporelle de ces gènes. Ces mêmes promoteurs nous donneront accès aux séquences *cis*-régulatrices et l'application de la technique d'étude de *trans*-activation par agroinfiltration sur le peuplier permettra au laboratoire d'envisager des études plus ciblées sur ces séquences.

2 - La mise en évidence de la fonction de facteur de transcription des *RR13*, et *19* et de l'implication du *RR19* dans la régulation de gènes liés au stress osmotique (*Figure 52*).

Ce résultat pour le *RR19* ainsi que l'absence de capacité de *trans*-activation du *RR13* sur les promoteurs *HK1a* et *RR18*, vient étayer l'hypothèse de spécificité des *RR-B*.

3 - La mise en évidence de la capacité d'homodimérisation et d'hétérodimérisation des *RR-B* ainsi que celle d'absence stricte de formation de dimère pour certains, résultat inattendu dont l'impact devra être déterminé dans la mise en place de spécificité de voie chez ces facteurs de transcription.

4 - La mise en place de lignées RNAi pour les *RR18*, *19* et *22* qui pourront être utilisées par le laboratoire afin de poursuivre la recherche du (ou des) rôle(s) de ces *RR-B*.

Ainsi, en fonction de la mise en évidence du rôle de l'*ARR18* dans la voie de signalisation lié au stress hydrique et osmotique (Veerabagu *et al.*, 2014), nous avons concentré nos efforts sur l'homologue de peuplier, le *RR18*. Cependant, au regard de la bibliographie, l'*ARR18* semble être un facteur de transcription commun aux deux voies de signalisation puisque répondant aux deux signaux (CK et stress osmotique) et mettant en place des réponses contraires, inhibition de l'élongation racinaire dans le premier cas et stimulation de l'élongation racinaire dans l'autre (Veerabagu *et al.*, 2012 ; 2014). Pour le *RR18*, nous avons montré sa régulation par le stress osmotique mais pas de manière claire sa capacité à activer la transcription de gènes liés au stress osmotique (*Figure 52*). Ce *RR18* pourrait très bien être un facteur de transcription commun aux deux voies de signalisation. Par contre, le *RR19*, sur lequel nous avons travaillé semblerait être un *RR-B* spécifique de la voie osmosensing. Nous devons confirmer ce résultat et vérifier l'absence de régulation par les cytokinines dans notre génotype, mais cette absence de régulation chez *P. trichocarpa* est déjà un bon indicateur. En ce qui concerne le *RR22*, nous n'avons à ce stade de notre travail obtenu aucune information nous éclairant quant à son rôle dans le MSP.

Le RR18 semblerait être un RR-B commun aux deux voies et le RR19 semblerait spécifique de la voie osmosensing. La paire 18-19, correspondant à des gènes dupliqués, pourraient donc avoir des rôles très différents et des implications différentes dans les voies de signalisation cytokinines et stress osmotique.

Il semblerait ainsi, que la tolérance à la sécheresse puisse être stimulée par la réduction des teneurs en CK actives ou par la répression de la voie de signalisation des cytokinines (Ha *et al.*, 2012). Cette répression des teneurs en cytokinines lors d'un stress hydrique (Argueso *et al.*, 2009 ; Nishiyama *et al.*, 2011) permettrait de favoriser le MSP osmosensing et des RR-B spécifiques pourraient être activés comme le RR19. Des RR-B communs aux deux voies comme le RR18, qui, s'il fonctionne comme son homologue ARR18, pourraient quant à eux se fixer prioritairement sur des gènes de réponse au stress hydrique certainement par recrutement d'autres facteurs de transcription de type bZIP comme montré chez *Arabidopsis* (Veerabagu *et al.*, 2014).

Le rôle régulateur des RR-A devra être également étudié avec attention ainsi celui des RR-C puisque l'implication d'un RR-C, ARR22, dans la tolérance à la déshydratation a pu être mis en évidence chez *Arabidopsis* (Kang *et al.*, 2013).

De la même manière, le rôle des Pseudo-RR dans la tolérance n'a à ce jour peu été étudié, cependant il a pourtant été montré que ces pseudo-régulateurs pouvaient fixer des calmoduline-like protéines impliquées dans la modulation de la réponse au stress hydrique et salin comme Cml9 (Perochon *et al.*, 2010). Ainsi, une connexion entre MSP et signalisation calcique pourrait tout à fait être possible et particulièrement intéressante. L'appellation pseudo-régulateur provient de l'absence du résidu aspartate canonique sensé être phosphorylé. Nos travaux récents sur HK1b montrent que ce récepteur ne se phosphoryle pas sur les résidus histidine et aspartate canoniques (Héricourt *et al.*, 2016, soumis) et d'autre part, PRR7 d'*Arabidopsis* a été montré phosphorylé probablement sur un résidu sérine ou thréonine (Farré et Kay 2007). L'importance de ce Pseudo-RR a pu être démontré dans le rythme circadien (Farré *et al.*, 2005 ; Schaller *et al.*, 2008). Ainsi, ces Pseudo-RR pourraient avoir un rôle dans la tolérance à la sécheresse.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Aasland, R., Stewart, A.F., and Gibson, T. (1996). The SANT domain: a putative DNA-binding domain in the SWI-SNF and ADA complexes, the transcriptional co-repressor N-CoR and TFIIIB. *Trends in Biochemical Sciences*, 21, 87–88.
- Abdallah, H., and Bauer, P. (2016). Quantitative Reverse Transcription-qPCR-based gene expression analysis in plants. In *Plant Signal Transduction*, J.R. Botella, and M.A. Botella, eds. (Springer New York), 1363, 9–24.
- Ahanger, M.A., Tyagi, S.R., Wani, M.R., and Ahmad, P. (2014). Drought tolerance: role of organic osmolytes, growth regulators, and mineral nutrients. In *Physiological Mechanisms and Adaptation Strategies in Plants under Changing Environment*, P. Ahmad, and M.R. Wani, eds. (Springer New York), 1, 25–55.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215, 403–410.
- Amini, A., Andreu, F., Glevarec, G., Rideau, M., and Creche, J. (2012). Down-regulation of the CrHPT1 histidine phosphotransfer protein prevents cytokinin-mediated up-regulation of CrDXR, and CrG10H transcript levels in periwinkle cell cultures. *Molecular Biology Reports*, 39, 8491–8496.
- Anantharaman, V., and Aravind, L. (2001). The CHASE domain: a predicted ligand-binding module in plant cytokinin receptors and other eukaryotic and bacterial receptors. *Trends in Biochemical Sciences*, 26, 579–582.
- Argueso, C.T., Ferreira, F.J., and Kieber, J.J. (2009). Environmental perception avenues: the interaction of cytokinin and environmental response pathways. *Plant Cell and Environment*, 32, 1147–1160.
- Ariel, F., Brault-Hernandez, M., Laffont, C., Huault, E., Brault, M., Plet, J., Moison, M., Blanchet, S., Ichante, J.L., Chabaud, M., Carrere, S., Crespi, M., Chan, R. L., and Frugier, F. (2012). Two direct targets of cytokinin signaling regulate symbiotic nodulation in *Medicago truncatula*. *The Plant Cell*, 24, 3838–3852.
- Ashenberg, O., and Laub, M.T. (2013). Using analyses of amino acid coevolution to understand protein structure and function. *Methods in Enzymology*, 523, 191–212.
- Ashenberg, O., Rozen-Gagnon, K., Laub, M.T., and Keating, A.E. (2011). Determinants of homodimerization specificity in histidine kinases. *Journal of Molecular Biology*, 413, 222–235.

B

- Bachhawat, P., and Stock, A.M. (2007). Crystal structures of the receiver domain of the response regulator PhoP from *Escherichia coli* in the absence and presence of the phosphoryl analog beryllifluoride. *Journal of Bacteriology*, 189, 5987–5995.
- Bachhawat, P., Swapna, G.V.T., Montelione, G.T., and Stock, A.M. (2005). Mechanism of activation for transcription factor PhoB suggested by different modes of dimerization in the inactive and active states. *Structure*, 13, 1353–1363.
- Baikalov, I., Schröder, I., Kaczor-Grzeskowiak, M., Grzeskowiak, K., Gunsalus, R.P., and Dickerson, R.E. (1996). Structure of the *Escherichia coli* response regulator NarL. *Biochemistry*, 35, 11053–11061.
- Barbieri, C.M., Wu, T., and Stock, A.M. (2013). Comprehensive analysis of OmpR phosphorylation, dimerization, and DNA binding supports a canonical model for activation. *Journal of Molecular Biology*, 425, 1612–1626.
- Barrero, J.M., Piqueras, P., González-Guzmán, M., Serrano, R., Rodríguez, P.L., Ponce, M.R., and Micol, J.L. (2005). A mutational analysis of the *ABA1* gene of *Arabidopsis thaliana* highlights the involvement of ABA in vegetative development. *Journal of Experimental Botany*, 56, 2071–2083.

- Bauer, J., Reiss, K., Veerabagu, M., Heunemann, M., Harter, K., and Stehle, T. (2013). Structure-function analysis of *Arabidopsis thaliana* histidine kinase AHK5 bound to its cognate phosphotransfer protein AHP1. *Molecular Plant*, 6, 959–970.
- Belrose, V., Nageleisen, L.-M., and Renaud, J.-P. (2004). Les conséquences de la canicule et de la sécheresse sur la santé des forêts : bilan à la fin de l'année 2003. Département de la Santé des Forêts.
- Benveniste-Levkovitz, P., Canaani, O., Gromet-Elhanan, Z., and Atsmon, D. (1993). Characterization of drought resistance in a wild relative of wheat, *Triticum kotschyi*. *Photosynthesis Research*, 35, 149–158.
- Bertheau, L. (2013). Caractérisation d'un phosphorelais multiple de type histidine-aspartate dans la transduction du signal de la contrainte osmotique chez le peuplier. Université d'Orléans.
- Bertheau, L., Chefdor, F., Guirimand, G., Courdavault, V., Depierreux, C., Morabito, D., Brignolas, F., Héricourt, F., and Carpin, S. (2012). Identification of five B-type response regulators as members of a multistep phosphorelay system interacting with histidine-containing phosphotransfer partners of *Populus* osmosensor. *BioMedical Centre Plant Biology*, 12, 241.
- Bertheau, L., Miranda, M., Foureau, E., Rojas Hoyos, L.F., Chefdor, F., Héricourt, F., Depierreux, C., Morabito, D., Papon, N., Clastre, M., Scippa G. S., Brignolas, F., Courdavault, V., and Carpin S., (2013). *In planta* validation of HK1 homodimerization and recruitment of preferential HPt downstream partners involved in poplar multistep phosphorelay systems. *Plant Biosystems*, 147, 991–995.
- Bertheau, L., Djeghdir, I., Foureau, E., Chefdor, F., Glevarec, G., Oudin, A., Depierreux, C., Morabito, D., Brignolas, F., Courdavault, V., Héricourt, F., Auguin, D., and Carpin, S., (2015). Insights into B-type RR members as signaling partners acting downstream of HPt partners of HK1 in the osmotic stress response in *Populus*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 94, 244–252.
- Beuck, C., Qu, S., Fagg, W.S., Ares, M., and Williamson, J.R. (2012). Structural analysis of the quaking homodimerization interface. *Journal of Molecular Biology*, 423, 766–781.
- Bhaskara, G.B., Yang, T.-H., and Verslues, P.E. (2015). Dynamic proline metabolism: importance and regulation in water limited environments. *Frontiers in Plant Science*, 6, 484.
- Bilwes, A.M., Quezada, C.M., Croal, L.R., Crane, B.R., and Simon, M.I. (2001). Nucleotide binding by the histidine kinase CheA. *Nature Structural Biology*, 8, 353–360.
- Bourret, R.B., and Stock, A.M. (2002). Molecular information processing: lessons from bacterial chemotaxis. *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 9625–9628.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
- Brandstatter, I., and Kieber, J.J. (1998). Two genes with similarity to bacterial response regulators are rapidly and specifically induced by cytokinin in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 10, 1009–1019.
- Bray, E.A. (1997). Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Science*, 2, 48–54.
- Brignolas, F., Thierry, C., Guerrier, G., and Boudouresque, É. (2000). Compared water deficit response of two *Populus x euramericana* clones, Luisa Avanzo and Dorskamp. *Annals of Forest Science*, 57, 261–266.
- Busov, V.B., Brunner, A.M., Meilan, R., Filichkin, S., Ganio, L., Gandhi, S., and Strauss, S.H. (2005). Genetic transformation: a powerful tool for dissection of adaptive traits in trees. *New Phytologist*, 167, 9–18.
- Busov, V.B., Strauss, S.H., and Pilate, G. (2010). Transformation as a Tool for Genetic Analysis in *Populus*. In *Genetics and Genomics of Populus*, S. Jansson, R. Bhalerao, and A. Groover, eds. (New York, NY: Springer New York), 8, 113–133.

C

- Caesar, K., Thamm, A.M.K., Witthöft, J., Elgass, K., Huppenberger, P., Grefen, C., Horak, J., and Harter, K. (2011). Evidence for the localization of the *Arabidopsis* cytokinin receptors AHK3 and AHK4 in the endoplasmic reticulum. *Journal of Experimental Botany*, 62, 5571–5580.
- Capra, E.J., and Laub, M.T. (2012). Evolution of two-component signal transduction systems. *Annual Review of Microbiology*, 66, 325–347.
- Caruso, A., Morabito, D., Delmotte, F., Kahlem, G., and Carpin, S. (2002). Dehydrin induction during drought and osmotic stress in *Populus*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40, 1033–1042.
- Casino, P., Rubio, V., and Marina, A. (2009). Structural insight into partner specificity and phosphoryl transfer in two-component signal transduction. *Cell*, 139, 325–336.
- Casino, P., Miguel-Romero, L., and Marina, A. (2014). Visualizing autophosphorylation in histidine kinases. *Nature Communications*, 5, 3258.
- Chefdor, F., Bénédicti, H., Depierreux, C., Delmotte, F., Morabito, D., and Carpin, S. (2006). Osmotic stress sensing in *Populus*: components identification of a phosphorelay system. *FEBS Letters*, 580, 77–81.
- Cheung, J., and Hendrickson, W.A. (2010). Sensor domains of two-component regulatory systems. *Current Opinion in Microbiology*, 13, 116–123.
- Choi, H., Hong, J., Ha, J., Kang, J., and Kim, S.Y. (2000). ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. *The Journal of Biological Chemistry*, 275, 1723–1730.
- Cocoza, C., Trupiano D, Lustrato G, Alfano G, Vitullo D, Falasca A, Lomaglio T, De Felice V, Lima G, Ranalli G, Scippa, S., and Tognetti, R. (2015). Challenging synergistic activity of poplar–bacteria association for the Cd phytostabilization. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 19546–19561.
- Confalonieri, M., Balestrazzi, A., Bisoffi, S., and Cella, R. (1995). Factors affecting *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation in several black poplar clones. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 43, 215–222.
- Confalonieri, M., Balestrazzi, A., and Cella, R. (1997). Genetic transformation of *Populus deltoides* and *Px euramericana* clones using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 48, 53–61.
- Conseil National du Peuplier (2016). Sécurisation des approvisionnements en peuplier : étude prospective de la ressource française.
- Cotter, P.A., and Stibitz, S. (2007). c-di-GMP-mediated regulation of virulence and biofilm formation. *Current Opinion in Microbiology*, 10, 17–23.
- Cracker, L.E., and Abeles, F.B. (1969). Abscission: role of abscisic acid. *Plant Physiology*, 44, 1144–1149.
- Creager-Allen, R.L., Silversmith, R.E., and Bourret, R.B. (2013). A link between dimerization and autophosphorylation of the response regulator PhoB. *The Journal of Biological Chemistry*, 288, 21755–21769.
- Cseke, L.J., Cseke, S.B., and Podila, G.K. (2007). High efficiency poplar transformation. *Plant Cell Reports*, 26, 1529–1538.
- Cutcliffe, J.W., Hellmann, E., Heyl, A., and Rashotte, A.M. (2011). CRFs form protein-protein interactions with each other and with members of the cytokinin signalling pathway in *Arabidopsis* via the CRF domain. *Journal of Experimental Botany*, 62, 4995–5002.
- Cutler, S.R., Rodriguez, P.L., Finkelstein, R.R., and Abrams, S.R. (2010). Abscisic acid: emergence of a core signaling network. *Annual Review of Plant Biology*, 61, 651–679.

D

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

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

Deblock, M. (1990). Factors influencing the tissue-culture and the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of hybrid aspen and poplar clones. *Plant Physiology*, 93, 1110–1116.

Deng, Y., Dong, H., Mu, J., Ren, B., Zheng, B., Ji, Z., Yang, W.-C., Liang, Y., and Zuo, J. (2010). *Arabidopsis* histidine kinase CKI1 acts upstream of histidine phosphotransfer proteins to regulate female gametophyte development and vegetative growth. *The Plant Cell*, 22, 1232–1248.

Dickmann, D.I., and Kuzovkina, J. (2008). Poplars and willows of the world, with emphasis on silviculturally important species. In *Poplars and Willows: trees for Society and the Environment*, J.G. Isebrands, and J. Richardson, eds. (Wallingford: CABI), 8–91.

Dortay, H., Mehnert, N., Bürkle, L., Schmülling, T., and Heyl, A. (2006). Analysis of protein interactions within the cytokinin-signaling pathway of *Arabidopsis thaliana*: protein interactions in cytokinin signaling. *FEBS Journal*, 273, 4631–4644.

Dortay, H., Gruhn, N., Pfeifer, A., Schwerdtner, M., Schmülling, T., and Heyl, A. (2008). Toward an interaction map of the two-component signaling pathway of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Proteome Research*, 7, 3649–3660.

Duch, A., de Nadal, E., and Posas, F. (2012). The p38 and Hog1 SAPKs control cell cycle progression in response to environmental stresses. *FEBS Letters*, 586, 2925–2931.

Duplessis, S., Major, I., Martin, F., and Séguin, A. (2009). Poplar and pathogen interactions: insights from *Populus* genome-wide analyses of resistance and defense gene families and gene expression profiling. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 28, 309–334.

Durand, T.C., Hausman, J.F., Carpin, S., Alberic, P., Baillif, P., Label, P., and Morabito, D. (2010a). Zinc and cadmium effects on growth and ion distribution in *Populus tremula* × *Populus alba*. *Biologia Plantarum*, 54, 191–194.

Durand, T.C., Sergeant, K., Planchon, S., Carpin, S., Label, P., Morabito, D., Hausman, J.-F., and Renaut, J. (2010b). Acute metal stress in *Populus tremula* × *P. alba* (717-1B4 genotype): leaf and cambial proteome changes induced by cadmium 2+. *Proteomics*, 10, 349–368.

Durand, T.C., Baillif, P., Albéric, P., Carpin, S., Label, P., Hausman, J.-F., and Morabito, D. (2011). Cadmium and zinc are differentially distributed in *Populus tremula* × *P. alba* exposed to metal excess. *Plant Biosystems*, 145, 397–405.

E

Ebneth, A., Adermann, K., and Wolfes, H. (1994). Does a synthetic peptide containing the leucine-zipper domain of c-myb form an α -helical structure in solution? *FEBS Letters*, 337, 265–268.

Eriksson, M.E., Hanano, S., Southern, M.M., Hall, A., and Millar, A.J. (2003). Response regulator homologues have complementary, light-dependent functions in the *Arabidopsis* circadian clock. *Planta*, 218, 159–162.

Eulgem, T., and Somssich, I.E. (2007). Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, 10, 366–371.

F

- Farré, E.M., and Kay, S.A. (2007). PRR7 protein levels are regulated by light and the circadian clock in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 52, 548–560.
- Farré, E.M., Harmer, S.L., Harmon, F.G., Yanovsky, M.J., and Kay, S.A. (2005). Overlapping and distinct roles of PRR7 and PRR9 in the *Arabidopsis* circadian clock. *Current Biology*, 15, 47–54.
- Fassler, J.S., and West, A.H. (2010). Genetic and biochemical analysis of the Sln1 pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. In *Methods in Enzymology*, (Elsevier), 471, 291–317.
- Fassler, J.S., and West, A.H. (2013). Histidine phosphotransfer proteins in fungal two-component signal transduction pathways. *Eukaryotic Cell*, 12, 1052–1060.
- Fernando, V.C.D., and Schroeder, D.F. (2016). Role of ABA in *Arabidopsis* salt, drought, and desiccation tolerance. In *Abiotic and Biotic Stress in Plants - Recent Advances and Future Perspectives*, A.K. Shanker, and C. Shanker, eds. (InTech), 3, 507–524.
- Ferrari-Iliou, R., D'arcy-Lameta, A., Thu Pham Thi, A., Zuily-Fodil, Y., and Mazliak, P. (1994). Effect of drought on photodynamic peroxidation of leaf total lipophilic extracts. *Phytochemistry*, 37, 1237–1243.
- Ferreres, F., Pereira, D.M., Valentão, P., Andrade, P.B., Seabra, R.M., and Sottomayor, M. (2008). New phenolic compounds and antioxidant potential of *Catharanthus roseus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 9967–9974.
- Foster, A.J., Morency, M.J., Seguin, A., and Tanguay, P. (2014). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation for targeted disruption and over expression of genes in the poplar pathogen *Sphaerulina musiva*. *Forest Pathology*, 44, 233–241.
- Franco-Zorrilla, J.M., López-Vidriero, I., Carrasco, J.L., Godoy, M., Vera, P., and Solano, R. (2014). DNA-binding specificities of plant transcription factors and their potential to define target genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111, 2367–2372.
- Fromont-Racine, M., Rain, J.C., and Legrain, P. (1997). Toward a functional analysis of the yeast genome through exhaustive two-hybrid screens. *Nature Genetics*, 16, 277–282.
- Fujii, H., and Zhu, J.-K. (2009). *Arabidopsis* mutant deficient in 3 abscisic acid-activated protein kinases reveals critical roles in growth, reproduction, and stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106, 8380–8385.

G

- Galperin, M.Y. (2006). The minimal genome keeps growing. *Environmental Microbiology*, 8, 569–573.
- Galperin, M.Y. (2009). Sensory transduction network of *E. coli*. In *Systems Biology and Biotechnology of Escherichia coli*, S. Y. Lee, ed (Dordrecht: Springer), 1, 133–148.
- Galperin, M.Y. (2010). Diversity of structure and function of response regulator output domains. *Current Opinion in Microbiology*, 13, 150–159.
- Gamborg, O.L., and LaRue, T.A. (1968). Ethylene produced by plant cells in suspension cultures. *Nature* 220, 604–605.
- Gao, R., and Stock, A.M. (2009). Biological insights from structures of two-component proteins. *Annual Review of Microbiology*, 63, 133–154.
- Gao, R., and Stock, A.M. (2010). Molecular strategies for phosphorylation-mediated regulation of response regulator activity. *Current Opinion in Microbiology*, 13, 160–167.
- Gao, R., Mack, T.R., and Stock, A.M. (2007). Bacterial response regulators: versatile regulatory strategies from common domains. *Trends in Biochemical Sciences*, 32, 225–234.

Gao, Z., Wen, C.-K., Binder, B.M., Chen, Y.-F., Chang, J., Chiang, Y.-H., Kerris, R.J., Chang, C., and Schaller, G.E. (2008). Heteromeric interactions among ethylene receptors mediate signaling in *Arabidopsis*. *The Journal of Biological Chemistry*, 283, 23801–23810.

Gattolin, S., Alandete-Saez, M., Elliott, K., Gonzalez-Carranza, Z., Naomab, E., Powell, C., and Roberts, J.A. (2006). Spatial and temporal expression of the response regulators ARR22 and ARR24 in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 57, 4225–4233.

Geiger, D., Scherzer, S., Mumm, P., Stange, A., Marten, I., Bauer, H., Ache, P., Matschi, S., Liese, A., Al-Rasheid, K.A.S., et al. (2009). Activity of guard cell anion channel SLAC1 is controlled by drought-stress signaling kinase-phosphatase pair. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106, 21425–21430.

Gietz, R.D., Schiestl, R.H., Willems, A.R., and Woods, R.A. (1995). Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast*, 11, 355–360.

Ginis, O., Oudin, A., Guirimand, G., Chebbi, M., Courdavault, V., Glévarec, G., Papon, N., Crèche, J., and Courtois, M. (2012). A type-B response regulator drives the expression of the hydroxymethylbutenyl diphosphate synthase gene in periwinkle. *Journal of Plant Physiology*, 169, 1571–1574.

Goodin, M.M., Zaitlin, D., Naidu, R.A., and Lommel, S.A. (2008). *Nicotiana benthamiana*: its history and future as a model for plant-pathogen interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21, 1015–1026.

Groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat, Pachauri, R.K., and Meyer, L.A. (2014). Changements climatiques 2014 : rapport de synthèse : contribution des Groupes de travail I, II et III au cinquième Rapport d'évaluation du Groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat (Genève (Suisse) : GIEC).

Gruhn, N., Halawa, M., Snel, B., Seidl, M.F., and Heyl, A. (2014). A subfamily of putative cytokinin receptors is revealed by an analysis of the evolution of the two-component signaling system of plants. *Plant Physiology*, 165, 227–237.

Guerra, F., Gainza-Cortés, F.I., Pérez-Castro, R., and Zamudio, F. (2011). Phytoremediation of heavy metals using poplars (*Populus* Spp.): a glimpse of the plant responses to copper, cadmium and zinc stress. In *Handbook of Phytoremediation*, I.A. Golubev, ed. (New York: Nova Science Publishers), 1, 387–414.

Guirimand, G., Burlat, V., Oudin, A., Lanoue, A., St-Pierre, B., and Courdavault, V. (2009). Optimization of the transient transformation of *Catharanthus roseus* cells by particle bombardment and its application to the subcellular localization of hydroxymethylbutenyl 4-diphosphate synthase and geraniol 10-hydroxylase. *Plant Cell Reports*, 28, 1215–1234.

Gupta, S., and Rashotte, A.M. (2012). Down-stream components of cytokinin signaling and the role of cytokinin throughout the plant. *Plant Cell Reports*, 31, 801–812.

H

Ha, S., Vankova, R., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., and Tran, L.-S.P. (2012). Cytokinins: metabolism and function in plant adaptation to environmental stresses. *Trends in Plant Science*, 17, 172–179.

Hall, T. (1999). BioEdit : a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Oxford University Press, 95–98.

Han, K.H., Meilan, R., Ma, C., and Strauss, S.H. (2000). An *Agrobacterium tumefaciens* transformation protocol effective on a variety of cottonwood hybrids (genus *Populus*). *Plant Cell Reports*, 19, 315–320.

- Hass, C., Lohrmann, J., Albrecht, V., Sweere, U., Hummel, F., Yoo, S.D., Hwang, I., Zhu, T., Schäfer, E., Kudla, J., et al. (2004). The response regulator 2 mediates ethylene signalling and hormone signal integration in *Arabidopsis*. *The EMBO Journal*, 23, 3290–3302.
- Hejátko, J., Pernisová, M., Eneva, T., Palme, K., and Brzobohatý, B. (2003). The putative sensor histidine kinase CK11 is involved in female gametophyte development in *Arabidopsis*. *Molecular Genetics and Genomics*, 269, 443–453.
- Hejátko, J., Ryu, H., Kim, G.-T., Dobesova, R., Choi, S., Choi, S.M., Soucek, P., Horak, J., Pekarova, B., Palme, K., et al. (2009). The histidine kinases Cytokinin-Independent1 and *Arabidopsis* Histidine Kinase2 and 3 regulate vascular tissue development in *Arabidopsis* shoots. *The Plant Cell Online*, 21, 2008–2021.
- Helliwell, C.A., Wesley, S.V., Wielopolska, A.J., and Waterhouse, P.M. (2002). High-throughput vectors for efficient gene silencing in plants. *Functional Plant Biology*, 29, 1217.
- Héricourt, F., Chefdor, F., Bertheau, L., Tanigawa, M., Maeda, T., Guirimand, G., Courdavault, V., Larcher, M., Depierreux, C., Bénédicti, H., et al. (2013). Characterization of histidine-aspartate kinase HK1 and identification of histidine phosphotransfer proteins as potential partners in a *Populus* multistep phosphorelay. *Physiologia Plantarum*, 149, 188–199.
- Héricourt, F., Chefdor, F., Djeghdir, I., Larcher, M., Fontaine, F., Courdavault, V., Auguin, D., Coste, F., Depierreux, C., Tanigawa, M., et al. (2016). Functional divergence in kinase activity and osmosensing of poplar histidine aspartate kinase HK1 paralogs. *International Journal of Molecular Sciences*, 17, 2061.
- Heyl, A., Wulfetange, K., Pils, B., Nielsen, N., Romanov, G.A., and Schmölling, T. (2007). Evolutionary proteomics identifies amino acids essential for ligand-binding of the cytokinin receptor CHASE domain. *BMC Evolutionary Biology*, 7, 62.
- Hickman, J.W., Tifrea, D.F., and Harwood, C.S. (2005). A chemosensory system that regulates biofilm formation through modulation of cyclic diguanylate levels. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102, 14422–14427.
- Higuchi, M., Pischke, M.S., Mähönen, A.P., Miyawaki, K., Hashimoto, Y., Seki, M., Kobayashi, M., Shinozaki, K., Kato, T., Tabata, S., Helariutta, Y., Sussman, M.R., and Kakimoto, T. (2004). *In planta* functions of the *Arabidopsis* cytokinin receptor family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 8821–8826.
- Hill, K., and Schaller, G.E. (2013). Enhancing plant regeneration in tissue culture: a molecular approach through manipulation of cytokinin sensitivity. *Plant Signaling & Behaviour*, 8, e25709.
- Hill, K., Mathews, D.E., Kim, H.J., Street, I.H., Wildes, S.L., Chiang, Y.-H., Mason, M.G., Alonso, J.M., Ecker, J.R., Kieber, J.J., and Schaller, G.E. (2013). Functional characterization of type-B response regulators in the *Arabidopsis* cytokinin response. *Plant Physiology*, 162, 212–224.
- Hoch, J.A. (1993). The phosphorelay signal transduction pathway in the initiation of *Bacillus subtilis* sporulation. *Journal of Cellular Biochemistry*, 51, 55–61.
- Hoffmann, T., Kalinowski, G., and Schwab, W. (2006). RNAi-induced silencing of gene expression in strawberry fruit (*Fragaria × ananassa*) by agroinfiltration: a rapid assay for gene function analysis. *The Plant Journal*, 48, 818–826.
- Hohmann, S., Krantz, M., and Nordlander, B. (2007). Yeast osmoregulation. In *Methods in Enzymology*, D. Häussinger, and H. Sies, eds. (Elsevier), 428, 29–45.
- Horák, J., Grefen, C., Berendzen, K.W., Hahn, A., Stierhof, Y.-D., Stadelhofer, B., Stahl, M., Koncz, C., and Harter, K. (2008). The *Arabidopsis thaliana* response regulator ARR22 is a putative AHP phospho-histidine phosphatase expressed in the chalaza of developing seeds. *BMC Plant Biology*, 8, 77.
- Horák, J., Janda, L., Pekárová, B., and Hejátko, J. (2011). Molecular mechanisms of signalling specificity via phosphorelay pathways in *Arabidopsis*. *Current Protein and Peptide Science*, 12, 126–136.

Hosoda, K., Imamura, A., Katoh, E., Hatta, T., Tachiki, M., Yamada, H., Mizuno, T., and Yamazaki, T. (2002). Molecular structure of the GARP family of plant Myb-related DNA binding motifs of the *Arabidopsis* response regulators. *The Plant Cell*, 14, 2015–2029.

Hothorn, M., Dabi, T., and Chory, J. (2011). Structural basis for cytokinin recognition by *Arabidopsis thaliana* Histidine Kinase 4. *Nature Chemical Biology*, 7, 766–768.

Howe, G., Goldfarb, B., and Strauss, S. (1994). *Agrobacterium*-mediated transformation of hybrid poplar suspension-cultures and regeneration of transformed plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 36, 59–71.

Hradilová, J., Malbeck, J., and Brzobohatý, B. (2007). Cytokinin regulation of gene expression in the AHP gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Growth Regulation*, 26, 229–244.

Hutchison, C.E., Li, J., Argueso, C., Gonzalez, M., Lee, E., Lewis, M.W., Maxwell, B.B., Perdue, T.D., Schaller, G.E., Alonso, J.M., Ecker, J.R., Kieber, J.J. (2006). The *Arabidopsis* histidine phosphotransfer proteins are redundant positive regulators of cytokinin signaling. *The Plant Cell Online*, 18, 3073–3087.

Hwang, I., and Sheen, J. (2001). Two-component circuitry in *Arabidopsis* cytokinin signal transduction. *Nature*, 413, 383–389.

Hwang, I., Chen, H.-C., and Sheen, J. (2002). Two-component signal transduction pathways in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 129, 500–515.

I

Imamura, A., Hanaki, N., Nakamura, A., Suzuki, T., Taniguchi, M., Kiba, T., Ueguchi, C., Sugiyama, T., and Mizuno, T. (1999). Compilation and characterization of *Arabidopsis thaliana* response regulators implicated in His-Asp phosphorelay signal transduction. *Plant and Cell Physiology*, 40, 733–742.

Imamura, A., Yoshino, Y., and Mizuno, T. (2001). Cellular localization of the signaling components of *Arabidopsis* His-to-Asp phosphorelay. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 65, 2113–2117.

Imamura, A., Kiba, T., Tajima, Y., Yamashino, T., and Mizuno, T. (2003). *In vivo* and *in vitro* characterization of the ARR11 response regulator implicated in the His-to-Asp phosphorelay signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 44, 122–131.

Imbert, E., and Lefèvre, F. (2003). Dispersal and gene flow of *Populus nigra* (Salicaceae) along a dynamic river system. *Journal of Ecology*, 91, 447–456.

Inoue, T., Higuchi, M., Hashimoto, Y., Seki, M., Kobayashi, M., Kato, T., Tabata, S., Shinozaki, K., and Kakimoto, T. (2001). Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*. *Nature*, 409, 1060–1063.

Ishida, K., Yamashino, T., Yokoyama, A., and Mizuno, T. (2008). Three type-B response regulators, ARR1, ARR10 and ARR12, play essential but redundant roles in cytokinin signal transduction throughout the life cycle of *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 49, 47–57.

Ishida, K., Niwa, Y., Yamashino, T., and Mizuno, T. (2009). A genome-wide compilation of the two-component systems in *Lotus japonicus*. *DNA Research*, 16, 237–247.

Ishida, K., Yamashino, T., Nakanishi, H., and Mizuno, T. (2010). Classification of the genes involved in the two-component system of the moss *Physcomitrella patens*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 74, 2542–2545.

J

Jefferson, R.A. (1987). Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Molecular Biology Reporter*, 5, 387–405.

Jeon, J., and Kim, J. (2013). *Arabidopsis* Response Regulator1 and *Arabidopsis* Histidine Phosphotransfer Protein2 (AHP2), AHP3, and AHP5 Function in Cold Signaling. *Plant Physiology*, 161, 408–424.

Johnsson, H. (1942). Cytological studies of triploid progenies of *Populus tremula*. *Hereditas*, 28, 306–312.

K

Kakimoto, T. (1996). CKI1, a histidine kinase homolog implicated in cytokinin signal transduction. *Science*, 274, 982–985.

Kakimoto, T. (2001). Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate : ATP/ADP isopentenyltransferases. *Plant and Cell Physiology*, 42, 677–685.

Kaminek, M., Vanek, T., and Motyka, V. (1987). Cytokinin activities of N-6-benzyladenosine derivatives hydroxylated on the side-chain phenyl ring. *Journal of Plant Growth Regulation*, 6, 113–120.

Kang, N.Y., Cho, C., and Kim, J. (2013). Inducible expression of *Arabidopsis* response regulator 22 (ARR22), a type-C ARR, in transgenic *Arabidopsis* enhances drought and freezing tolerance. *PLoS One*, 8, e79248.

Khan, A., Sovero, V., and Gemenet, D. (2016). Genome-assisted breeding for drought resistance. *Current Genomics*, 17, 330–342.

Kiba, T., Aoki, K., Sakakibara, H., and Mizuno, T. (2004). *Arabidopsis* response regulator, ARR22, ectopic expression of which results in phenotypes similar to the WOL cytokinin-receptor mutant. *Plant and Cell Physiology*, 45, 1063–1077.

Kim, K., and Hwang, I. (2012). Attenuation of cytokinin signaling via proteolysis of a type-B response regulator. *Plant Signaling & Behaviour*, 7, 756–759.

Kim, H.J., Ryu, H., Hong, S.H., Woo, H.R., Lim, P.O., Lee, I.C., Sheen, J., Nam, H.G., and Hwang, I. (2006). Cytokinin-mediated control of leaf longevity by AHK3 through phosphorylation of ARR2 in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 814–819.

Kim, H.J., Chiang, Y.-H., Kieber, J.J., and Schaller, G.E. (2013). SCF (KMD) controls cytokinin signaling by regulating the degradation of type-B response regulators. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110, 10028–10033.

Kong, H., Landherr, L.L., Frohlich, M.W., Leebens-Mack, J., Ma, H., and dePamphilis, C.W. (2007). Patterns of gene duplication in the plant SKP1 gene family in angiosperms: evidence for multiple mechanisms of rapid gene birth. *The Plant Journal*, 50, 873–885.

Kooyers, N.J. (2015). The evolution of drought escape and avoidance in natural herbaceous populations. *Plant Science*, 234, 155–162.

Kumar, M.N., Jane, W.-N., and Verslues, P.E. (2013). Role of the putative osmosensor *Arabidopsis* Histidine Kinase1 in dehydration avoidance and low-water-potential response. *Plant Physiology*, 161, 942–953.

Kumar, M.S.S., Ali, K., Dahuja, A., and Tyagi, A. (2015). Role of phytosterols in drought stress tolerance in rice. *Plant Physiology and Biochemistry*, 96, 83–89.

Kurashima-Ito, K., Kasai, Y., Hosono, K., Tamura, K., Oue, S., Isogai, M., Ito, Y., Nakamura, H., and Shiro, Y. (2005). Solution structure of the C-terminal transcriptional activator domain of FixJ from *Sinorhizobium meliloti* and its recognition of the fixK promoter. *Biochemistry*, 44, 14835–14844.

L

- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685.
- Laub, M.T., and Goulian, M. (2007). Specificity in two-component signal transduction pathways. *Annual Review of Genetics*, 41, 121–145.
- Lee, K.Y., Strand, S.E., and Doty, S.L. (2012). Phytoremediation of chlorpyrifos by *Populus* and *Salix*. *International Journal of Phytoremediation*, 14, 48–61.
- Lee, S.Y., Cho, H.S., Pelton, J.G., Yan, D., Henderson, R.K., King, D.S., Huang, L., Kustu, S., Berry, E.A., and Wemmer, D.E. (2001). Crystal structure of an activated response regulator bound to its target. *Nature Structural & Molecular Biology*, 8, 52–56.
- Leple, J.C., Brasileiro, A.C., Michel, M.F., Delmotte, F., and Jouanin, L. (1992). Transgenic poplars: expression of chimeric genes using four different constructs. *Plant Cell Reports*, 11, 137–141.
- Lescot, M., Déhais, P., Thijs, G., Marchal, K., Moreau, Y., Van de Peer, Y., Rouzé, P., and Rombauts, S. (2002). PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for *in silico* analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Research*, 30, 325–327.
- Lévesque, C.M., Mair, R.W., Perry, J., Lau, P.C.Y., Li, Y.-H., and Cvitkovitch, D.G. (2007). Systemic inactivation and phenotypic characterization of two-component systems in expression of *Streptococcus mutans* virulence properties. *Letters in Applied Microbiology*, 45, 398–404.
- Li, Q., Lin, Y.-C., Sun, Y.-H., Song, J., Chen, H., Zhang, X.-H., Sederoff, R.R., and Chiang, V.L. (2012). Splice variant of the SND1 transcription factor is a dominant negative of SND1 members and their regulation in *Populus trichocarpa*. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 109, 14699–14704.
- Liang, Y., Wang, X., Hong, S., Li, Y., and Zuo, J. (2012). Deletion of the initial 45 residues of ARR18 induces cytokinin response in *Arabidopsis*. *Journal of Genetics and Genomics*, 39, 37–46.
- Lin, M.-F., Lin, Y.-Y., and Lan, C.-Y. (2015). The role of the two-component system BaeSR in disposing chemicals through regulating transporter systems in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS ONE*, 10, e0132843.
- Liu, Y., Yang, S., Song, Y., Men, S., and Wang, J. (2016). Gain-of-function analysis of poplar CLE genes in *Arabidopsis* by exogenous application and over-expression assays. *Journal of Experimental Botany*, 67, 2309–2324.
- Lohrmann, J., Sweere, U., Zabaleta, E., Bäurle, I., Keitel, C., Kozma-Bognar, L., Brennicke, A., Schäfer, E., Kudla, J., and Harter, K. (2001). The response regulator ARR2: a pollen-specific transcription factor involved in the expression of nuclear genes for components of mitochondrial complex I in *Arabidopsis*. *Molecular Genetics and Genomics*, 265, 2–13.
- Lomaglio, T., Rocco, M., Trupiano, D., De Zio, E., Grosso, A., Marra, M., Delfino, S., Chiatante, D., Morabito, D., and Scippa, G.S. (2015). Effect of short-term cadmium stress on *Populus nigra* L. detached leaves. *Journal of Plant Physiology*, 182, 40–48.
- Lomin, S.N., Krivosheev, D.M., Steklov, M.Y., Osolodkin, D.I., and Romanov, G.A. (2012). Receptor properties and features of cytokinin signaling. *Acta Naturae*, 4, 31–45.
- Lu, H., Klocko, A.L., Dow, M., Ma, C., Amarasinghe, V., and Strauss, S.H. (2016). Low frequency of zinc-finger nuclease-induced mutagenesis in *Populus*. *Molecular Breeding*, 36, 121.

M

- Ma, Y., Szostkiewicz, I., Korte, A., Moes, D., Yang, Y., Christmann, A., and Grill, E. (2009). Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. *Science*, 324, 1064–1068.

- Mack, T.R., Gao, R., and Stock, A.M. (2009). Probing the roles of the two different dimers mediated by the receiver domain of the response regulator PhoB. *Journal of Molecular Biology*, 389, 349–364.
- MacRitchie, D.M., Buelow, D.R., Price, N.L., and Raivio, T.L. (2008). Two-component signaling and gram negative envelope stress response systems. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 631, 80–110.
- Maeda, T., Wurgler-Murphy, S.M., and Saito, H. (1994). A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature*, 369, 242–245.
- Maeda, T., Takekawa, M., and Saito, H. (1995). Activation of yeast PBS2 MAPKK by MAPKKs or by binding of an SH3-containing osmosensor. *Science*, 269, 554–558.
- Magnan, F., Ranty, B., Charpenteau, M., Sotta, B., Galaud, J.-P., and Aldon, D. (2008). Mutations in AtCML9, a calmodulin-like protein from *Arabidopsis thaliana*, alter plant responses to abiotic stress and abscisic acid. *The Plant Journal*, 56, 575–589.
- Mähönen, A.P., Bonke, M., Kauppinen, L., Riikonen, M., Benfey, P.N., and Helariutta, Y. (2000). A novel two-component hybrid molecule regulates vascular morphogenesis of the *Arabidopsis* root. *Genes & Development*, 14, 2938–2943.
- Mähönen, A.P., Higuchi, M., Törmäkangas, K., Miyawaki, K., Pischke, M.S., Sussman, M.R., Helariutta, Y., and Kakimoto, T. (2006). Cytokinins regulate a bidirectional phosphorelay network in *Arabidopsis*. *Current Biology*, 16, 1116–1122.
- Makino, S., Kiba, T., Imamura, A., Hanaki, N., Nakamura, A., Suzuki, T., Taniguchi, M., Ueguchi, C., Sugiyama, T., and Mizuno, T. (2000). Genes encoding pseudo-response regulators: insight into His-to-Asp phosphorelay and circadian rhythm in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 41, 791–803.
- Marina, A., Waldburger, C.D., and Hendrickson, W.A. (2005). Structure of the entire cytoplasmic portion of a sensor histidine-kinase protein. *EMBO Journal*, 24, 4247–4259.
- Martinez-Wilson, H.F., Tamayo, R., Tischler, A.D., Lazinski, D.W., and Camilli, A. (2008). The *Vibrio cholerae* hybrid sensor kinase vies contributes to motility and biofilm regulation by altering the cyclic diguanylate level. *Journal of Bacteriology*, 190, 6439–6447.
- Mascher, T. (2006). Intramembrane-sensing histidine kinases: a new family of cell envelope stress sensors in Firmicutes bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 264, 133–144.
- Mason, M.G., Li, J., Mathews, D.E., Kieber, J.J., and Schaller, G.E. (2004). Type-B response regulators display overlapping expression patterns in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 135, 927–937.
- Mason, M.G., Mathews, D.E., Argyros, D.A., Maxwell, B.B., Kieber, J.J., Alonso, J.M., Ecker, J.R., and Schaller, G.E. (2005). Multiple type-B response regulators mediate cytokinin signal transduction in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 17, 3007–3018.
- Matamouros, S., Hager, K.R., and Miller, S.I. (2015). HAMP domain rotation and tilting movements associated with signal transduction in the PhoQ sensor kinase, *mBio* 6, e00616–15.
- Matos, A.R., d’Arcy-Lameta, A., França, M., Pêtres, S., Edelman, L., Kader, J., Zuily-Fodil, Y., and Pham-Thi, A.T. (2001). A novel patatin-like gene stimulated by drought stress encodes a galactolipid acyl hydrolase. *FEBS Letters*, 491, 188–192.
- Matsushika, A., Imamura, A., Yamashino, T., and Mizuno, T. (2002). Aberrant expression of the light-inducible and circadian-regulated APRR9 gene belonging to the circadian-associated APRR1/TOC1 quintet results in the phenotype of early flowering in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 43, 833–843.
- Matsushika, A., Kawamura, M., Nakamura, Y., Kato, T., Murakami, M., Yamashino, T., and Mizuno, T. (2007a). Characterization of circadian-associated pseudo-response regulators: II. The function of

PRR5 and its molecular dissection in *Arabidopsis thaliana*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 71, 535–544.

Matsushika, A., Murakami, M., Ito, S., Nakamichi, N., Yamashino, T., and Mizuno, T. (2007b). Characterization of circadian-associated pseudo-response regulators: I. Comparative studies on a series of transgenic lines misexpressing five distinctive PRR Genes in *Arabidopsis thaliana*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 71, 527–534.

Maurel, C., Simonneau, T., and Sutka, M. (2010). The significance of roots as hydraulic rheostats. *Journal of Experimental Botany*, 61, 3191–3198.

Mehrotra, R., Bhalothia, P., Bansal, P., Basantani, M.K., Bharti, V., and Mehrotra, S. (2014). Abscisic acid and abiotic stress tolerance – Different tiers of regulation. *Journal of Plant Physiology*, 171, 486–496.

Menon, M., Barnes, W.J., and Olson, M.S. (2015). Population genetics of freeze tolerance among natural populations of *Populus balsamifera* across the growing season. *New Phytologist*, 207, 710–722.

Mira-Rodado, V., Veerabagu, M., Witthöft, J., Teply, J., Harter, K., and Desikan, R. (2012). Identification of two-component system elements downstream of AHK5 in the stomatal closure response of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signaling & Behavior*, 7, 1467–1476.

Mitchell, J.F.B., Lowe, J., Wood, R.A., and Vellinga, M. (2006). Extreme events due to human-induced climate change. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 364, 2117–2133.

Miwa, K., Ishikawa, K., Terada, K., Yamada, H., Suzuki, T., Yamashino, T., and Mizuno, T. (2007). Identification of amino acid substitutions that render the *Arabidopsis* cytokinin receptor histidine kinase AHK4 constitutively active. *Plant and Cell Physiology*, 48, 1809–1814.

Mizuno, T. (2004). Plant response regulators implicated in signal transduction and circadian rhythm. *Current Opinion in Plant Biology*, 7, 499–505.

Mizuno, T., Nomoto, Y., Oka, H., Kitayama, M., Takeuchi, A., Tsubouchi, M., and Yamashino, T. (2014). Ambient temperature signal feeds into the circadian clock transcriptional circuitry through the EC night-time repressor in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 55, 958–976.

Mochida, K., Yoshida, T., Sakurai, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., and Tran, L.-S.P. (2010). Genome-wide analysis of two-component systems and prediction of stress-responsive two-component system members in soybean. *DNA Research*, 17, 303–324.

Monteiro de Paula, F., Pham Thi, A.T., Zuily-Fodil, Y., Ferrari-Iliou, R., Viera da Silva, J., and Mazliak, P. (1993). Effects of water-stress on the biosynthesis and degradation of polyunsaturated lipid molecular-species in leaves of *Vigna unguiculata*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 31, 707–715.

Morabito, D., Caruso, A., Carpin, S., Carli, C., Laurans, F., Depierreux, C., Kahlem, G., and Label, P. (2006). Cambial activity of *Populus tremula* × *Populus alba* clone 717-1B4 in hydroponic culture. *Canadian Journal of Forest Research*, 36, 719–724.

Mougel, C., and Zhulin, I.B. (2001). CHASE: an extracellular sensing domain common to transmembrane receptors from prokaryotes, lower eukaryotes and plants. *Trends in Biochemical Sciences*, 26, 582–584.

Murashige, T., and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473–497.

N

Nakamichi, N., Kita, M., Ito, S., Sato, E., Yamashino, T., and Mizuno, T. (2005a). The *Arabidopsis* pseudo-response regulators, PRR5 and PRR7, coordinately play essential roles for circadian clock function. *Plant and Cell Physiology*, 46, 609–619.

Nakamichi, N., Kita, M., Ito, S., Yamashino, T., and Mizuno, T. (2005b). pseudo-response regulators, PRR9, PRR7 and PRR5, together play essential roles close to the circadian clock of *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 46, 686–698.

Napoli, C., Lemieux, C., and Jorgensen, R. (1990). Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in *trans*. *The Plant Cell*, 2, 279–289.

Nassuth, A., Siddiqua, M., Xiao, H., Moody, M.A., and Carlow, C.E. (2014). Newly developed quantitative transactivation system shows difference in activation by *Vitis* CBF transcription factors on DRE/CRT elements. *Plant Methods*, 10, 32.

Nguyen, K.H., Ha, C.V., Nishiyama, R., Watanabe, Y., Leyva-González, M.A., Fujita, Y., Tran, U.T., Li, W., Tanaka, M., Seki, M., Schaller, G.E., Herrera-Estrella, L., and Tran L.S. (2016). *Arabidopsis* type B cytokinin response regulators ARR1, ARR10, and ARR12 negatively regulate plant responses to drought. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113, 3090–3095.

Nishiguchi, M., Yoshida, K., Mohri, T., Igasaki, T., and Shinohara, K. (2006). An improved transformation system for Lombardy poplar (*Populus nigra* var. *italica*). *Journal of Forest Research*, 11, 175–180.

Nishimura, N., Sarkeshik, A., Nito, K., Park, S.-Y., Wang, A., Carvalho, P.C., Lee, S., Caddell, D.F., Cutler, S.R., Chory, J., Yates, J.R., and Schroeder, J.I. (2009). PYR/PYL/RCAR family members are major *in-vivo* ABI1 protein phosphatase 2C-interacting proteins in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 61, 290–299.

Nishiyama, R., Watanabe, Y., Fujita, Y., Le, D.T., Kojima, M., Werner, T., Vankova, R., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., Kakimoto, T., Sakakibara, H., Schmölling, T., and Tran, L.-S.P. (2011). Analysis of cytokinin mutants and regulation of cytokinin metabolic genes reveals important regulatory roles of cytokinins in drought, salt and abscisic acid responses, and abscisic acid biosynthesis. *The Plant Cell*, 23, 2169–2183.

Nishiyama, R., Watanabe, Y., Leyva-Gonzalez, M.A., Ha, C.V., Fujita, Y., Tanaka, M., Seki, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., Herrera-Estrella, L., and Tran, L.-S.P. (2013). *Arabidopsis* AHP2, AHP3, and AHP5 histidine phosphotransfer proteins function as redundant negative regulators of drought stress response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110, 4840–4845.

O

Ohta, N., Lane, T., Ninfa, E.G., Sommer, J.M., and Newton, A. (1992). A histidine protein kinase homologue required for regulation of bacterial cell division and differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89, 10297–10301.

Osakabe, Y., Osakabe, K., Shinozaki, K., and Tran, L.-S.P. (2014). Response of plants to water stress. *Frontiers in Plant Science*, 5, 86.

Ostrander, D.B., and Gorman, J.A. (1999). The extracellular domain of the *Saccharomyces cerevisiae* Sln1p membrane osmolarity sensor is necessary for kinase activity. *Journal of Bacteriology*, 181, 2527–2534.

P

Panchy, N., Lehti-Shiu, M., and Shiu, S.-H. (2016). Evolution of gene duplication in plants. *Plant Physiology*, 171, 2294–2316.

Papon, N., Vansiri, A., Gantet, P., Chénieux, J.-C., Rideau, M., and Crèche, J. (2004). Histidine-containing phosphotransfer domain extinction by RNA interference turns off a cytokinin signalling circuitry in *Catharanthus roseus* suspension cells. *FEBS Letters*, 558, 85–88.

- Papon, N., Bremer, J., Vansiri, A., Glévarec, G., Rideau, M., and Creche, J. (2006). Molecular cloning and expression of a cDNA encoding a hybrid histidine kinase receptor in tropical periwinkle *Catharanthus roseus*. *Plant Biology*, 8, 731–736.
- Pareek, A., Singh, A., Kumar, M., Kushwaha, H.R., Lynn, A.M., and Singla-Pareek, S.L. (2006). Whole-genome analysis of *Oryza sativa* reveals similar architecture of two-component signaling machinery with *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 142, 380–397.
- Park, S.-Y., Fung, P., Nishimura, N., Jensen, D.R., Fujii, H., Zhao, Y., Lumba, S., Santiago, J., Rodrigues, A., Chow, T.-f. F., et al. (2009). Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science*, 324, 1068–1071.
- Parsons, T.J., Sinkar, V.P., Stettler, R.F., Nester, E.W., and Gordon, M.P. (1986). Transformation of poplar by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature Biotechnology*, 4, 533–536.
- Pei, Z.-M., and Kuchitsu, K. (2005). Early ABA signaling events in guard cells. *Journal of Plant Growth Regulation*, 24, 296–307.
- Pekárová, B., Klumpler, T., Třísková, O., Horák, J., Jansen, S., Dopitová, R., Borkovcová, P., Papoušková, V., Nejedlá, E., Sklenář, V., Marek, J., Zídek, L., Hejátko, J., and Janda, L. (2011). Structure and binding specificity of the receiver domain of sensor histidine kinase CKI1 from *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 67, 827–839.
- Pelah, D., Altman, A., and Shoseyov, O. (1997). Drought tolerance: a molecular perspective. *Acta Horticulturae*, 1, 439–446.
- Pereira, D.M., Ferreres, F., Oliveira, J.M.A., Gaspar, L., Faria, J., Valentão, P., Sottomayor, M., and Andrade, P.B. (2010). Pharmacological effects of *Catharanthus roseus* root alkaloids in acetylcholinesterase inhibition and cholinergic neurotransmission. *Phytomedicine*, 17, 646–652.
- Perochon, A., Dieterle, S., Pouzet, C., Aldon, D., Galaud, J.-P., and Ranty, B. (2010). Interaction of a plant pseudo-response regulator with a calmodulin-like protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 398, 747–751.
- Pham Thi, A.T. (1984). Action de la sécheresse sur les lipides polaires des feuilles de cotonnier (*Gossypium hirsutum* L.). *Bulletin de la Société Botanique de France. Actualités Botaniques*, 131, 89–97.
- Pils, B., and Heyl, A. (2009). Unraveling the evolution of cytokinin signaling. *Plant Physiology*, 151, 782–791.
- Pischke, M.S., Jones, L.G., Otsuga, D., Fernandez, D.E., Drews, G.N., and Sussman, M.R. (2002). An *Arabidopsis* histidine kinase is essential for megagametogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 15800–15805.
- Portilho, N., and Almeida, A. (2011). Maize transformation to obtain plants tolerant to viruses by RNAi technology. In *Genetic Transformation*, M. Alvarez, ed. (InTech), 8, 151–170.
- Posas, F., Wurgler-Murphy, S.M., Maeda, T., Witten, E.A., Thai, T.C., and Saito, H. (1996). Yeast Hog1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the Sln1-Ypd1-Ssk1 “two-component” osmosensor. *Cell*, 86, 865–875.
- Punwani, J.A., and Kieber, J.J. (2010). Localization of the *Arabidopsis* histidine phosphotransfer proteins is independent of cytokinin. *Plant Signaling & Behaviour*, 5, 896–898.
- Punwani, J.A., Hutchison, C.E., Schaller, G.E., and Kieber, J.J. (2010). The subcellular distribution of the *Arabidopsis* histidine phosphotransfer proteins is independent of cytokinin signaling. *The Plant Journal*, 62, 473–482.

Q

Qu, L.-J., and Zhu, Y.-X. (2006). Transcription factor families in *Arabidopsis*: major progress and outstanding issues for future research. *Current Opinion in Plant Biology*, 9, 544–549.

R

Raghavendra, A.S., Gonugunta, V.K., Christmann, A., and Grill, E. (2010). ABA perception and signalling. *Trends in Plant Science*, 15, 395–401.

Ramireddy, E., Brenner, W.G., Pfeifer, A., Heyl, A., and Schmölling, T. (2013). *In planta* analysis of a *cis*-regulatory cytokinin response motif in *Arabidopsis* and identification of a novel enhancer sequence. *Plant and Cell Physiology*, 54, 1079–1092.

Ramírez-Carvajal, G.A., Morse, A.M., and Davis, J.M. (2008). Transcript profiles of the cytokinin response regulator gene family in *Populus* imply diverse roles in plant development. *New Phytologist*, 177, 77–89.

Ramírez-Carvajal, G.A., Morse, A.M., Dervinis, C., and Davis, J.M. (2009). The cytokinin type-B response regulator PtRR13 is a negative regulator of adventitious root development in *Populus*. *Plant Physiology*, 150, 759–771.

Rashotte, A.M., Carson, S.D.B., To, J.P.C., and Kieber, J.J. (2003). Expression profiling of cytokinin action in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 132, 1998–2011.

Rathmacher, G., Niggemann, M., Köhnen, M., Ziegenhagen, B., and Bialozyt, R. (2010). Short-distance gene flow in *Populus nigra* L. accounts for small-scale spatial genetic structures: implications for *in situ* conservation measures. *Conservation Genetics*, 11, 1327–1338.

Riechmann, J.L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., -Z., C., Jiang, K., Keddie, J., Adam, L., Pineda, O., Ratcliffe, O.J., Samaha, R.R., Creelman, R., Pilgrim, M., Broun, P., Zhang, J.Z., Ghandehari, D., Sherman, B.K., and -L. Yu, G. (2000). *Arabidopsis* transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science*, 290, 2105–2110.

Robinson, V.L., Wu, T., and Stock, A.M. (2003). Structural analysis of the domain interface in DrrB, a response regulator of the OmpR/PhoB subfamily. *Journal of Bacteriology*, 185, 4186–4194.

Romanov, G.A., Lomin, S.N., and Schmölling, T. (2006). Biochemical characteristics and ligand-binding properties of *Arabidopsis* cytokinin receptor AHK3 compared to CRE1/AHK4 as revealed by a direct binding assay. *Journal of Experimental Botany*, 57, 4051–4058.

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

Rowe, J.H., Topping, J.F., Liu, J., and Lindsey, K. (2016). Abscisic acid regulates root growth under osmotic stress conditions via an interacting hormonal network with cytokinin, ethylene and auxin. *New Phytologist*, 211, 225–239.

Roychoudhury, A., Paul, S., and Basu, S. (2013). Cross-talk between abscisic acid-dependent and abscisic acid-independent pathways during abiotic stress. *Plant Cell Reports*, 32, 985–1006.

S

Saito, H., and Posas, F. (2012). Response to hyperosmotic stress. *Genetics*, 192, 289–318.

Sakai, H., Aoyama, T., Bono, H., and Oka, A. (1998). Two-component response regulators from *Arabidopsis thaliana* contain a putative DNA-binding motif. *Plant and Cell Physiology*, 39, 1232–1239.

Sakai, H., Aoyama, T., and Oka, A. (2000). *Arabidopsis* ARR1 and ARR2 response regulators operate as transcriptional activators. *The Plant Journal*, 24, 703–711.

- Sakai, H., Honma, T., Aoyama, T., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., and Oka, A. (2001). ARR1, a transcription factor for genes immediately responsive to cytokinins. *Science*, 294, 1519–1521.
- Salazar, M.E., and Laub, M.T. (2015). Temporal and evolutionary dynamics of two-component signaling pathways. *Current Opinion in Microbiology*, 24, 7–14.
- Saluta, M., and Bell, P.A. (1998). Troubleshooting GST fusion protein expression in *E. coli*. *Life Science News*, 1, 1–3.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual* (Cold Spring Harbor Laboratory).
- Santiago, J., Rodrigues, A., Saez, A., Rubio, S., Antoni, R., Dupeux, F., Park, S.-Y., Márquez, J.A., Cutler, S.R., and Rodriguez, P.L. (2009). Modulation of drought resistance by the abscisic acid receptor PYL5 through inhibition of clade A PP2Cs: regulation of HAB1 by ABA-binding proteins. *The Plant Journal*, 60, 575–588.
- Santos, J.L., and Shiozaki, K. (2001). Fungal Histidine Kinases. *Science's STKE* 2001, re1.
- Sato, A., Sato, Y., Fukao, Y., Fujiwara, M., Umezawa, T., Shinozaki, K., Hibi, T., Taniguchi, M., Miyake, H., Goto, D.B., and Uozumi, N. (2009). Threonine at position 306 of the KAT1 potassium channel is essential for channel activity and is a target site for ABA-activated SnRK2/OST1/SnRK2.6 protein kinase. *Biochemical Journal*, 424, 439–448.
- Schaller, G.E., Kieber, J.J., and Shiu, S.-H. (2008). Two-component signaling elements and histidyl-aspartyl phosphorelays. *Arabidopsis Book*, 6, e0112.
- Schaller, G.E., Shiu, S.-H., and Armitage, J.P. (2011). Two-component systems and their co-option for eukaryotic signal transduction. *Current Biology*, 21, R320–R330.
- Scharein, B., Voet-van-Vormizeele, J., Harter, K., and Groth, G. (2008). Ethylene signaling: identification of a putative ETR1-AHP1 phosphorelay complex by fluorescence spectroscopy. *Analytical Biochemistry*, 377, 72–76.
- Schmitz, R., Skoog, F., Playtis, A., and Leonard, N. (1972). Cytokinins - synthesis and biological-activity of geometric and position isomers of zeatin. *Plant Physiology*, 50, 702–705.
- Schroeder, J.I., Kwak, J.M., and Allen, G.J. (2001). Guard cell abscisic acid signalling and engineering drought hardiness in plants. *Nature*, 410, 327–330.
- Shen, Z., Sun, J., Yao, J., Wang, S., Ding, M., Zhang, H., Qian, Z., Zhao, N., Sa, G., Zhao, R., et al. (2015). High rates of virus-induced gene silencing by tobacco rattle virus in *Populus*. *Tree Physiology*, 35, 1016–1029.
- Simms, S.A., Keane, M.G., and Stock, J. (1985). Multiple forms of the CheB methyltransferase in bacterial chemosensing. *The Journal of Biological Chemistry*, 260, 10161–10168.
- Singh, G., and Kumar, R. (2012). Genome-wide *in silico* analysis of plant two component signaling system in woody model plant *Populus trichocarpa*. *Research in Plant Biology*, 2, 13–23.
- Singh, A., Jethva, M., Singla-Pareek, S.L., Pareek, A., and Kushwaha, H.R. (2016). Analyses of old “prokaryotic” proteins indicate functional diversification in *Arabidopsis* and *Oryza sativa*. *Frontiers in Plant Science*, 7: 304.
- Song, J., Lu, S., Chen, Z.-Z., Lourenco, R., and Chiang, V.L. (2006). Genetic transformation of *Populus trichocarpa* genotype Nisqually-1: a functional genomic tool for woody plants. *Plant and Cell Physiology*, 47, 1582–1589.
- Spíchal, L., Rakova, N.Y., Riefler, M., Mizuno, T., Romanov, G.A., Strnad, M., and Schmölling, T. (2004). Two cytokinin receptors of *Arabidopsis thaliana*, CRE1/AHK4 and AHK3, differ in their ligand specificity in a bacterial assay. *Plant and Cell Physiology*, 45, 1299–1305.

Spokevicius, A.V., Van Beveren, K.S., and Bossinger, G. (2006). *Agrobacterium*-mediated transformation of dormant lateral buds in poplar trees reveals developmental patterns in secondary stem tissues. *Functional Plant Biology*, 33, 133–139.

Stock, A.M., Robinson, V.L., and Goudreau, P.N. (2000). Two-component signal transduction. *Annual Review of Biochemistry*, 69, 183–215.

Stolz, A., Riefler, M., Lomin, S.N., Achazi, K., Romanov, G.A., and Schömlling, T. (2011). The specificity of cytokinin signalling in *Arabidopsis thaliana* is mediated by differing ligand affinities and expression profiles of the receptors. *The Plant Journal*, 67, 157–168.

Stoutjesdijk, P.A., Singh, S.P., Liu, Q., Hurlstone, C.J., Waterhouse, P.A., and Green, A.G. (2002). hpRNA-mediated targeting of the *Arabidopsis* FAD2 gene gives highly efficient and stable silencing. *Plant Physiology*, 129, 1723–1731.

Stracke, R., Werber, M., and Weisshaar, B. (2001). The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Current Opinion in Plant Biology*, 4, 447–456.

Strayer, C., Oyama, T., Schultz, T.F., Raman, R., Somers, D.E., Más, P., Panda, S., Kreps, J.A., and Kay, S.A. (2000). Cloning of the *Arabidopsis* clock gene TOC1, an autoregulatory response regulator homolog. *Science*, 289, 768–771.

Sudhakar, P., Reck, M., Wang, W., He, F.Q., Dobler, I.W., and Zeng, A.-P. (2014). Construction and verification of the transcriptional regulatory response network of *Streptococcus mutans* upon treatment with the biofilm inhibitor carolacton. *BioMed Central Genomics*, 15, 362.

Sugawara, H., Kawano, Y., Hatakeyama, T., Yamaya, T., Kamiya, N., and Sakakibara, H. (2005a). Crystal structure of the histidine-containing phosphotransfer protein ZmHP2 from maize. *Protein Science*, 14, 202–208.

Sugawara, H., Yamaya, T., and Sakakibara, H. (2005b). Crystallization and preliminary X-ray diffraction study of the histidine-containing phosphotransfer protein ZmHP1 from maize. *Acta Crystallographica Section F, Structural Biology and Crystallization Communication*, 61, 366–368.

Suzuki, T., Imamura, A., Ueguchi, C., and Mizuno, T. (1998). Histidine-containing phosphotransfer (HPT) signal transducers implicated in His-to-Asp phosphorelay in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology*, 39, 1258–1268.

Suzuki, T., Sakurai, K., Imamura, A., Nakamura, A., Ueguchi, C., and Mizuno, T. (2000). Compilation and characterization of histidine-containing phosphotransmitters implicated in His-to-Asp phosphorelay in plants: AHP signal transducers of *Arabidopsis thaliana*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 64, 2486–2489.

Suzuki, T., Miwa, K., Ishikawa, K., Yamada, H., Aiba, H., and Mizuno, T. (2001). The *Arabidopsis* sensor His-kinase, AHK4, can respond to cytokinins. *Plant and Cell Physiology*, 42, 107–113.

Suzuki, T., Ishikawa, K., Yamashino, T., and Mizuno, T. (2002). An *Arabidopsis* histidine-containing phosphotransfer (HPT) factor implicated in phosphorelay signal transduction: overexpression of AHP2 in plants results in hypersensitiveness to cytokinin. *Plant and Cell Physiology*, 43, 123–129.

T

Tajima, Y., Imamura, A., Kiba, T., Amano, Y., Yamashino, T., and Mizuno, T. (2004). Comparative studies on the type-B response regulators revealing their distinctive properties in the His-to-Asp phosphorelay signal transduction of *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 45, 28–39.

Takata, N., and Eriksson, M.E. (2012). A simple and efficient transient transformation for hybrid aspen (*Populus tremula* × *P. tremuloides*). *Plant Methods*, 8, 1–10.

- Tamai, H., Iwabuchi, M., and Meshi, T. (2002). *Arabidopsis* GARP transcriptional activators interact with the Pro-rich activation domain shared by G-box-binding bZIP factors. *Plant and Cell Physiology*, 43, 99–107.
- Tanaka, Y., Suzuki, T., Yamashino, T., and Mizuno, T. (2004). Comparative studies of the AHP histidine-containing phosphotransmitters implicated in His-to-Asp phosphorelay in *Arabidopsis thaliana*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 68, 462–465.
- Tanigawa, M., Kihara, A., Terashima, M., Takahara, T., and Maeda, T. (2012). Sphingolipids regulate the yeast high-osmolarity glycerol response pathway. *Molecular and Cellular Biology*, 32, 2861–2870.
- Taniguchi, M., Kiba, T., Sakakibara, H., Ueguchi, C., Mizuno, T., and Sugiyama, T. (1998). Expression of *Arabidopsis* response regulator homologs is induced by cytokinins and nitrate. *FEBS Letters*, 429, 259–262.
- Taniguchi, M., Sasaki, N., Tsuge, T., Aoyama, T., and Oka, A. (2007). ARR1 directly activates cytokinin response genes that encode proteins with diverse regulatory functions. *Plant and Cell Physiology*, 48, 263–277.
- Tao, W., Malone, C.L., Ault, A.D., Deschenes, R.J., and Fassler, J.S. (2002). A cytoplasmic coiled-coil domain is required for histidine kinase activity of the yeast osmosensor, Sln1. *Molecular Microbiology*, 43, 459–473.
- Tatke, G., Kumari, H., Silva-Herzog, E., Ramirez, L., and Mathee, K. (2015). *Pseudomonas aeruginosa* MifS-MifR two-component system is specific for α -ketoglutarate utilization. *PLoS One*, 10, e0129629.
- To, J.P.C., Haberer, G., Ferreira, F.J., Deruère, J., Mason, M.G., Schaller, G.E., Alonso, J.M., Ecker, J.R., and Kieber, J.J. (2004). Type-A *Arabidopsis* response regulators are partially redundant negative regulators of cytokinin signaling. *The Plant Cell*, 16, 658–671.
- Toro-Roman, A., Mack, T.R., and Stock, A.M. (2005a). Structural analysis and solution studies of the activated regulatory domain of the response regulator ArcA: a symmetric dimer mediated by the alpha4-beta5-alpha5 face. *Journal of Molecular Biology*, 349, 11–26.
- Toro-Roman, A., Wu, T., and Stock, A.M. (2005b). A common dimerization interface in bacterial response regulators KdpE and TorR. *Protein Science*, 14, 3077–3088.
- Tran, L.-S.P., Urao, T., Qin, F., Maruyama, K., Kakimoto, T., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2007). Functional analysis of AHK1/ATHK1 and cytokinin receptor histidine kinases in response to abscisic acid, drought, and salt stress in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 20623–20628.
- Tuskan, G.A., DiFazio, S., Jansson, S., Bohlmann, J., Grigoriev, I., Hellsten, U., Putnam, N., Ralph, S., Rombauts, S., Salamov, A., Schein, J., Sterck, L., Aerts, A., Bhalerao, R. R., Bhalerao, R. P., Blaudez, D., Boerjan, W., Brun, A., Brunner, A., Busov, V., Campbell, M., Carlson, J., Chalot, M., Chapman, J., Chen, G.-L., Cooper, D., Coutinho, P. M., Couturier, J., Covert, S., Cronk, Q., Cunningham, R., Davis, J., Degroeve, S., Dejardin, A., dePamphilis, C., Detter, J., Dirks, B., Dubchak, I., Duplessis, S., Ehrling, J., Ellis, B., Gendler, K., Goodstein, D., Gribskov, M., Grimwood, J., Groover, A., Gunter, L., Hamberger, B., Heinze, B., Helariutta, Y., Henrissat, B., Holligan, D., Holt, R., Huang, W., Islam-Faridi, N., Jones, S., Jones-Rhoades, M., Jorgensen, R., Joshi, C., Kangasjarvi, J., Karlsson, J., Kelleher, C., Kirkpatrick, R., Kirst, M., Kohler, A., Kalluri, U., Larimer, F., Leebens-Mack, J., Leple, J.-C., Locascio, P., Lou, Y., Lucas, S., Martin, F., Montanini, B., Napoli, C., Nelson, D.R., Nelson, C., Nieminen, K., Nilsson, O., Pereda, V., Peter, G., Philippe, R., Pilate, G., Poliakov, A., Razumovskaya, J., Richardson, P., Rinaldi, C., Ritland, K., Rouze, P., Ryaboy, D., Schmutz, J., Schrader, J., Segerman, B., Shin, H., Siddiqui, A., Sterky, F., Terry, A., Tsai, C.-J., Uberbacher, E., Unneberg, P., Vahala, J., Wall, K., Wessler, S., Yang, G., Yin, T., Douglas, C., Marra, M., Sandberg, G., Van de Peer, Y., and Rokhsar, D. (2006). The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science*, 313, 1596–1604.

Ueguchi, C., Sato, S., Kato, T., and Tabata, S. (2001). The AHK4 gene involved in the cytokinin-signaling pathway as a direct receptor molecule in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 42, 751–755.

Ulrich, L.E., and Zhulin, I.B. (2010). The MiST2 database: a comprehensive genomics resource on microbial signal transduction. *Nucleic Acids Research*, 38, D401–D407.

Umezawa, T., Nakashima, K., Miyakawa, T., Kuromori, T., Tanokura, M., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2010). Molecular basis of the core regulatory network in ABA responses: sensing, signaling and transport. *Plant and Cell Physiology*, 51, 1821–1839.

Upchurch, R.G. (2008). Fatty acid unsaturation, mobilization, and regulation in the response of plants to stress. *Biotechnology Letters*, 30, 967–977.

Urao, T., Yakubov, B., Satoh, R., Yamaguchi-Shinozaki, K., Seki, M., Hirayama, T., and Shinozaki, K. (1999). A transmembrane hybrid-type histidine kinase in *Arabidopsis* functions as an osmosensor. *The Plant Cell*, 11, 1743–1754.

Urao, T., Miyata, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (2000). Possible His to Asp phosphorelay signaling in an *Arabidopsis* two-component system. *FEBS Letters*, 478, 227–232.

V

Vahisalu, T., Kollist, H., Wang, Y.-F., Nishimura, N., Chan, W.-Y., Valerio, G., Lamminmäki, A., Brosché, M., Moldau, H., Desikan, R., et al. (2008). SLAC1 is required for plant guard cell S-type anion channel function in stomatal signalling. *Nature*, 452, 487–491.

Veerabagu, M., Elgass, K., Kirchler, T., Huppenberger, P., Harter, K., Chaban, C., and Mira-Rodado, V. (2012). The *Arabidopsis* B-type response regulator 18 homomerizes and positively regulates cytokinin responses. *The Plant Journal*, 72, 721–731.

Veerabagu, M., Kirchler, T., Elgass, K., Stadelhofer, B., Stahl, M., Harter, K., Mira-Rodado, V., and Chaban, C. (2014). The interaction of the *Arabidopsis* response regulator ARR18 with bZIP63 mediates the regulation of proline dehydrogenase expression. *Molecular Plant*, 7, 1560–1577.

Verma, V., Sivaraman, J., Srivastava, A.K., Sadanandom, A., and Kumar, P.P. (2015). Destabilization of interaction between cytokinin signaling intermediates AHP1 and ARR4 modulates *Arabidopsis* development. *New Phytologist*, 206, 726–737.

Virk, S.S., and Singh, O.S. (1990). Osmotic properties of drought stressed periwinkle (*Catharanthus roseus*) genotypes. *Annals of Botany*, 66, 23–30.

W

Wang, B., Chen, Y., Guo, B., Kabir, M.R., Yao, Y., Peng, H., Xie, C., Zhang, Y., Sun, Q., and Ni, Z. (2014). Expression and functional analysis of genes encoding cytokinin receptor-like histidine kinase in maize (*Zea mays* L.). *Molecular Genetics and Genomics*, 289, 501–512.

Waterhouse, P.M., and Helliwell, C.A. (2003). Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing. *Nature Reviews Genetics*, 4, 29–38.

Werner, T., Motyka, V., Laucou, V., Smets, R., Van Onckelen, H., and Schmulling, T. (2003). Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *The Plant Cell*, 15, 2532–2550.

Wesley, S.V., Helliwell, C.A., Smith, N.A., Wang, M.B., Rouse, D.T., Liu, Q., Gooding, P.S., Singh, S.P., Abbott, D., Stoutjesdijk, P.A., et al. (2001). Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *The Plant Journal*, 27, 581–590.

Whistler, C.A., Corbell, N.A., Sarniguet, A., Ream, W., and Loper, J.E. (1998). The two-component regulators GacS and GacA influence accumulation of the stationary-phase sigma factor sigma(S) and the stress response in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Journal of Bacteriology*, 180, 6635–6641.

Wilkinson, S., and Davies, W.J. (2002). ABA-based chemical signalling: the co-ordination of responses to stress in plants. *Plant Cell & Environment*, 25, 195–210.

Wilkinson, S., and Davies, W.J. (2010). Drought, ozone, ABA and ethylene: new insights from cell to plant to community. *Plant Cell & Environment*, 33, 510–525.

Wohlbach, D.J., Quirino, B.F., and Sussman, M.R. (2008). Analysis of the *Arabidopsis* Histidine Kinase ATHK1 reveals a connection between vegetative osmotic stress sensing and seed maturation. *The Plant Cell*, 20, 1101–1117.

Wolanin, P.M., Thomason, P.A., and Stock, J.B. (2002). Histidine protein kinases: key signal transducers outside the animal kingdom. *Genome Biology*, 3, 3013.1.

Wulfetange, K., Lomin, S.N., Romanov, G.A., Stolz, A., Heyl, A., and Schmulling, T. (2011). The cytokinin receptors of *Arabidopsis* are located mainly to the endoplasmic reticulum. *Plant Physiology*, 156, 1808–1818.

X

Xiao, H., Siddiqua, M., Braybrook, S., and Nassuth, A. (2006). Three grape CBF/DREB1 genes respond to low temperature, drought and abscisic acid. *Plant, Cell and Environment*, 29, 1410–1421.

Xiao, H., Tattersall, E.A.R., Siddiqua, M.K., Cramer, G.R., and Nassuth, A. (2007). CBF4 is a unique member of the CBF transcription factor family of *Vitis vinifera* and *Vitis riparia*. *Plant, Cell and Environment*, 31, 1–10.

Xu, X., Chen, C., Fan, B., and Chen, Z. (2006). Physical and functional interactions between pathogen-induced *Arabidopsis* WRKY18, WRKY40, and WRKY60 transcription factors. *The Plant Cell*, 18, 1310–1326.

Xue, L.-J., Alabady, M.S., Mohebbi, M., and Tsai, C.-J. (2015). Exploiting genome variation to improve next-generation sequencing data analysis and genome editing efficiency in *Populus tremula* × *alba* 717-1B4. *Tree Genetics & Genomes*, 11, 82.

Y

Yamada, H., Suzuki, T., Terada, K., Takei, K., Ishikawa, K., Miwa, K., Yamashino, T., and Mizuno, T. (2001). The *Arabidopsis* AHK4 histidine kinase is a cytokinin-binding receptor that transduces cytokinin signals across the membrane. *Plant and Cell Physiology*, 42, 1017–1023.

Yamamoto, S., Mitobe, J., Ishikawa, T., Wai, S.N., Ohnishi, M., Watanabe, H., and Izumiya, H. (2014). Regulation of natural competence by the orphan two-component system sensor kinase ChiS involves a non-canonical transmembrane regulator in *Vibrio cholerae*: Regulatory connection between two-component system sensor kinase and non-two-component system regulator. *Molecular Microbiology*, 91, 326–347.

Yang, Y., Jiang, Y., Mi, X., Gan, L., Gu, T., Ding, J., and Li, Y. (2016). Identification and expression analysis of cytokinin response regulators in *Fragaria vesca*. *Acta Physiologiae Plantarum* 38: 198.

Yokoyama, A., Yamashino, T., Amano, Y.-I., Tajima, Y., Imamura, A., Sakakibara, H., and Mizuno, T. (2006). Type-B ARR transcription factors, ARR10 and ARR12, are implicated in cytokinin-mediated regulation of protoxylem differentiation in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 48, 84–96.

Yoshida, Y., Kiyosue, T., Nakashima, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (1997). Regulation of levels of proline as an osmolyte in plants under water stress. *Plant and Cell Physiology*, 38, 1095–1102.

Z

Zhigacheva, I.V., Burlakova, E.B., Misharina, T.A., Terenina, M.B., Krikunova, N.I., Generosova, I.P., Shugaev, A.G., and Fattakhov, S.G. (2013). Fatty acid composition of membrane lipids and energy metabolism in mitochondria of pea seedlings under water deficit. *Russian Journal of Plant Physiology*, 60, 212–220.

Zhou, X., Jacobs, T.B., Xue, L.-J., Harding, S.A., and Tsai, C.-J. (2015). Exploiting SNPs for biallelic CRISPR mutations in the outcrossing woody perennial *Populus* reveals 4-coumarate:CoA ligase specificity and redundancy. *New Phytologist*, 208, 298–301.

ANNEXES

ANNEXE 1 : MILIEUX DE CULTURES POUR VEGETAUX

	1L MBase (Cf)	1L M1 (Cf)	1L M2 (Cf)	1L M3 (Cf)	1L M3E (Cf)	1L MS ½ (Cf)
Macroéléments						
NH ₄ NO ₃			20,6 mM			10,3 mM
KNO ₃			18,8 mM			9,4 mM
CaCl ₂ , 2 H ₂ O			3,0 mM			1,5 mM
MgSO ₄ , 7 H ₂ O			1,5 mM			750,6 µM
KH ₂ PO ₄			1,2 mM			624,6 µM
Oligoéléments						
H ₃ BO ₃			100,3 µM			
MnSO ₄ , H ₂ O			100,0 µM			
ZnSO ₄ , 7 H ₂ O			36,9 µM			
KI			5,0 µM			
Na ₂ MoO ₄ , 2 H ₂ O			1,0 µM			
CuSO ₄ , 5 H ₂ O			100,1 nM			
CoCl ₂ , 6 H ₂ O			105,1 nM			
Fer						
C ₁₀ H ₁₂ N ₂ NaFeO ₈			1,1 mM			
Myo-inositol						
C ₆ H ₁₂ O ₆			5,6 mM			
Acide 2-[N-Morpholino] ethanesulfonique (M.E.S)						
C ₆ H ₁₃ NO ₄ S			12,8 mM			
Sucrose						
C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁			30 g/L			20 g/L
Vitamines						
C ₆ H ₅ NO ₂			81,2 µM			
C ₈ H ₁₁ NO ₃			59,1 µM			
C ₁₂ H ₁₈ Cl ₂ N ₄ O ₅			29,7 µM			
C ₁₈ H ₃₂ CaN ₂ O ₁₀			21,0 µM			
C ₃ H ₁₀ ClNO ₃ S			56,9 µM			
C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₃ S			40,9 µM			
L-glutamine						
C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃			13,7 mM			
N6-(2-isopentenyl)adenine (2ip)						
C ₁₀ H ₁₃ N ₅			57,1 µM			
Acide α-naphtalène acétique (ANA)						
C ₁₂ H ₉ O ₂ Na			89,3 µM			
Ticarcilline						
C ₁₅ H ₁₆ N ₂ O ₆ S ₂			500 g/L			
Cefotaxime						
C ₁₆ H ₁₇ N ₅ O ₇ S ₂			250 g/L			
Kanamycine						
C ₁₈ H ₃₆ N ₄ O ₁₁			250 g/L			
Thidiazuron (TDZ)						
C ₉ H ₈ N ₄ O ₅				10 nM	1 nM	
Agar (si milieu solide)						
(C ₁₂ H ₁₈ O ₉)x			7 g/L			

Tableau S1 : Compositions des différents milieux de culture pour la culture in vitro de peuplier.

ANNEXE 2 : SEQUENCES DE DIFFERENTS PARTENAIRES DU MSP POUR LE CLONE 717-1B4 DU GENOTYPE *POPULUS TREMULA X P. ALBA*

>HK1aProm717-1B4

```

TTAACTAGGGTTTACATTTCTTGCCCATAAACTTAGCAATATATGGTTGTAGAGTTTAAAGAAATCATCACTTTTTAGATGTTGTT
CGTACCTTGTTTAATTGACTCTTCTATACCACCTAGATTTTGGGTATAAGCATTATCTATTAAGTTTATTTGGTTATTT
CTAAGTTTTCAATTTTGATTTGCAATATTCTCGCTTATTCAATGTTACTCCTAAGTATAAGTTTGTTCATATATTTGGTT
GTGTTTGTTTTGTTCATTTACCATTTACAGAATAACACAAGCTTGCTACTCAATCTTATTTGGTGTGCTTTTTCTAGAATA
TAGTAATGTACATAAAAAGGGTTTGTGTTTTATAAATTCGGTTGCGAGAAAACCTTCATATTTCTTAAAAATATGATCTTATTT
GAAAATCAATATTTCTTTCAACTTTCAACTTCTTATGATTTCTATTTAGTTTTATTTTCTTAAATTTTATGGCATTTCAG
TTCTATTTAACATTTTAAAGTCAAGTAATAGTGTATCAAATATGTTATCCATCAATCCCATTGCATGATGTAACCTGGACA
CTTGATCATGTCTTGGTTGAACCACATCGGTCATCTTAGATTTACATCATTTGGATAGATAAAATGTTCTCTTATGCAAG
CTCCTCTTAATATTACCATTATACCTAAGTCTTGCTCTCAAGCTTTTGGATGGAGCATGTTAGAAGCAAACATATAAGAA
GAGCTTTAGGCTCTTGAAGACAATCTCACATGTGATATTGTTCCCTTATCTTGATGACGTCAAACCTTTTCAGCTGTAAATG
GGCTTATACCATAAAGTTATGTATACTGGTTCTATTGCAAAGAATAAAGCTTGTTTTGGTGGTTTTTGGCATCATGTGCTT
GATTTAAGAAGTCTCATTCTACTCTTTTTTATTTTACTTTTATTTAGAGTTGGTTTTGACTCCTTTCTTTCCCAAATAAT
TTCTACTATGATACTTCTTATATATATGAATGATATTGTTATTATAAGGTCTGATTCCTTAGTTGACTAAGCAACTATAGA
CACATTTTAAACATTTTCAATTTTATATGAAAGATCTTGGTATCCTACAATATTTTCTTGGTCTTAATATACACCGTTGTCGA
ACTGACACACTTTTGCATCAATATAAGTACACTCAAAGCTTCTCACTGTAGTTGATCTTCAATCCAGTAACTTGGTCCA
TATTTAATGTAGCTACAACAAGATGACGATGAGGTATTATATGATCCCTCGTTGTATAGGTAGCTAGTGAGTTTGAATTA
TTTGATAATTAGTTGGCCTAATATTTCTTTTACTATAACAAGTTAGGCATTTTATATAGGCTCCTCACCATTCTACTT
ACTTATAGTATGACATATCCTTTTATTATCTCAAATTTACTTTAGTCATAGATTATTTTTTCTACCGAGACTTCTTACA
GTTGATGAGTTTTAGTAATGCAGATTGAGTTGGTTTTTCCAATACTCATTATTCATTTATTGGCTAGTGCATGTTTCTTA
GTGATGATTTTTATTTTATAGAAGAGTAAGAAGTATGATCAAGTTTTTAAATCTTCAATTAAGTTTGAATATCATGCTATG
TCATTCGCATGCTTTAAGATTGTCTTACTTTGGGGTCTATTAGGTGAACCTTGATATTTCTCAACTATTTCTTTTTCTTT
TTATGCTAATAACACAAGTATGATTTCAAATTACTATCAATTTGGTCTTTTATGAGCATATCAAGCACATTTGAAGTAGATT
GTCATTCTATTCGTGAAATACTTGATCAACATGTGATTACTTTTCTTATATTTTTATTAAGTTCTAGACAACCTGATATG
TTTACTAGGACTCTATCTTGTATCGACATAATTTATTATTAATAAAATTGATGCTTTGTGATCCACAAATATCAATTTTA
GACAAGTTGTTAGTTGTGATATCTTGATTAAGAGAGTTTTATCCAAGAAATTCATTAATAAGCAATTTATTTGTATACATT
TATCTTTACAGAGATATTGTAATTATAATCCAATAATGATTGTAAGATATAAATTATTAATACTTGACTAGTGAAAGAC
AATCATAACCATTTTGACAAATAGTCTTGACATACCAAGACTAGCTCAAATGCTAGCAACTAAAGAGCAAAATTAACAAC
CATCCTCTACTCGGAATCTTCAAATTTAAATGGTTGTTTAGAAGTTATTTAAATTCACAAACCAACTGAAAACCATT
AAACCATATGAAGTTTTATCAAATCTTACCATATGAAGTTTTATCAAATCTTTATAAAATTTAATAATTTATTTTGT
TTTTCAATTGAATTCAAATGGTTGTTTTCGAGATATCCTAAACCAATTTGAAAAAAAATAATCCTAAGCTAATATTTATAA
ATTTGAATCTAGAAAGCTGTAGACGTTAACACCTCATGTATTGTTGCTCGTCATGAACTATACCCAGAATTTGAGGCATT
ATTGTCCACCTCAAAAAACAAGATATAAAGCACTTTTGGTGTTTTATATGCTATGTGCATGGAACAAAAAGTTGTAGGTC
CAAGTTGCCCCACTTCAACAGCAATCGGTCAAGCAATTGTCCCTTGTTTTGGCCACATCTATCCATGAAGTTTCACCATGT
TCGTTTTCTTTTCTTATTCAAGCTTAAATTTCCCAAACCACAAGAACAGGTTGGAATCTATATCAAAGAGTTGAGATAGG
TGGCAAGTTGTGCTGGATGAGGAATATAAACCCACTTTAGAAAAATTGCAAGAAAAATTTGCCTTCGAAAGGTGGGGAGTGA
CACATGAACCAGCAGCATATTAACACCACACCCCATTAATCACATTGTACAGTCTCCCTCCCTCCCTCTTGTGTCTCT
CGTACAAAAACAAAGCATGAGTTCTTGCTAGTTAATTAACCTTCATCTTCTTTTCGGAATG

```

5' non traduit

Codon d'initiation de la traduction

Figure S1 : séquence de 2943 pb du promoteur du gène HK1a du clone 717-1B4 du génotype Populus tremula x P. alba.

>RR18Prom717-1B4

TCAGATTGGGTGCTTCATGTTTAAATGACCCAAGTTACGAGTTTAAAAAGTTAACACAAATTATTTTTTATTAAGGGCTTT
ATAATCCTTTTTATTTTTTATCGAGTTATTCCAATTTTATGATTTAGGTCACGAGTTTGGTAAGATATTCCAGGTTAGC
TCAACCTTAATTATTATGTTTATAAGTTTGTATGTTAACTGGAAATGACAAAACTGAATTTTTTTACCTTTTTTTATA
TGCAATTAGACATTTAAACATCATTTTTTTATAATAAAAAATAATAATTCAGCTACGCGACAAAGACTATCAATGCTATTCT
AGTCCTACATGGATACAAATTAAGGCTAAATCATCTCTATAAAGATCATTACCCAATACGGGTATTTCCCCTAATAAGC
CTCTCCAATCGTATGCCTTTCAAATCAATAAAAAGTAATTTTCTTGACGGAGGCTATATATATATCCAATTCAGGAAGA
CTAGAAAAGGCAGTATCATTCAAGCAATTAATTAAGGCAAACCTGATCACCGGATTCGGTTCGGATTTGACCATGTCGCT
CTTGATTGTGACATATCCAGTTACGCACATAACATCTTAGTTCTTGCCAACATATTATCCATAGTATTTATAATCTCCAA
CACCCTACTCATGTTTTCCATTAACCTAATAAAAACCTATACGAAGATGTTACTCATGTGTTGATTTTTTTTATGTTATT
ATATGCTAAATATCCATAAAAATTATTTTTTATATGAATGTACTATTTTGTGTATAAATGGCATGATTAAGACCTAATCAGA
GATGAATTTAGTTCTTATATGTGAAAATTAGGAGGAGAATACACCTTACATTTATATTTAAGACCAAAAAACAAAAAAA
TAATTATGTACTCAGATATTAATTTTTTTTTTCTTAGTTACGTTGTAAATAAATTTGTCTTCGAGAGTTAAATTAGATATT
TTCTTTTGGCCAAGGAGATGAATTTTGTTTAGATATATAAAAAACCGGACACACAACACTACTTGTCCGTGATTATAAAA
TAAAAAAAACAAAATTTTAATATTTTTTAAGAAAACATTCATTAATGGAATGTCTTAAAAAAGGAATTCATTGATTGTTA
TTATAATCTATTTGAAAAATATAATAGATATTGCATTTTAAAGTGTTTTTTTTTTAAATATATTAATAATATATATATT
TTTTAAATTTATCTTTTATATCAATATATTAATAATGATTTCAAAAACATTAAAAAAATTAATTTTACATAAATATTGTTT
TAAAATTTTACACACAATATTTTTAATGCTCATCAAATACCGCATGTGGTGTAAACAACCTAACAACTTTGATTACCAA
AAGAGTGCAAGAAACACATTCCTCCATCCGGCTTTGTTGTTAATTTCCATTTATGTGTCATCATGCTACTTTCCCTAAAT
TAAACATTCAAATTTTAAATTTTCCAGGAAGAAAATCCAGTCATTGATTGATCGTCATTAGTGTCCATCAAAAACCTAACG
AACCTAAAGCACCTTTATCACCGTACAATTTAATTACCAAAAAGAGTCACCATCTTTAATGATAGGAATAATCATTAAT
CCATTCATCCTTCTGTAGGGCCCTCCCCCTCACCTTAACCAATGCCACCAAAATCCCATCCTTTGATCCTCCAAATGG
CCCACAATCATCGATGGATGGTCTTGATTCATCAACGCTTACATCGCACATAGCAACAAGCATGGTTACCATTTGGACAT
TTACGTTTACATTACCAAAGCCTCAAAAAGTCTAGCACATCTTCCATATATGGTGACAGCTCTGACAAGGGGAGAAAGAGT
TTACCATAAAAAAATCAAGAAAATAAAAAAGCTTAAAGAGAGAGATAGAGGGGCTCGTATAAACAAAAACCCATTATCATA
TATATTGACAAAAATATTTAATGCAAGAAAAGTAAAAGGTTCTTGTGTTCTGTTGAGAACTGAAGAAAAAAGCTAGA
GACAAATACATAGGGCAGGGGGACGGGGGTTTTGTGTGTAATTTGAAGGGGAAAAAAGAGAGGAAAAAAGCTAGTTATAGATT
TCTGTTTTGTTTTGGGTAGGAACACCCTTCCCTCTCTTTCTTTTTGGCCCATCACCATCATTTGTCCTATTTTGTACAGCTT
TTTTGGTATTACTATCTTCCATTCTTTATCCGTTTTCTCCGATTCTTGTCTGATCCAGCGCCATAGAATCTCTCTCTTTCT
CTTGTTTTGCCATCTGGGTTTTGTCTGAAAGGCTTAAAGAACACATCTTTTAAATGAAGTCATAAAAAATCTTAGCTTTCT
CTCTCTCTCTTTTTTTTTTTTTTGTGATCTCTGTGTTGGGTGCTTTTTGTTTGGTACATGATG

5' non traduit

Codon d'initiation de la traduction

Figure S4 : séquence de 2377 pb du promoteur du gène HK1b du clone 717-1B4 du génotype *Populus tremula x P. alba*.

>RR19Prom717-1B4

CACTCCACCATCTTGAATGATAGAATAATCATTAGTCTGTTTCATCTCTACAAATCTTTATAGGACCCCACTTCACCCTT
AACAAATGCCACCAAATTCCTCCCTTCGATCCTCTAAAGGACCCCAACATCATAGATGGATGGTCTTGATTGATCAATTC
TTACATCACATGGAGCAAGAAACATAGTTCCCATGTGCCAGTTTTTTGCACACACGTCCACTTTATCAAAAACCTCAAAG
TCTACATCTTCCATATATGGAGACAAGAGAGAATGAAGCTTACCATAAAAAAATTCGAAAAAATAGAAAAGCTTCGGAG
GTTGAGAGAGAGAGAGGGGAGGGAGGGAGGCTCATATAAAAAACAAAACCCCATTTATCATATATATTGACAAAAATTAAG
AATGGAAGAAAAAGTAAAAGGCTTATGTGTGCCTGTTTCAAGAGTGAAGAAAAAAGCCAAGGACAAAATACAGAGTGTGAG
ACAGAGAGGGGAGAGGGGAGGGAGGTTGTGTGTAATAAAGAAAAAAGGGGAAAAAAGCTTGTATAGATTTCTGTTTTGGTT
GGGGTTGAATCACCCATCACTCTCTTTCTTTTAGGCTATCACCATCATTGTCCCATTGTACAGCTTTTATAGTGTACTA
ACTTCCATTCTTTCTCTCTTTCTCTGATTCTTGTCTGATGCAATCCCATTGAATCTCCCTCTTTCTTTTGTGTTTGGCAT
CTGGGTTGTCTTAAAGGCCTAAAGAACACTTCTTTCAATTCAGCAGTCATAAAGTTTCAAGACTTTATTTGTGATCTCTGT
ATTGGGTAATTTTTGTTTGGTACATAATGACTGTAGAGGACCAGAGGGGTGGTAATTCAGTTAATGAAAAAATGTTTCC
TGTTGGTATGCGTGTCTAGCTGTTGATGATG

5' non traduit

Codon d'initiation de la traduction

Figure S5 : séquence de 909 pb du promoteur du gène RR19 du clone 717-1B4 du génotype *Populus tremula x P. alba*.

ANNEXE 3 : SEQUENCES DES DIFFERENTES AMORCES UTILISEES

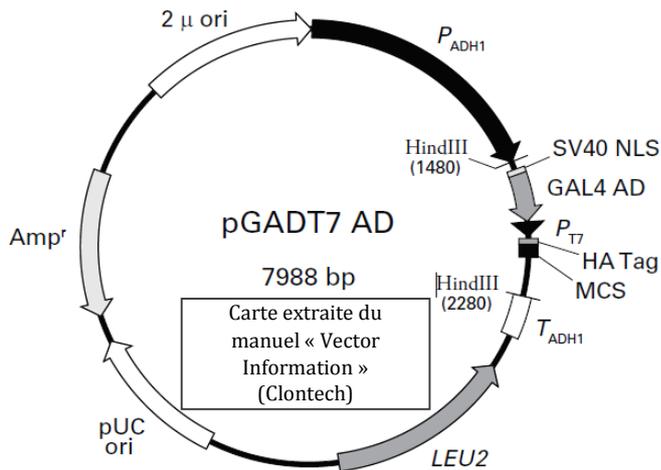
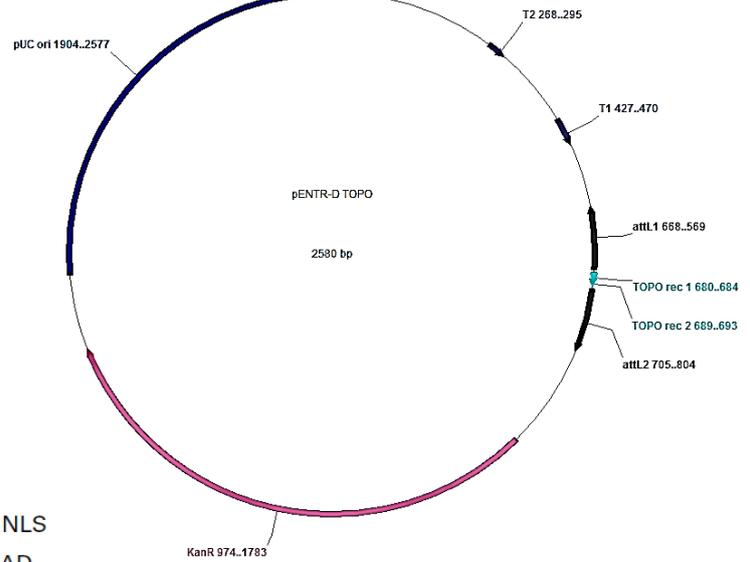
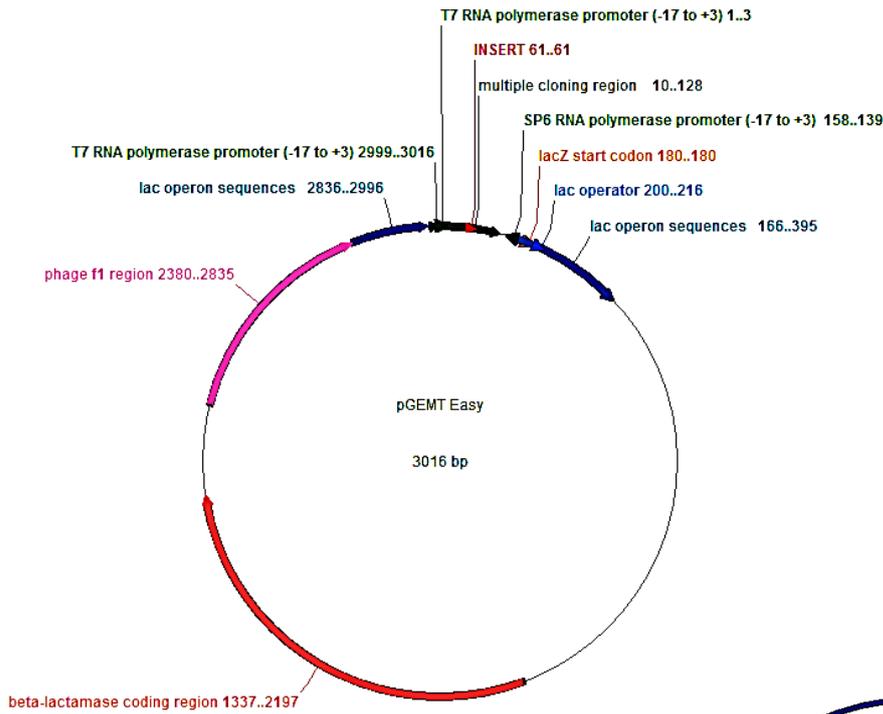
Nom de l'amorce	Plasmide	Séquence (5'-3')	Tm
M13F	pGEM®-T et pENTR™/D-TOPO®	TGTAACGACGGCCAGT	55°C
M13R		CAGGAAACAGCTATGACC	
LexA5	pLex (pBTM116)	ATTGAAGGGCTGGCGGTT	55°C
LexA3		ATCATAAATCATAAGAAATTCGCC	
T7prom	PGADT7	TAATACGACTCACTA	55°C
ACT3		AAAGAAATTGAGATGGTGCACG	
SPYNE5	pSPYNE(R)173	CAACGTCTATATCATGGCCG	60°C
SPYNE3		ATCGCAAGACCGGCAACAGG	
SPYCE5	pSPYCE(MR)	CAAAGACCCCAACGAGAAGC	60°C
SPYCE3		ATATGATAATCATCGCAAGACC	
PGEX5	pGEX-5X-1	GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG	62°C
PGEX3		CCGGGAGCTGCATGTGTGTCAGAGG	
5SeqpRNAi	pK7GWIWG2D(II)	ACGTAAACGGCTTGTCCCGCG	55°C
3P35SRNAi		CTATCGTTCAAGATGCC	

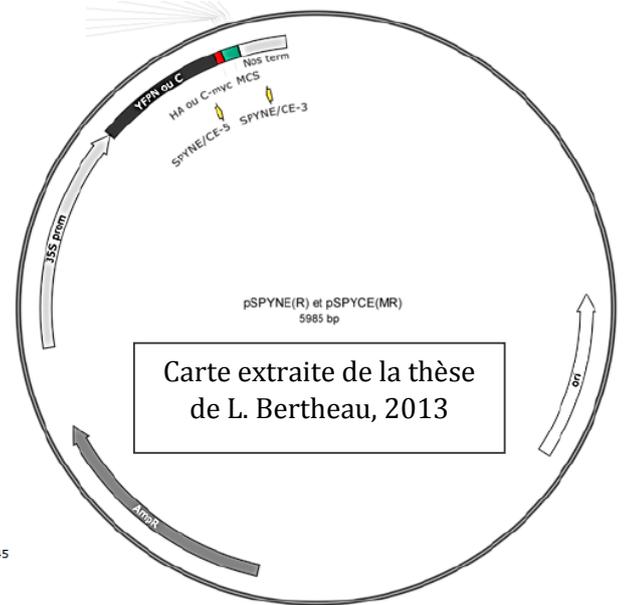
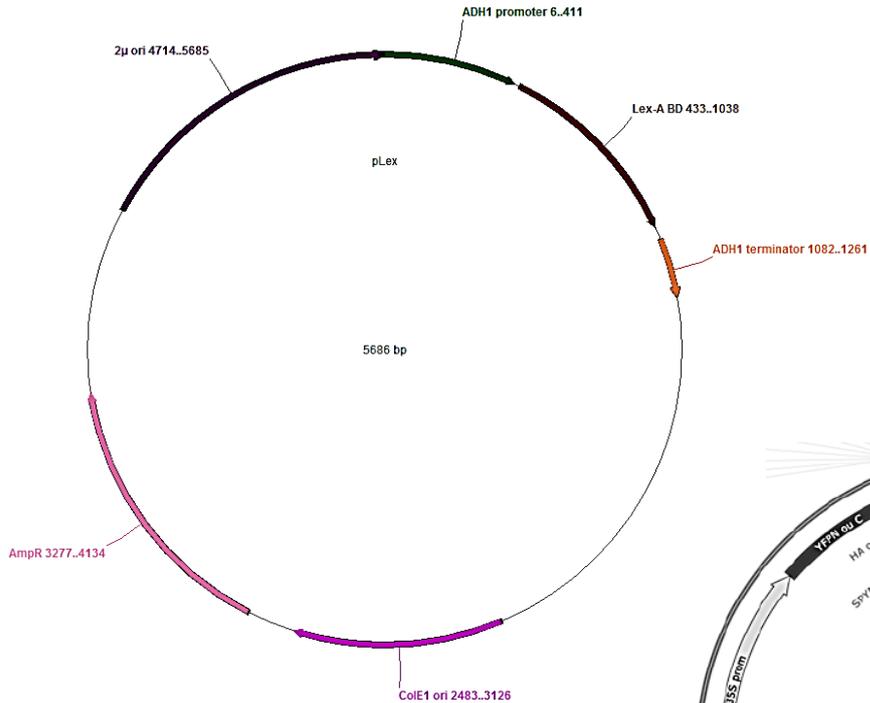
Tableau S2 : Liste des amorces plasmidiques universelles utilisées.

Nom de l'amorce	Cible	Stratégie	Séquence (5'-3')	Tm	
5PtRR18RNAi	RR18 717-1B4	Récupération de la portion 3' non traduite du RR	TATAATGAATGAAATGATCAAACAGG	66°C	
3PtRR18RNAi			ATCTAGAAAACGTTTCATTAACCTCC		
5PtRR19RNAi	RR19 717-1B4		AACGGGTATGAGAATACCAAA	58°C	
3PtRR19RNAi			CAAATATTAAAAATTAAGGAAAGAG		
5PtRR22RNAi	RR22 717-1B4		GAATAATTTTGGCTCCTTGAAG	64°C	
3PtRR22RNAi			AGATACTCAGGAACACATTTCTG		
3RNAi717-RR22			GGAGACACTTTTCTTGGTAGAAAT		
5qRR12	RR12 Dk		Etude de la régulation spatio-temporelle des RR-B / Analyse des niveaux d'extinction des transcrits des lignées transgéniques	CGGGTTCCTTTTATTTTAAATGTT	60°C
3qRR12				GGCCTTCCAGACGCCACCAGAAG	
5qRR13	RR13 Dk	TTAGTTTTTGACTCTTTTATGGA			
3qRR13		GAAGTATCTGAAACACCACCAGAAC			
5qRR14	RR14 Dk	GAAGTAGACTTTGGAGCATTGG			
3qRR14		GATGGCTGGAGCAGGTTGTGG			
5qRR15	RR15 Dk	GCCAAACGGTAATGCAGTGAAGC			
3qRR15		CTTGGTGATATGAAACGAATTC			
5qRR16	RR16 Dk	CCACTGCAGCAGTCATCATTATC			
3qRR16		GGTGCTCCTGTTATAGCTGCAAC			
5qRR18	RR18 Dk	TGGATCCAAAAATGAGGTCTAAC			
3qRR18		TGAAAAGAACGCATATGAAGTTTG			
5qRR19	RR19 Dk	ACCCAACGGGTATGAGAATACC			
3qRR19		GATTCAAACCCGAATTCTCCATC			
5qRR21	RR21 Dk	CCATCAGTTCTGCACATTCCTTG			
3qRR21		CTAGAAGTGCTTGACACTTGATG			
5qRR22	RR22 Dk	AAGTGATAACAAAGACAGAAACAGC			
3qRR22		TTGGGTTGTTGGATCCTCATTTTC			

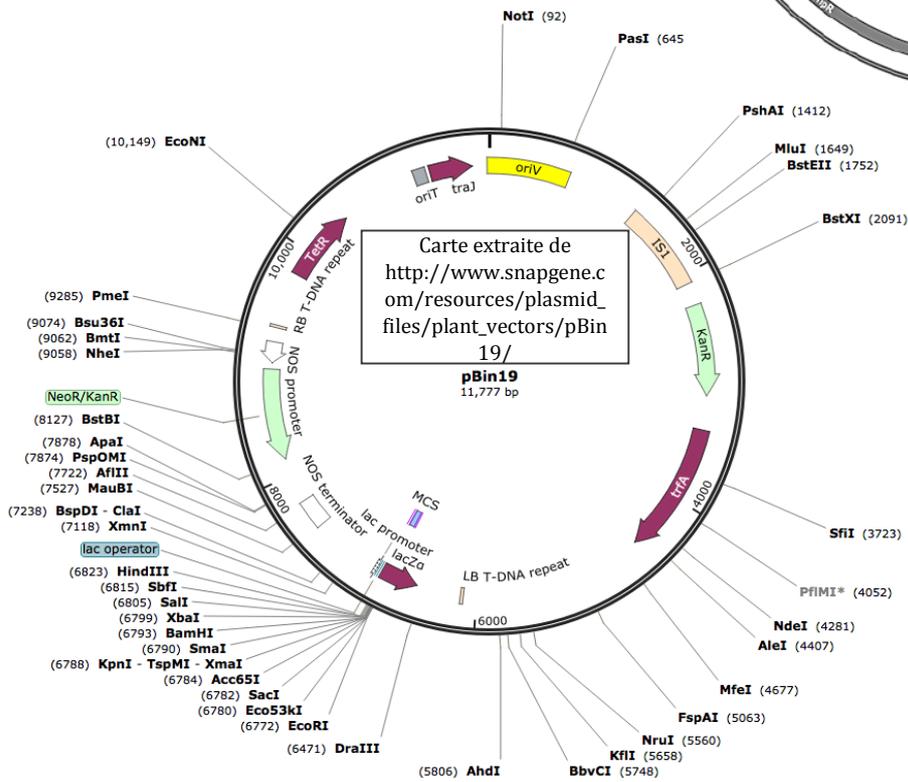
Tableau S3 : Liste des amorces plasmidiques spécifiques utilisées pour les génotypes Populus tremula x P. alba. Clone 7171-1B4 et Dorskamp (Dk).

ANNEXE 4 : CARTES DES PRINCIPAUX PLASMIDES UTILISES





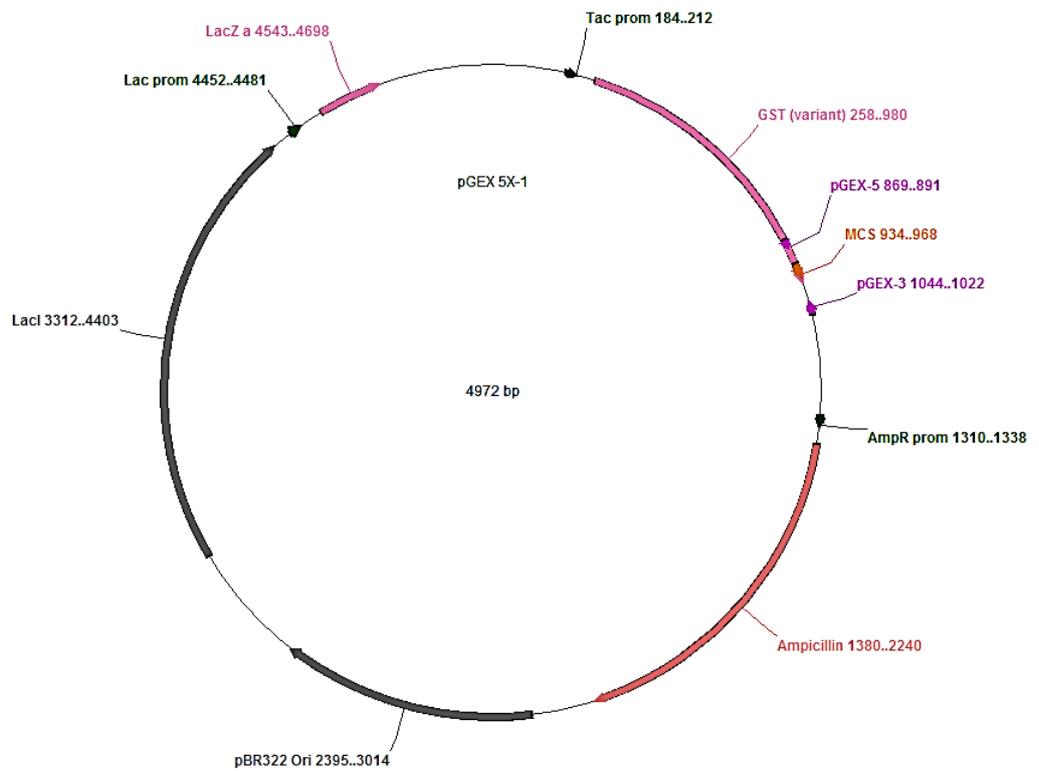
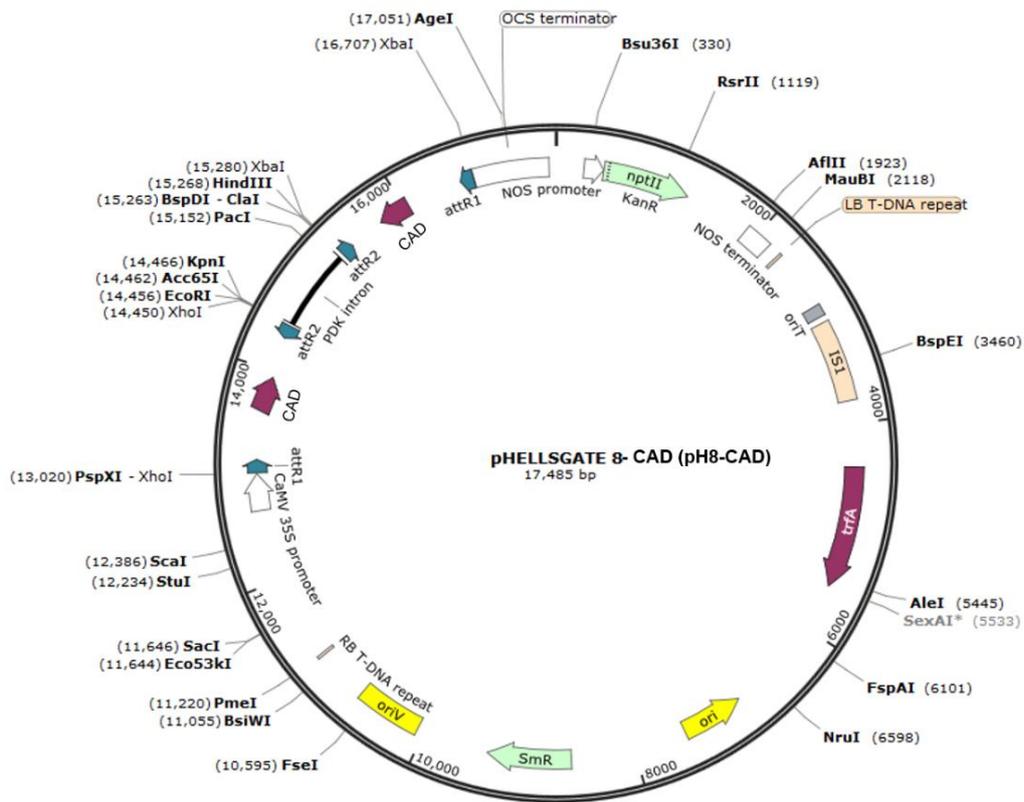
Carte extraite de la thèse de L. Bertheau, 2013

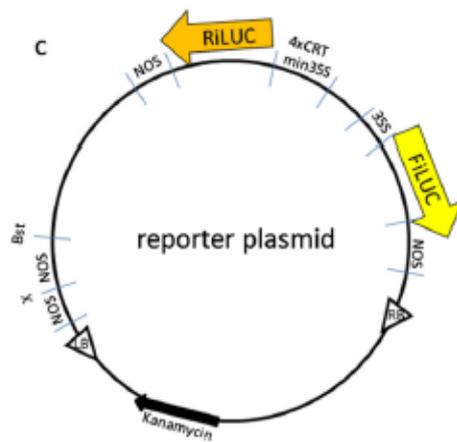
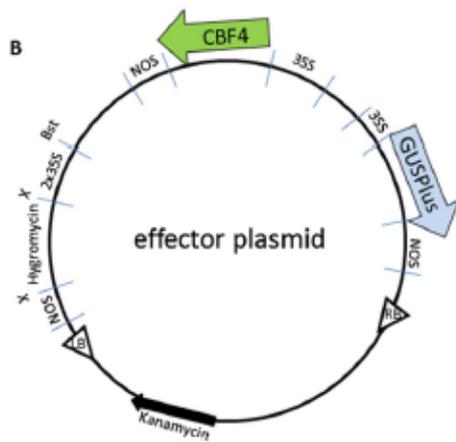
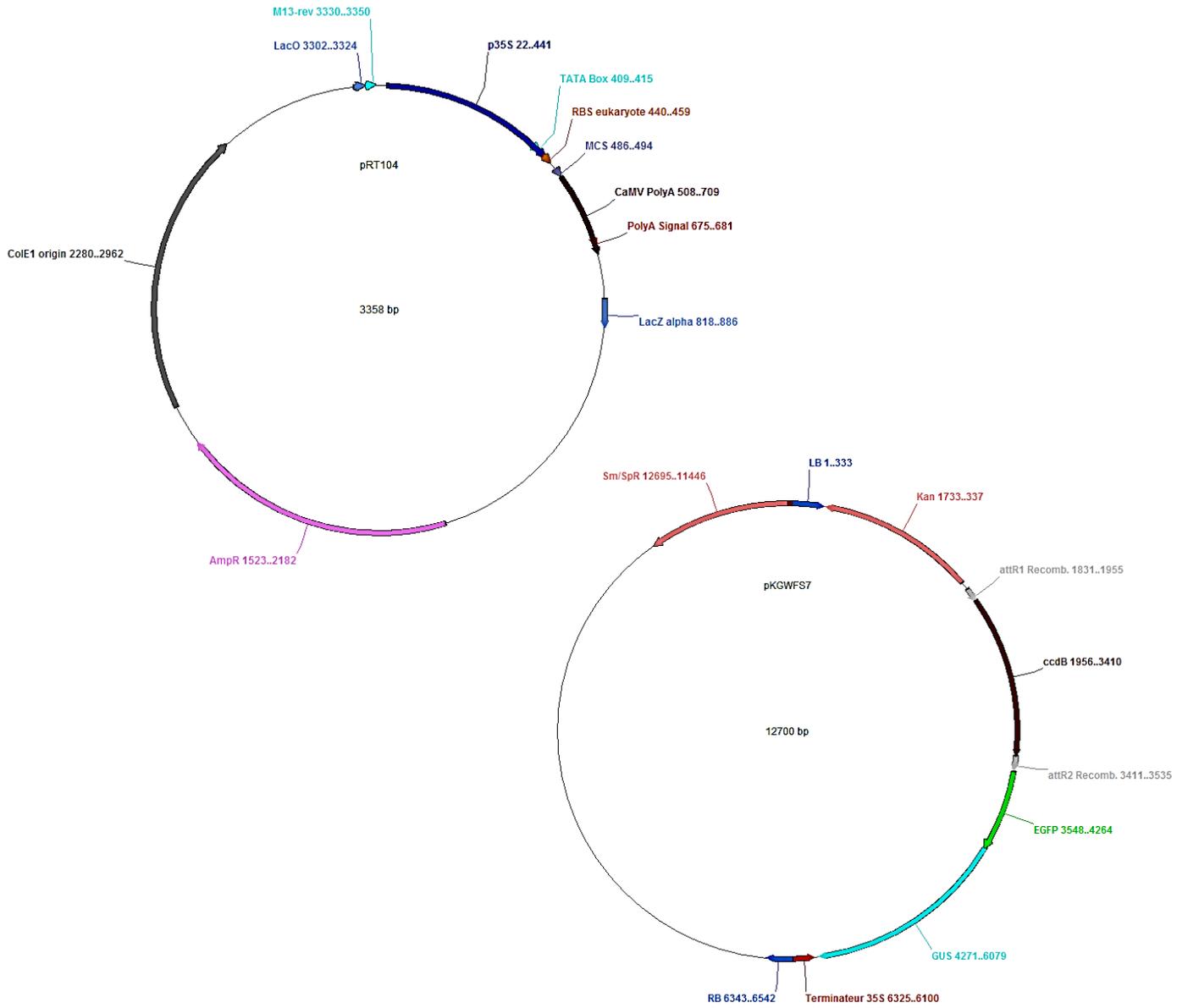


Carte extraite de http://www.snapgene.com/resources/plasmid_files/plant_vectors/pBin19/

pBin19

11,777 bp





Cartes extraite de l'article Nassuth et al., 2014

ANNEXE 5 : ALIGNEMENT DES SEQUENCES RR-B DES GENOTYPES DORSKAMP ET/OU TRICHOCARPA POUR LA TECHNIQUE RT-PCR EN TEMPS REEL

RR12-13 :

Amorces qRR13 déjà utilisées (Thèse L. Bertheau, 2013)

Amorces RR12 choisies dans le 5' non traduit (*P. trichocarpa*) pour 5' et dans le codant (Dorskamp) pour 3'

RR12 : amplicon de 181 bp

RR13 : amplicon de 181 bp

Alignement RR12-RR13 *P. trichocarpa* :

```

PtRR12  AAGTGTGAGCTGGATCCACTCTTCAAGGACTGACCCACTCTTGAATAAAAATAATCCTTTG
PtRR13  -----

PtRR12  ATTAAAATTAAAATAAATATATATTAATACTGAAAGAAACCAGAGAATTTTTAGAGCTT
PtRR13  -----TTTGTAG-----AGCTTCAATGAAGAAGCTGAAGATA
          *:***.      **:.*.* :*** :: *..**.*:

PtRR12  GAATTC AATTC AATTGAAGCTGATGGATGTCTCTTTTATTAATCAATTA CTCTAATAATC
PtRR13  CATGCTCTTTTATAATATCGATATTTTTCCCTTTTT-CTGCTCTCTCTAATAAT
          *: **:.** :**:.:.:. ***. :* * * * **:* * .* :.* :** :*:.**:

PtRR12  CAAGAAAATCCCTTCTTTCCCTCGAACCCCGTGTTCCTCAACCGGGTTCCTTTATTTT
PtRR13  CCAAAACTTCCCTTCTTTCCCTCAAATCTCGTGTATCTCGACTGGGTCTT Tt-AGTTT
          * . * . * . :***** **.* :* *****:***.* ***** ** * ** *

PtRR12  TAATGTTTTTTATGCCAAGTTGAAGTCTTTCAACATGTGAACCTGGTGTCT--CTTTT
PtRR13  TTGACTCTTTTATGCAAAGTTGAAGTCTTTCAACATGTGAATTTAGTAGTGTCTCTCT
          * : . : * ***** . ***** ***** **.* ** **

PtRR12  CTGTTTAAATTGCTTCTCTTGAGATCAAAGT---CCTGCAGCTATGATGAATCTTGCT
PtRR13  TTGTTTAGTTGCTGGGTTTGAGATCAAAGTTTTGTTTGCAGCCATGTTGAATCTCGGT
          ***** .***** ***** ***** ***** **:****** * *

PtRR12  AACTGCAAAGGATCAATGTCAACGGCTACTTCGGTGGCGTCTGGAAGGCCTCTGATGGT
PtRR13  TACTGTAAAGGATCAATGTCAACGGCTAGT-----TCTGGTGGT
          :**** ***** ***** * ***** **

PtRR12  GCCTCAGATCAGTTCCGGCAGGTTGCGTGTGTGGTTGTTGATGATGATCCAACATGC
PtRR13  GTTTCAGATCAGTTCCCGGCAGGTTACGTGTGTGGTTGTTGATGATGATCCAACATGT
          * ***** ***** . ***** ***** *****

PtRR12  CTGTGTATCTTGAGAAGATGCTTAGGACCTGCCGTTATGAAGTTACAAAGTGCAATCGA
PtRR13  CTGTGTATCTTGAGAAGATGCTTAGGACCTGCCCTTATGAAGTCACAAAGTGTAACCGA
          ***** ***** ***** ***** ***** ** **

```

5qRR12
5qRR13

3qRR12
3qRR13

RR14-21 :

Amorces qRR14 et qRR21 choisies dans la séquence codante du génotype Dorskamp

RR14 : amplicon de 183 bp

RR21 : amplicon de 181 bp

Alignement RR14-RR21 codant Dorskamp :

```
RR21      GCTCCCAATCCTCGTAAACCCAGGATTTACAGATGGAATTTGGTCATCCCCTTGCACCT
RR14-17   GTTCCCAATCCTTGTATACCCAGAAGTTCACAAATGGAATTTGGTCATCCCCTTGCACCT
* ****
* :***** * :***** * *****

RR21      CATTTTAATGATGGGTTTAGCCAC-----
RR14-17   CCACAATCAGAAGTAGACTTTGGAGCATTGGATTCTACTTTCCCACAAAGTATCCTTGG
*.: :.:.:**:* . : : .. 5qRR14

RR21      -----
RR14-17   TGTGGAATTCAGAGATTCAACTAAAAAAGAACATAATCCACTTCATTTGAATGATGAA

RR21      -----CTACCAATGCCTGGTCAGAGCAGCTTACACGAGCTGATTATCCACAGCCT
RR14-17   TTCAGCCACCTTCCACTGCCTGGTCAAAAGCAGCTTACCCAAGCTGATTATCCACAACCT 3qRR14
*.:**.* *****.*****.*.*****.***

RR21      GCTCGAGTCGTCAGTTCGCGACCTTCCTTGACAGAAAGAGAAATTTGGTTGCCCTGTCAA
RR14-17   GCTCCAG-----CCATCAGTTCTGCACCATCC
**** ** 5qRR21 ..**.* ** * : :...

RR21      ATTAAGCCTTCACGTAATGACTACGGCAGCAATGCCAGCCATGTAAATTCAACAGCAAAT
RR14-17   TTAACACCTTCTCATAACGAGTACAGGAGCAATGTTAACCATGCAAGTTCAACAGCTATT
:*.:.*****:*.*** ** **.* ***** * .***** ** .*****:*.**

RR21      GCAGTTGACTCTATCCCTCTTCAAACGAAGACCAACTCGACAAATCATCAAG-----
RR14-17   GCGGTTGACTCTAGCACTATTCAATCAAAGACCAGTGTGGCAAATCATCAAGCTATTGAG 3qRR21
** .***** * .**.******.*.***** * .*****

RR21      -----TGTCAAGCACTTCTAGTATGGAAAATCAAGGCTTGAATATGAATTGCCTTACA
RR14-17   CTCATTTCCAAGAGCACACCAAGTTTGGAAAATCAAGGCTTCAATATGAATTCCATTACA
:..*****:*.***.*****.***** ***** * .*****
```

RR15-16 :

Amorces qRR15 choisies dans le codant (Dorskamp) pour 5' et dans le 3' non traduit (*P. trichocarpa*) pour 3'

Amorces qRR16 choisies dans le codant (Dorskamp)

RR15 : amplicon 182 bp

RR16 : amplicon 150 bp

Alignement RR15-RR16 *P. trichocarpa* :

```

PtRR15   CTTGGAACATGAAAAATTATATATGGAGACAAACGGTAATAAAAGTGAAGCAGGAGCCAAA
PtRR16   CTTAGACCATGAAAAATCCTATATGGAGATCAGTGGTAATAAAAGTGAAGCAGGAACC---
          ***.***.*****.*****.***.*****.*****.***
PtRR15   CAGTAATGCAGTGAAGCAGGAGCCAAATGTGAATTTATGGATAACGCCAAAGTTCTCAT
PtRR16   -----AAACATTGAATATATGGATAATGCCAGAGTGGGCAT
          *5qRR15***:*****.***.***.***
PtRR15   CCCAATATTACCACAATTGCCCCCAATACAAGTGATCTCATGAGTGTTCACAAAGAATA
PtRR16   CCCAATATTACAACAATTGCCCCAGCACCAAGCGATCTTATGAGTGTTCACAGAATA
          *****.*****.:.***.***.*****.*****
PtRR15   GTTTGATTTGTGAGGTTCCACAGCTAGAAAGAATTCGTTTCATATCACCAAAGAGTT
PtRR16   GTAACTTGGCTACTTGGTTCGCTGATAACAGTCTTACTTGGATTGGGGATTTTCCTTC
          ***.:*: : : * * *.*:*.***.***. :*: * * .:*. . . :.: . *
PtRR15   CAGGAGGAGTTCGAATCTTAATCCACGGGTAGAGCTAGAGCAGATTTGTTTAGTAGCA
PtRR16   GTTGATATAGTCTAATCTAAATGTACAC-----TTTGG-----CTAGTTTCATAGTT
          : ** .:. ** *****:***.***. *:. * .:*****.*** :

```

3qRR15

Alignement n°1 RR15-RR16 codant Dorskamp :

```

RR15-2   CGGTTGGCTGTGGATGAATTTGAATCAACAATGAGCAACTTGGAAACATGAAAAATTATAT
RR16     CGGTTGGCTGTGGATGAATTTGAATCAACGATGAGCAGCTTAGACCATGAGAAATCCTAT
          *****.*****.*****.***.***.*****.***
RR15-2   ATGGAGACAAACGGTAATAAAAGTGAAGCAGGAGCCAAACGGTAATGCAGTGAAGCAGGAG
RR16     ATGGAGATCAGTGGTAATAAAAGTGAAGC-----AGGAA
          *****.***.*****
RR15-2   CCAAACGTTGAATTTATGGATAACGCCAAAGTTCTCATCCCAATATTACCACAATTGCC
RR16     CCAAACATTTGAATTTATGGATAATGCCAGAGTGGGCATCCCAATGTACACAATTGCC
          *****.*****.***.***.*****.***.*****
RR15-2   CCAAATACAAGTGATCTCATGAGTGTTCACAAAGAAATAG
RR16     CCAGCACCAAGCGATCTTATGAGTGTTCACAGAAATAG
          ***.:.***.***.*****.*****

```

5qRR15

Alignement n°2 RR15-RR16 codant Dorskamp :

```

RR15-2   AGTAAAAATAGTAACATGTTAATGGACGTGGTGCAGCAGCAGAAACAGCAGCAGCAATCA
RR16     AGTCAAAATAGCACCATGTTGATGGACATACTGCAGCAGCAGAAACAGCAGCAACACCA
          ***.*****.***.*****.*****.***
RR15-2   CCACACCTGCCATCATTACCAGAGCCTAGCCGTATAATTAATGTACAGCCATCTTGCC
RR16     GTGCAGCAGTCATCATTATCAGAGCCCAGCTGTTCATTAATGTGCAGCCATCTTGCC
          * .** *: * *****.*****.*** **: *****.*****
RR15-2   GTGGTCCCTTCCCAGTCATCAGCCACTTTTCAAGCTGGAACAGTCTGCTTCAGTCAAT
RR16     GTGGTCCCTTCCCAGTCACCAGCCACTTTTCAAGCAGGAAATAGTCTGCTTCGGTCGAT
          *****.*****:*****.*****.***.***
RR15-2   CAGAATTGCAGCTATAGCCGAAGTCCTATGATTGATTACAGTCTCCTGTACCTCAATCA
RR16     CAGAGTTCAGCTATAACAGGAGCACATGATTGATTACAGTCTTCTGTACAGTCAATCA
          ***.*****.***.***.***.*****.*****

```

5qRR16

3qRR16

RR18-19-22 :

Amorces qRR18 déjà utilisées (Thèse L. Bertheau, 2013)

Amorces qRR19 choisies dans le dans le codant (Dorskamp) pour 5' et dans le codant (*P. trichocarpa*) ou 3' non traduit (Dorskamp) pour 3'.

Amorces qRR22 choisies dans la séquence codante du génotype Dorskamp

RR18 : amplicon de 182 bp

RR19 : amplicon de 180 bp

RR22 : amplicon de 181 bp

Alignement n°1 RR18-RR19-RR22 *P. trichocarpa* :

```

PtRR22      ATTCCTGGTTAGGAGAATAGTCTGGGAACAAGACAGGTGAAGCTA-CCAGAAGGAGACTT
PdorsRR18CDS  GCAATGATCAA-----ACAGGTACGGGAATATTATTTTCTTTATCCAT----C
PtRR19      GCAATGATCAA-----ACGGGATCAAATGATGGCGTCTTGATGGATGGAGAATT 3qRR19
      . : * . : * . . ** : * . . . * . : . :

PtRR22      CGGATGTGGTGGTTATTCTCTAAGGAATTGCATATAAAGCAGATTTAAGCTGCCAAGGTC
PdorsRR18CDS  TCAATTACAACTTCATATGCGTTC-TTTTCAGCTTTTCCGG--TCACCATTTCAAGTTT
PtRR19      CGGGTTTGAATCTTACTCACCTGGA-T---CATGCATTTGAG--ACTCCCTTCCCTCCATA
      . * : . : ** * . : : * * : : . * : . : * * . *

```

Alignement n°1 RR18-RR19-RR22 Dorskamp:

```

RR22-23     AATGAGGTTGAATGTTTCCAGCCATGGA-----AACATTAGTGAGGTCA
RR18        TCTGATGTTGAGAATTTTGGCTTTGGATCCA-----AAAATGAGGTCT 5qRR18
DkRR19      CTTGAAGCTGGGAATTTCTGCTTTGGACCCCAACGGGTATGAGAATACC AAAAATGAGGTCA
      *** * ** . : . * * : * * : * * * : : * . * * * * *

RR22-23     AAAGATGGGTATTTGCTAGGCCAAGAGAAGCCACAGGACAGTTTTGTTTTGAATAATTTT
RR18        AACGAGGATGTTATCTTGGCGCAACAAAGTCCCAGAATGGTTTCGTTCAAATAAATTAC
DkRR19      AATGAGGATTTTCTCTTGGAGCAACAAAGTCTCCTAATGGTTTCGTTCAAATAAATTAT
      ** * * . : * * * * * * . * . * * * * * * . : * * * * * *

RR22-23     GGCTCCTTGGGAAGATTTGCCAACCATTCTTGTTAG-----
RR18        GAGTCTTTGGATGATATAAATGAATGCAATGATCAAACAGGTACGGGAATATATTTTTCG
DkRR19      GATTCTTTGGATGATATAGTGAATGCAATGATCAAACGGGTATGA-----
      * . ** * * * * : * * * * . * . . : * . : * .

RR22-23     -----
RR18        TTTATCCATCTCAATTA CAAACTTCATATGCGTTCTTTTCA GCTTTTCCGGTCAACATTT
DkRR19      -----
      3qRR18

```

Alignement n°2 RR18-RR19-RR22 Dorskamp:

```

RR22-23     CCATTAGAAGTGTGATCAAATACAATCCAACAAGGGTGTGAAGTCAATTCCGGAAGTTCCT
RR18        GCACCTGGAGCCCAAGCAACTACAAATGA---AGTCCATTAACCAT---ATTGGAGAGTTT
DkRR19      GCATTGGATCCCAAGGAATTTAGTTGA---AGTCCATGAACCAT---ATTGGAGACTTT
      ** * . * * * * : * * * * . * * * * *

RR22-23     ACTCATCTTGTATGACACAGCCAGTTTCCCTGTTTCCAGTGGTCCACAAATATGAAAATA
RR18        AATCAGAAAGGTGATACAGCAGGTTTACACTTGCAAGTTGCTTCCCGGATGTCAAAGTG
DkRR19      AATCAGAAAGGTGATGCAACAAGTTTACACTTGCAAGTTGCTTCCCGGATGTCAAAGTG
      * . * * * . : * . * * * . * * . * * * * * * * * * * * * * *

RR22-23     ATTGCTGGAAGCTCAAACAGCCCTTTTGTGGTGTTCAAACAAGCACCTGATGTTGGAA
RR18        ACTATTGGTAGCTTGGCAACACCATATCTGGTGCACACAAGCAGCCCTCCGATATTAACA
DkRR19      ACTATTGGTAGCTTGGCAATACCATATCTAGTGCCGCAACAACCCCTCAGATGCTTCAT
      * . * * * : * * * * . * * * * * * * * * * * * * * * *

RR22-23     GGA CATGATCAAGGGCTCCAAGATGGCCAAAAATCTGGAAAGCAGTCTTCTTTTCAGCA
RR18        GCGAACCCACAACAAATCAGAGTAGAGGATCATTGGTGACCAATCTTCTTAAGCATG
DkRR19      GTGAACCCACAACAAATCAGACTAGGAGATCGTTGGCAACTCAATCTTCTTAAGCATG
      * . * * . : * * * * . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
      3qRR22

```

ANNEXE 6 : RESULTATS DE RT-PCR EN TEMPS REEL

YLS8 :

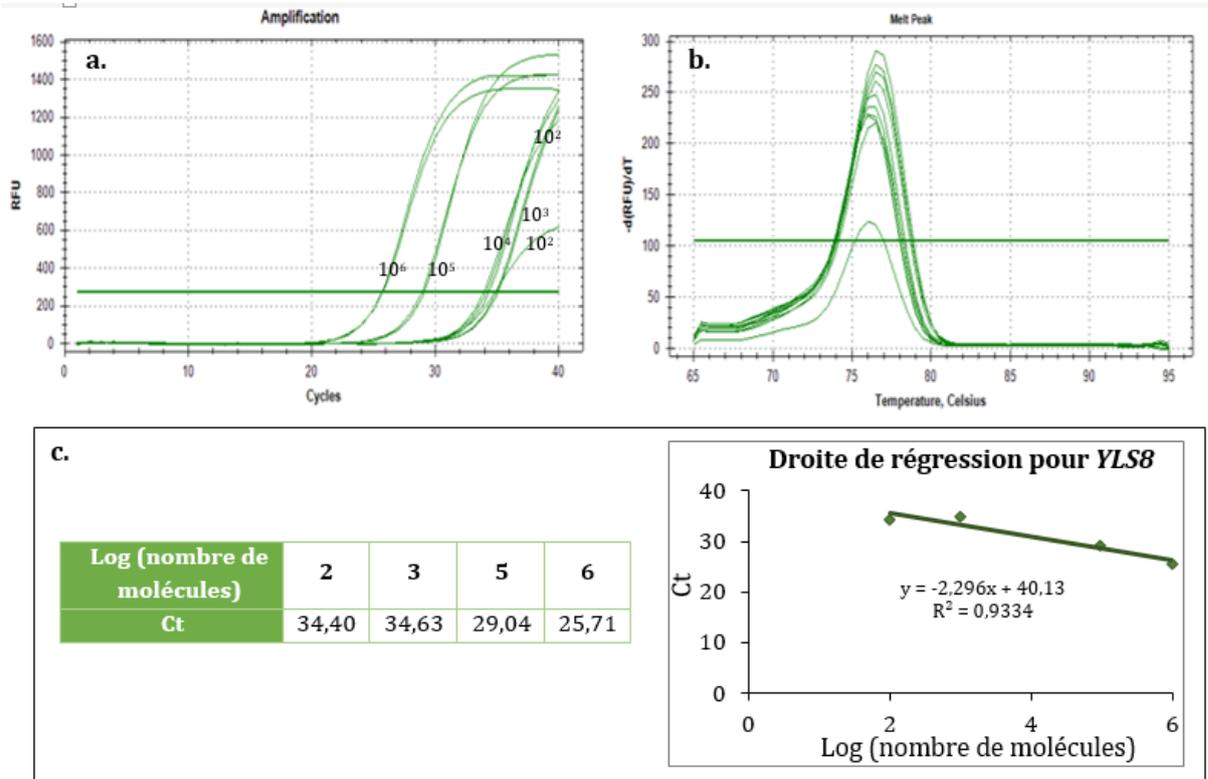


Figure S10 : Test de l'efficacité des amorces permettant l'amplification de 65 pb du gène YLS8 par analyse des profils d'amplification (a.), de la courbe de dissociation (b.) et de la droite de régression (c.) obtenus pour les différentes dilutions des matrices ADN utilisées.

RR18 :

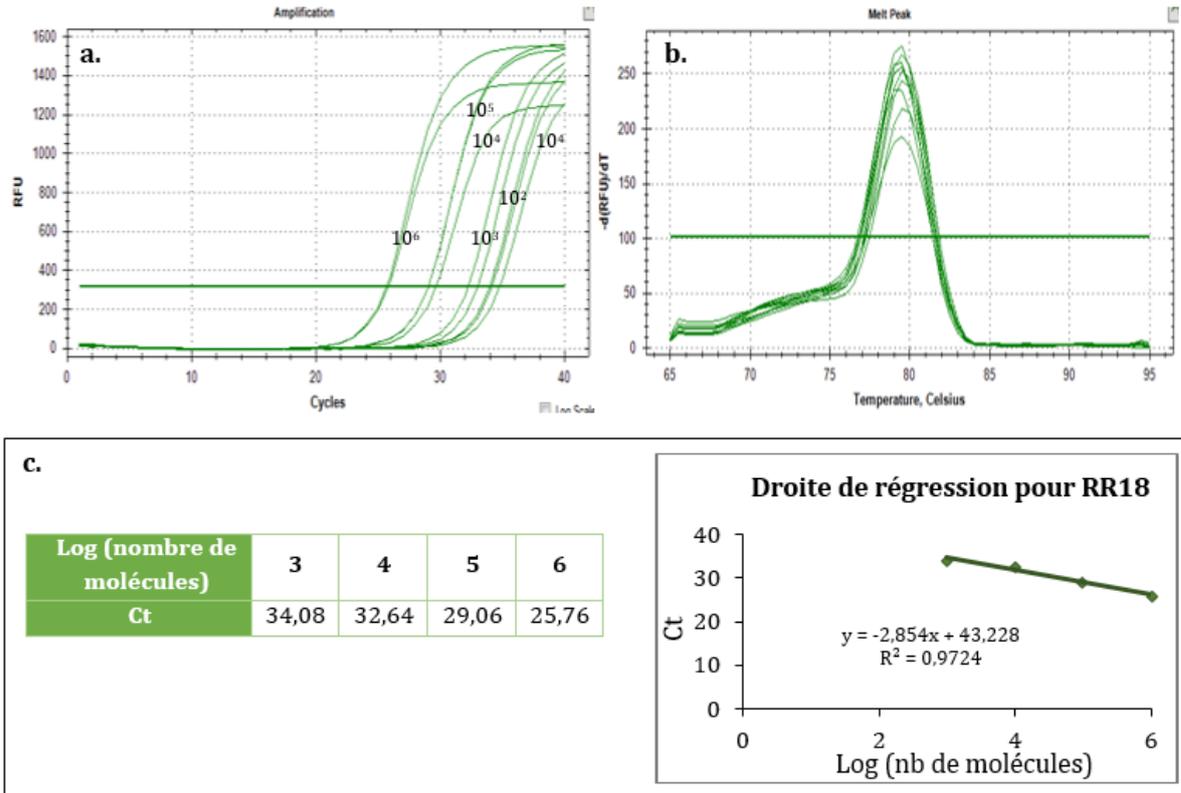


Figure S11 : Test de l'efficacité des amorces permettant l'amplification de 182 pb du gène RR18 par analyse des profils d'amplification (a.), de la courbe de dissociation (b.) et de la droite de régression (c.) obtenus pour les différentes dilutions des matrices ADN utilisées.

RR14 :

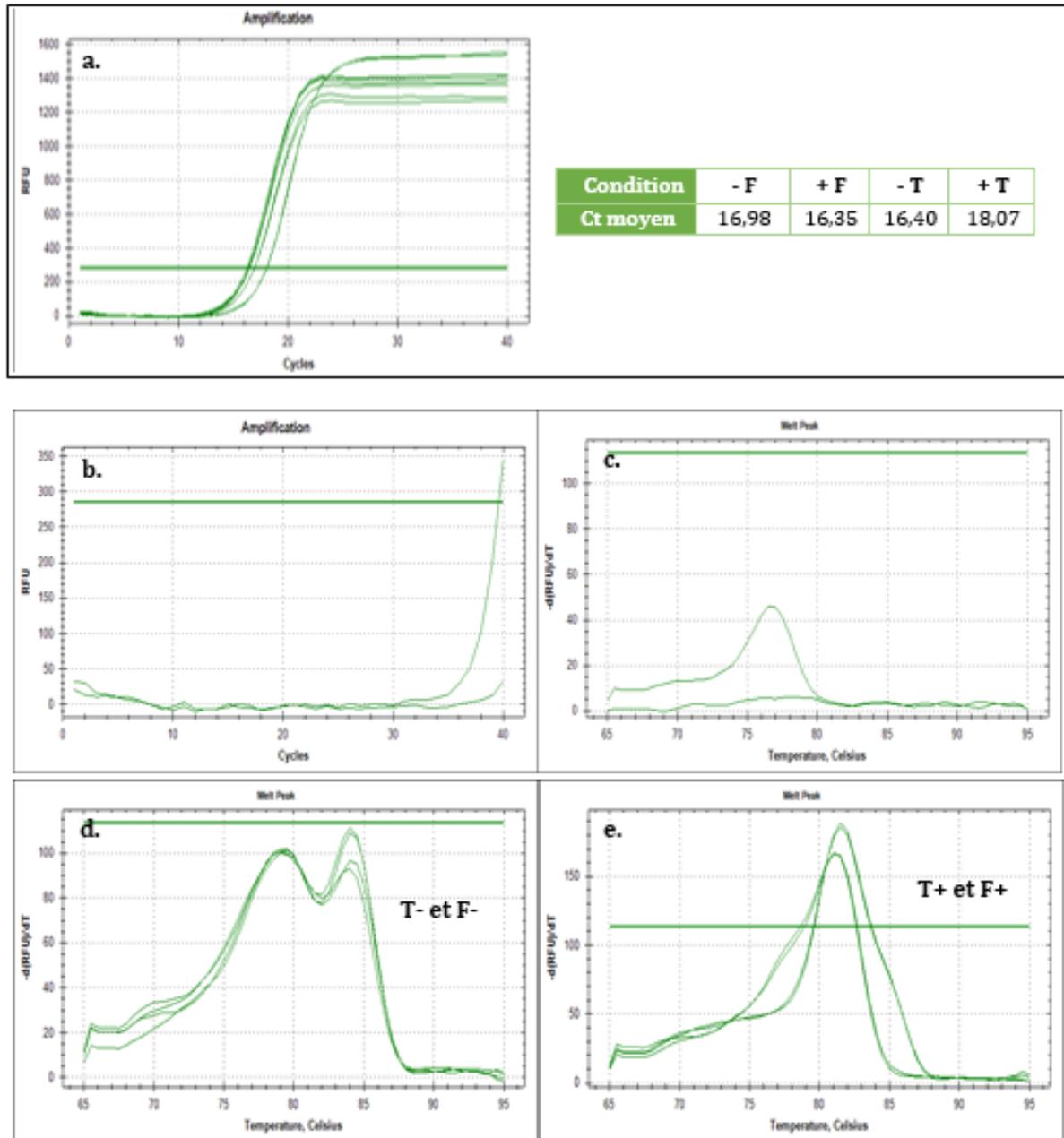


Figure S12 : Test d'amplification de 183 pb du gène RR14 (a.) et des courbes de dissociation obtenues selon l'absence (d.) ou la présence de matrice (e.) par comparaison au profil d'amplification (b) et de dissociation (c) des témoin NTC.

RR15 :

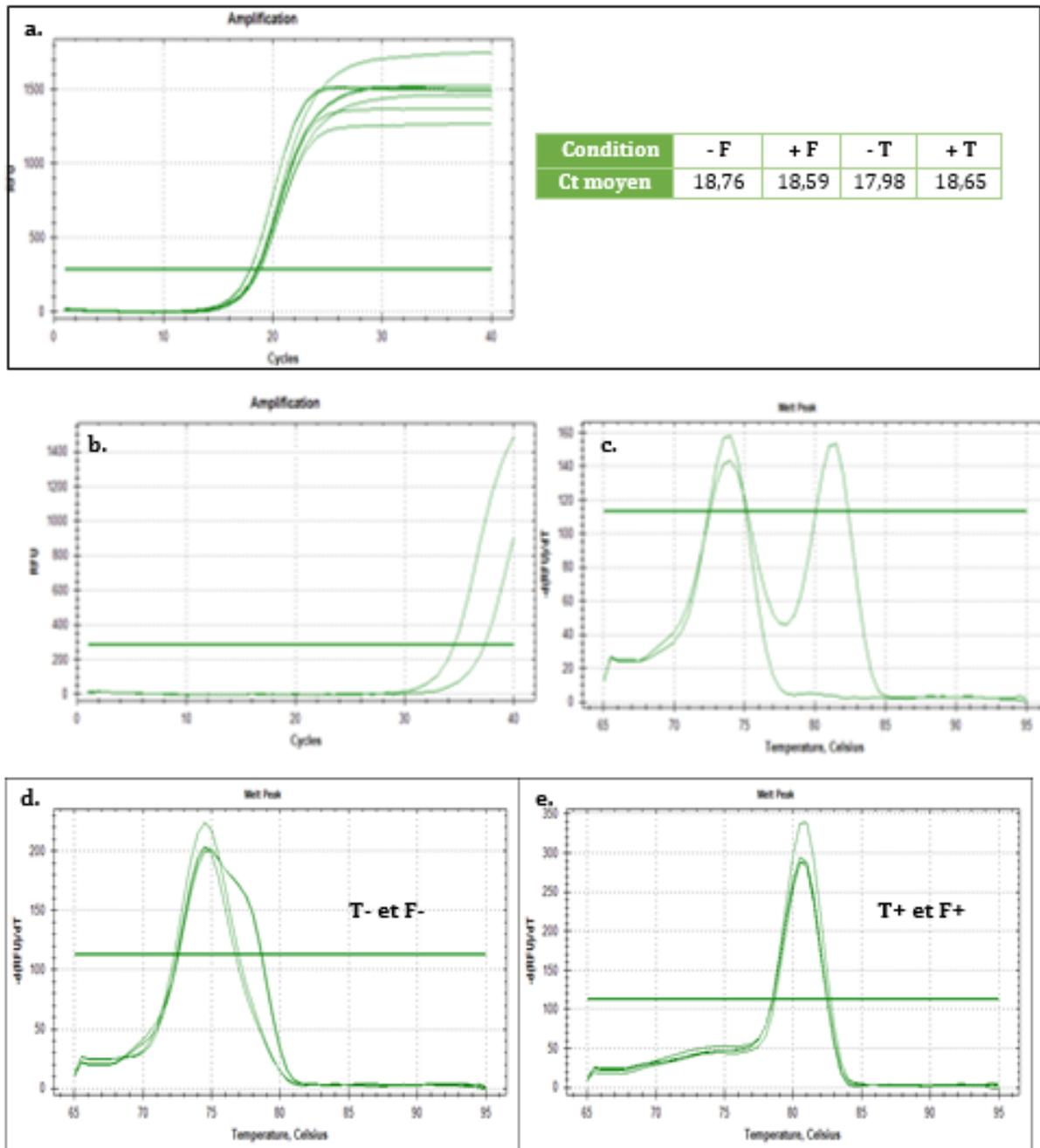


Figure S13 : Test d'amplification de 182 pb du gène RR15 (a.) et des courbes de dissociation obtenues selon l'absence (d.) ou la présence de matrice (e.) par comparaison au profil d'amplification (b) et de dissociation (c) des témoin NTC.

RR16 :

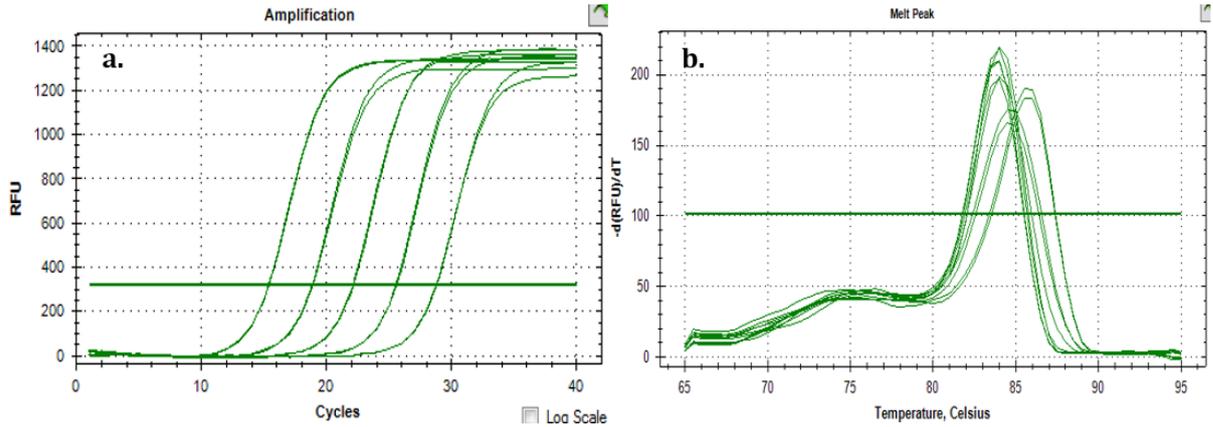


Figure S14 : Test de l'efficacité des amorces permettant l'amplification de 150 pb du gène RR16 par analyse des profils d'amplification (a.), de la courbe de dissociation (b.) obtenus pour les différentes dilutions des matrices ADN utilisées.

RR22 :

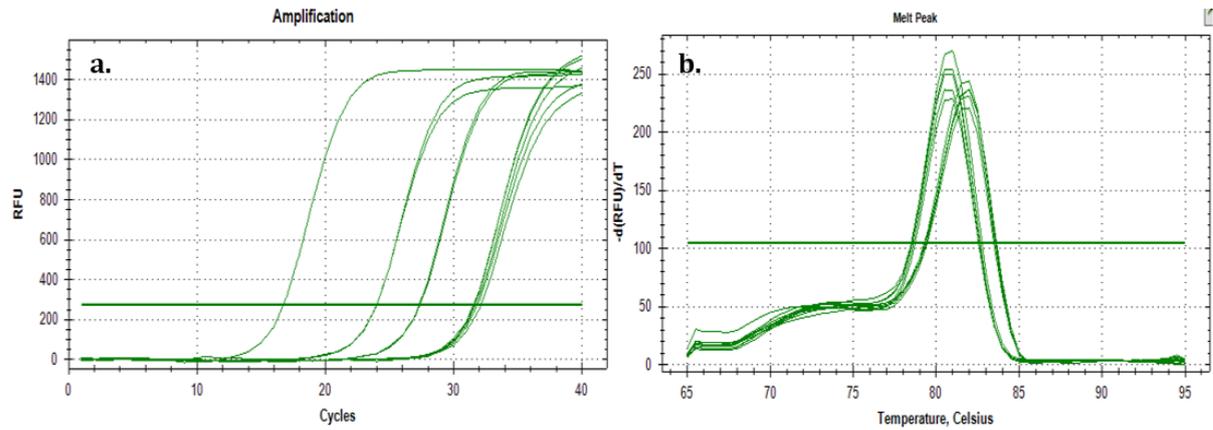


Figure S15 : Test de l'efficacité des amorces permettant l'amplification de 181 pb du gène RR22 par analyse des profils d'amplification (a.), de la courbe de dissociation (b.) obtenus pour les différentes dilutions des matrices ADN utilisées.

ANNEXE 7 : CARTOGRAPHIE DES PROMOTEURS ISOLES

HK1a :

Eléments structuraux généraux

* : boîte TATA sens

✕ : boîte CAAT sens

→ : codon ATG

— : 5'UTR

↔ : Amorces sens et antisens

Motifs RR-B



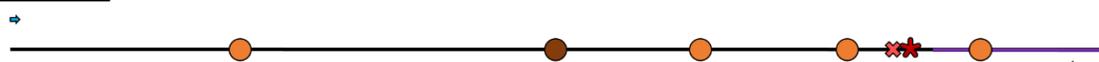
▽ : motif NGAT(T/C) sens (*A. thaliana*)

△ : motif NGAT(T/C) antisens (*A. thaliana*)

▽ : motif AAGAT(T/C)TT sens étendu (*A. thaliana*)

△ : motif AAGAT(T/C)TT antisens étendu (*A. thaliana*)

Motifs MYB



○ : élément MBS sens (*A. thaliana* ou *Z. mays*)

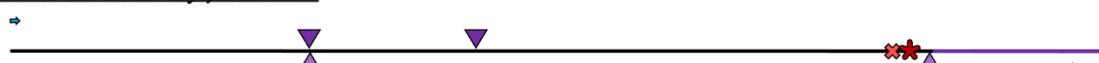
● : élément MBS antisens (*A. thaliana* ou *Z. mays*)

Réactivité aux auxines



▽ : cœur Aux-R sens (*N. tabacum*)

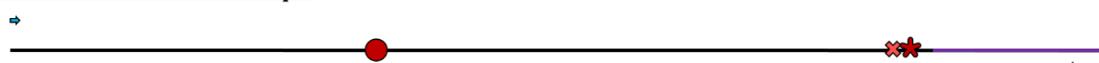
Réactivité au méthyljasmonate



▽ : motif TGACG sens (*H. vulgare*)

△ : motif CGTCA antisens (*H. vulgare*)

Réactivité au stress thermique



● : élément HSE sens (*B. oleracea*)

Bilan

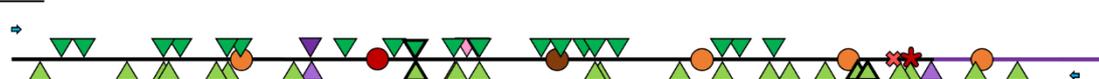


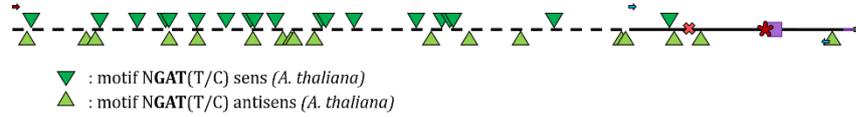
Figure S16 : Analyse des motifs cis-régulateurs divers présent au sein de la séquence promotrice de HK1a.

HK1b :

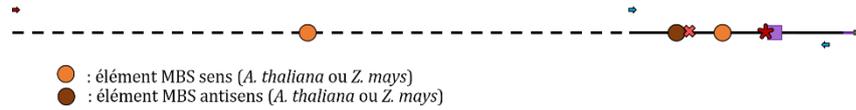
Éléments structuraux généraux

- : stretch riche en Pyr
- ★ : boîte TATA sens
- ✳ : boîte CAAT sens
- ➡ : codon ATG
- : 5'UTR
- ⬆ : Amorces sens et antisens expérimentales
- ⬆ : Amorces sens banques de données

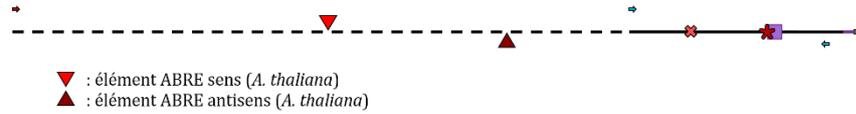
Motifs RR-B



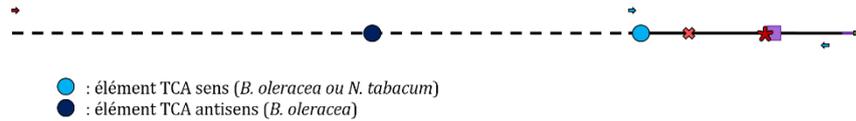
Motifs MYB



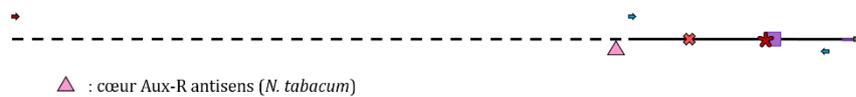
Réactivité à l'acide abscissique



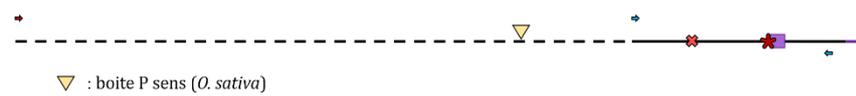
Réactivité à l'acide salicylique



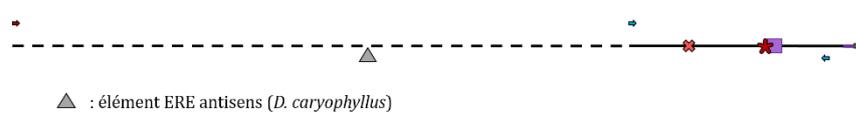
Réactivité aux auxines



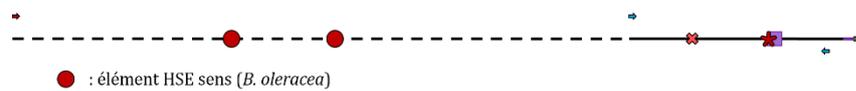
Réactivité aux gibbérellines



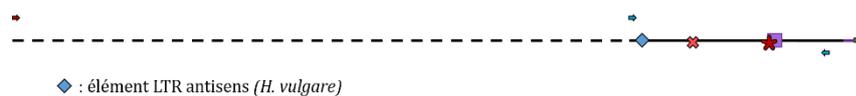
Réactivité à l'éthylène



Réactivité au stress thermique



Réactivité aux basses températures



Bilan



Figure S17 : Analyse des motifs cis-régulateurs divers présent au sein de la séquence promotrice de HK1b. La ligne discontinue représente la séquence obtenue dans les banques de données (*P. trichocarpa*).

RR13 :

Éléments structuraux généraux

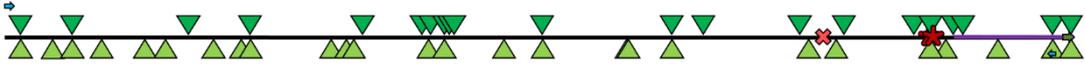
- ✱ : boîte TATA sens
- ✱ : boîte CAAT sens

➡ : codon ATG

— : 5'UTR

⇨ ⇩ : Amorces sens et antisens

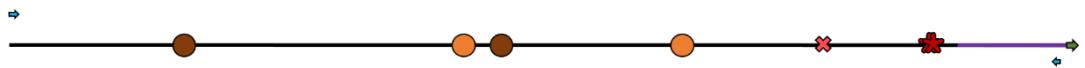
Motifs RR-B



▼ : motif NGAT(T/C) sens (*A. thaliana*)

▲ : motif NGAT(T/C) antisens (*A. thaliana*)

Motifs MYB



● : élément MBS sens (*A. thaliana* ou *Z. mays*)

● : élément MBS antisens (*A. thaliana* ou *Z. mays*)

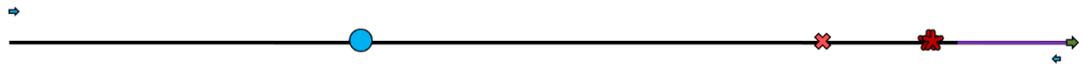
Réactivité à l'acide abscissique



▼ : élément ABRE sens (*A. thaliana*)

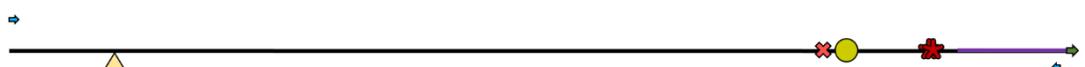
▲ : élément ABRE antisens (*A. thaliana*)

Réactivité à l'acide salicylique



● : élément TCA sens (*B. oleracea*)

Réactivité aux gibbérellines



▲ : boîte P antisens (*O. sativa*)

● : élément GARE antisens (*B. oleracea*)

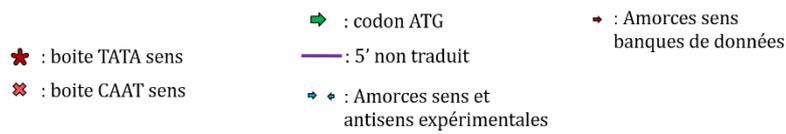
Bilan



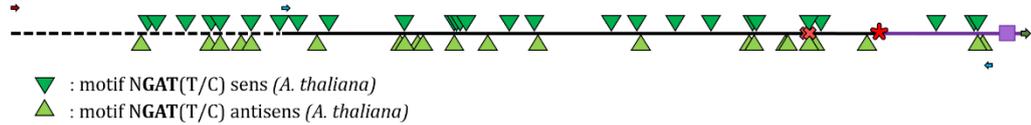
Figure S18 : Analyse des motifs cis-régulateurs divers présent au sein de la séquence promotrice du RR13.

RR18 :

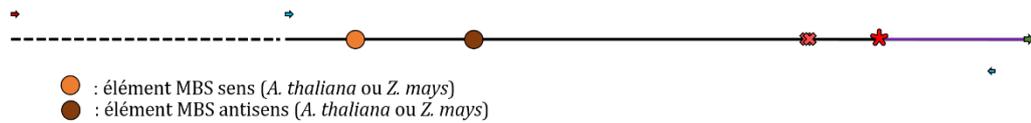
Éléments structuraux généraux



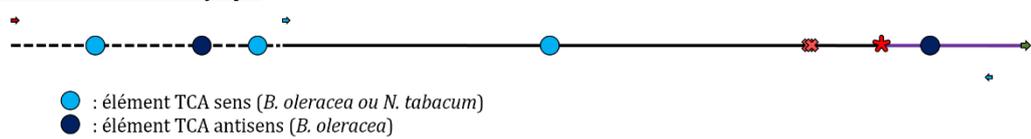
Motifs RR-B



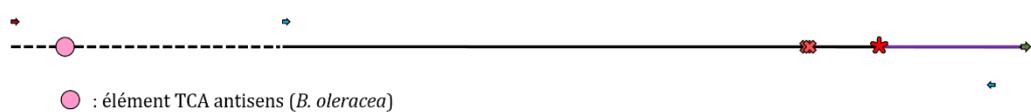
Motifs MYB



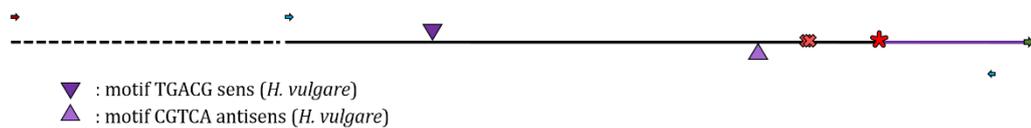
Réactivité à l'acide salicylique



Réactivité aux auxines



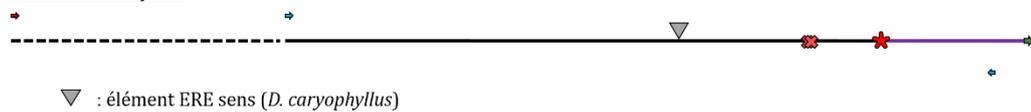
Réactivité au méthyljasmonate



Réactivité aux gibbérellines



Réactivité à l'éthylène



Réactivité au stress thermique



Bilan

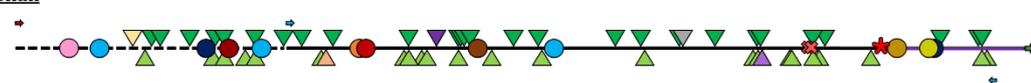


Figure S19 : Analyse des motifs cis-régulateurs divers présent au sein de la séquence promotrice du RR18. La ligne discontinue représente la séquence obtenue dans les banques de données (*P. trichocarpa*).

ANNEXE 8 : STRATEGIE DE CONSTRUCTION POUR L'ETUDE DE DIMERISATION

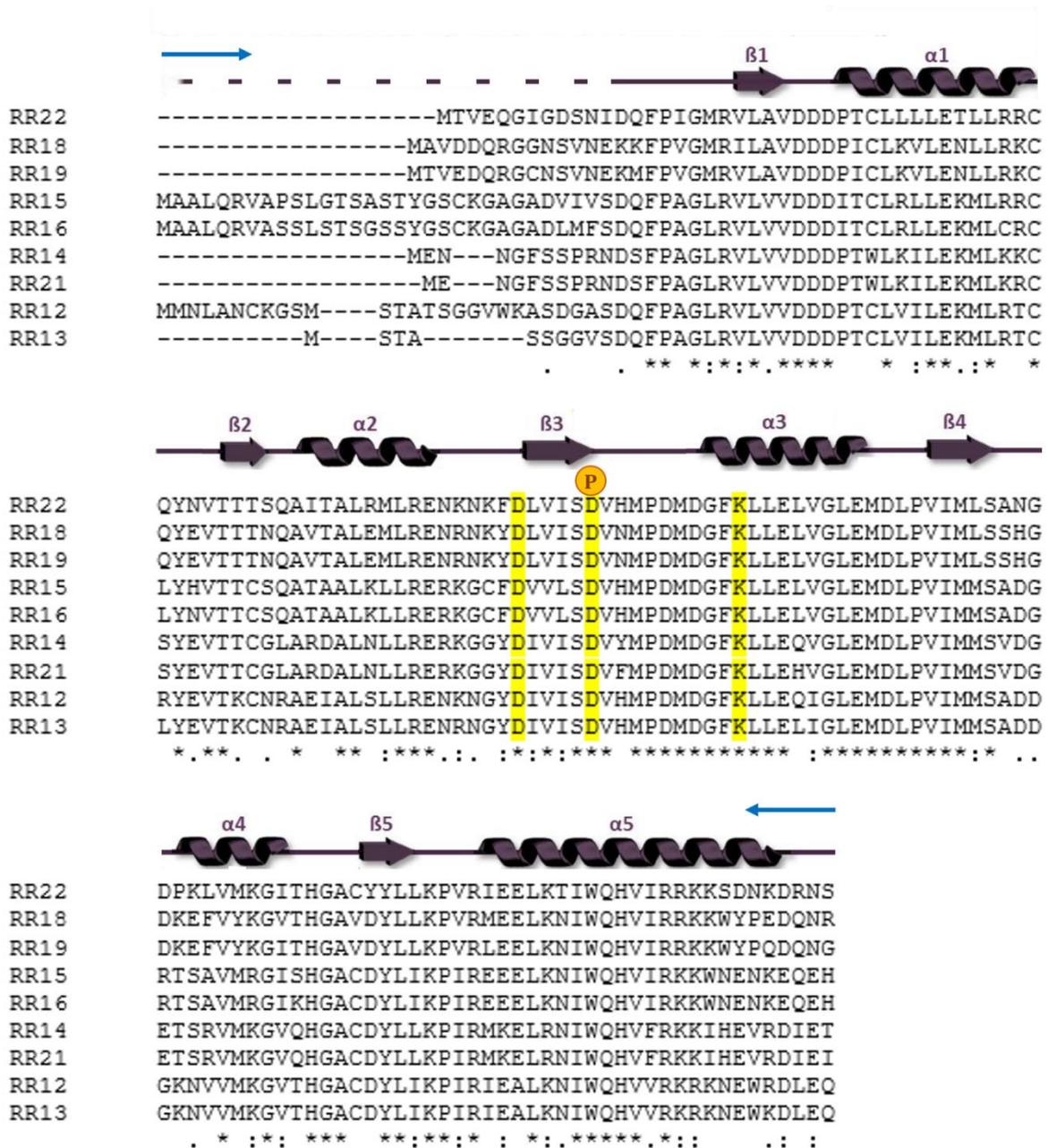


Figure S20 : Alignement des domaines DDK de l'ensemble des RR-B de peuplier, génotype Dorskamp. Les résidus surlignés en jaunes représentent acides aminés aspartate et lysine conservés du motif « DDK » et le deuxième aspartate est le siège de la phosphorylation de la protéine. Les flèches bleues matérialisent les amorces choisies pour la stratégie de clonage de ces domaines dans les plasmides permettant la technique de double-hybride en levure. Les feuillettes et hélices représentées au-dessus des alignements sont extraits de la thèse de L. Bertheau, 2013.

ANNEXE 9 : ALIGNEMENT DES SEQUENCES 3' NON TRADUIT DE 3 RR-B DU CLONE 717-1B4 DU GENOTYPE *POPULUS TREMULA X P. ALBA ET CODANTES DE 2 RR-B DU GENOTYPE DORSKAMP*

3' non traduit RR18, 19 et 22 :

```

RR22-3UTR717-1B4 -----
RR18-3UTR717-1B4 -----
RR19-3UTR717-1B4 AACGGGTATGAGAATACCAAAAATGAGGTCAAATGAGGATTTTCTCTTGGAGCAAACAAA

RR22-3UTR717-1B4 -----GAATAATTTTGGCTCCTTGGGAAGATTGGTGAGCGTAAT
RR18-3UTR717-1B4 -----TATAATGAATGAA--
RR19-3UTR717-1B4 GACTCCTAATGGTTTTCGTTCAAAATAATTATGATTCTTTGGATGATATAGTGAATGCAAT
                * * * * *

RR22-3UTR717-1B4 GATCAATCAGGACAAGACAAG----GAGAGTTACCAGAAGGAGACTTTGGATGTGGTGG
RR18-3UTR717-1B4 -ATGATCAAACAGGATCAAATGATGGTTCCTTAATGGATGGAGAATTCAGGTTTGGATC
RR19-3UTR717-1B4 GATCAAACGGCAGGATCAAATGATGGCCTTTGATGGATGGAGAATTCGGGTTTGAATC
                ** * * * * *

RR22-3UTR717-1B4 TTATTCTCCAAGGAATTGCATATAAGCAGATTTAAACAGCCAAGGTCTCTAAAGAGGAT
RR18-3UTR717-1B4 TTTCTCACCTGGATCATGCATGTGAGTCTTCGAAAGG-----AGA-----
RR19-3UTR717-1B4 TTACTCACCTGGATCATGCATTTGAGACTCCCTTCCT-----CCATATTGAAGGAGAA-
                ** ** * * * * *

RR22-3UTR717-1B4 GATCTGCAGAAGCTTTGTGCTTTCTTGCAGATGAGTTATTCCCTAGTGAATTGATACTCA
RR18-3UTR717-1B4 -----AGAGTATCT-----GAGTCTCACTCCTCTCAT-----GG
RR19-3UTR717-1B4 -----GAAGGGCAT-----CCGAGTTCACTTCTCCCAT-----GG
                ** * * * * *

RR22-3UTR717-1B4 ATATATCTATGTATTCCACTTCTAATTTTCTTTAGAGAAGTGTGTTAATTGCAGTTGT
RR18-3UTR717-1B4 AAAAAATTGTATCTTGTAAATGATTACTCCT-----TTTCTTT-----TTAGTT
RR19-3UTR717-1B4 ACAAATTTGTATCTTGTAGTTGATCTTTCTT-----TTCTTTTTTTTTTTTAGTTA
                * * * * *

RR22-3UTR717-1B4 TTTATCCTTCTCAAATTCGTGAGTAATTTGTTTTTACCTAGTCGATTCAGCTGAGCAT
RR18-3UTR717-1B4 TTTTCCCTTCTCGTTTTTCCCAATGTAATCTCATCTTCTCTTTCTATTCTATTCTCCG
RR19-3UTR717-1B4 TTTTTCCTTCCCCTTTTCCCAACGTACTTTCATCGGCCTTTTCCATTCTTATTCCTG
                *** ** * * * * *

RR22-3UTR717-1B4 CGCAACCTCAAACATTTCCCAAGAACTTGGTTTTGAACTGGGAAAATGCTCACGGGCCCA
RR18-3UTR717-1B4 -----TTACCAGAG-TTAAT---TACCGG--TTA-----ACATTTATA
RR19-3UTR717-1B4 -----TCACTAGAG-TTAAT---TTACTG-GTTA-----ACATTTATA
                * * * * *

RR22-3UTR717-1B4 GAAGAACAAGTGTTTTTG--GCATTATTGGTGACATT---GAGATTGTCACAAGGCCCA
RR18-3UTR717-1B4 ACCTGATCCTTGTTTTTTGATCCTTTCCTCTTCTCAATTCTTATTGATAAACTAATCGT
RR19-3UTR717-1B4 GCAGGATCCTAGTTTTTTTATCTCT-TTCTTTCCTCTTCTCTTGTGATAAACTAGTCGT
                * * * * *

RR22-3UTR717-1B4 CACTAAAGAAAAGAGCTATCATTTTCTACCAAGAAAAGTGTCTCCA-----CTTGCTA
RR18-3UTR717-1B4 ACATATTAATTCATCACCTTTTCTAAAATATTAATTTTACTAATTGTAAATTTACTT
RR19-3UTR717-1B4 ACATATTAATTCATCTCTTTCCTTAATTTTAAATTTG-----
                ** ** * * * * *

RR22-3UTR717-1B4 TTGACCAG---AAATGTGTTCTGAGTATCT
RR18-3UTR717-1B4 TGGAAGTTAATGAACGTTTTCTAGAT-----
RR19-3UTR717-1B4 -----

```

3' non traduit RR18 et 19 :

```
RR18-3UTR717-1B4 -----
RR19-3UTR717-1B4 AACGGGTATGAGAATACCAAAAATGAGGTCAAATGAGGATTTTCTCTTGGAGCAAACAAA

RR18-3UTR717-1B4 -----TATAATGAATGAA--
RR19-3UTR717-1B4 GACTCCTAATGGTTTCGTTCAAATAATTATGATTCTTTGGATGATATAGTGAATGCAAT
                    **** *
                    **** *

RR18-3UTR717-1B4 -ATGATCAAACAGGATCAAAATGATGGTTCCTTAATGGATGGAGAATTCAGGTTTGGATC
RR19-3UTR717-1B4 GATCAAACGGCAGGATCAAAATGATGGCGTCTTGATGGATGGAGAATTCGGGTTTGAATC
                    ** *
                    *****

RR18-3UTR717-1B4 TTTCTCACCTGGATCATGCATGTGAGTCTTCGAAAGGAGA-----AGAGTAT
RR19-3UTR717-1B4 TTACTCACCTGGATCATGCATTTGAGACTCCCTTCCATATTGAAGGAGAAGAAGGGC
                    ** *****
                    ** * * * * *

RR18-3UTR717-1B4 CTGAGTTCTCACTCCTCTCATGGAAAAATGTATCTTGTAATTGATTACTCCTTTTCTT
RR19-3UTR717-1B4 ATCCGAGTTCACTTCTCCCATGGACAAATTTGTATCTTGTAAGTTGATCTTTCTTTCTTT
                    * * *****
                    * * * * *

RR18-3UTR717-1B4 T-----TTAGTTTTTCCCTTCTCGTTTTTCCCAATGTAATCTCATCTTCCCTCTT
RR19-3UTR717-1B4 TTCTTTTTTTTAGTTTATTTTCCCTTCCCTTTTCCCAACGTACTTTCATCGGCCTTTT
                    *
                    * **** * * * * *

RR18-3UTR717-1B4 TCTATTCTTATTCTCGTTACCAGAGTTAATTACCGG-TTAACATTTATAACCTGATCCT
RR19-3UTR717-1B4 TCCATTCTTATTCCCTGTCACTAGAGTTAATTTACTGGTTAACATTTATAGCAGGATCCTT
                    ** *****
                    * * * * *

RR18-3UTR717-1B4 TGTTTTTTGATCTCTTCCCTCTTCTCAATCTTATTGATAAACTAATCGTACATATTA
RR19-3UTR717-1B4 AGTTTTTTTATCTCT-TTCTTTCCTCTTCTCTTGTTGATAAACTAGTCGTACATATTA
                    *****
                    *****

RR18-3UTR717-1B4 TTCATCACCTTTTCTAAAAATTAATTTTACTAATTGTAATTTACTTTGGAAGTTAA
RR19-3UTR717-1B4 TTCATCTCTTTCCTTAATTTTAATATTTG-----
                    *****
                    * * * * *

RR18-3UTR717-1B4 TGAACGTTTTCTAGAT
RR19-3UTR717-1B4 -----
```

3' non traduit RR18 et 22 :

```
RR18-3UTR717-1B4 -----TATAATGAATGAAATGATCAAACAGGATCAAAATGA
RR22-3UTR717-1B4 GAATAATTTTGGCTCCTTGGGAAGATTTGGTGAGCGTAATGATCAATCAGGACAAGACA-A
      * * * * *
RR18-3UTR717-1B4 TGGTTCCTTAATGGATGGAGAATTCAGGTTTGGATCTTTCTCACCTGGATCATGCATGTC
RR22-3UTR717-1B4 GGTCAGTTACCAGAAGGAGACTTTGGATGTTGGTGGTTATTCTCCAAGGAATTGCATATA
      * ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
RR18-3UTR717-1B4 TGTCT-----TCGAAAGGAGAAGAGTATCTGAGTTCTCACTCCTCT
RR22-3UTR717-1B4 TAGCAGATTTAAACAGCCAAGGTCTCTAAAGAGGATGA-TCTGCAGAAGCTTGTGCTTT
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
RR18-3UTR717-1B4 CATGGAAAAAATTGTAT---CTTGTAAATTGATTACTCCTTTTCTTTTAGTTTTTCCCT
RR22-3UTR717-1B4 CTTGCAGATGAGTTATTCTAGTGTAAATTGATACT---CAATATATCTATGTATTCCACT
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
RR18-3UTR717-1B4 TCTCGTTTTTCCCAA-----TGTAATCTCAT-----CTTCCT
RR22-3UTR717-1B4 TCTAATTTTCTTTAGAGAAGTGTGTTGTTAATTGCAGTTGTTTTATCTTCTCAAATTCGT
      *** ** * * * * * * * * * * * * * * *
RR18-3UTR717-1B4 CTTTCTATTCTTATCTC-----CGTTACCAGAGTAAATTACCGGTTAACATTTATAAC
RR22-3UTR717-1B4 CAGAGTAATTTGTTTTTACCTAGTCGATTCAGCTGAGCATCGCAACCTCAAACATTCCC
      * ** * * * * * * * * * * * * * * * *
RR18-3UTR717-1B4 CTGATCCTTGTTTTTTGATCTCTTCTCTCAATTCT-----TATTGATAA
RR22-3UTR717-1B4 AAGAA-CTTGGTTTTGAACTGGGAAAATGCTCACGGGCCAGAGAACAAGTGTGTTTTGG
      ** * * * * * * * * * * * * * * *
RR18-3UTR717-1B4 ACTAATCGTACATATTAATTCATCACCCTTTC-----TAAATATTAATTTTAA
RR22-3UTR717-1B4 CATTATTGGTGACATTGAGATTGTCAACAAGCCCCACACTAAAGAAAAGAGCTATCATT
      * ** * * * * * * * * * * * * * * *
RR18-3UTR717-1B4 CTAAT-TGTAATTTACTTTGGAAGTTAATGA-----ACGTTTTCTAGAT-----
RR22-3UTR717-1B4 CTACCAAGAAAAGTGTCTCCACTTGCTATTGACCAGAAATGTGTTCTGAGTATCT
      *** * * * * * * * * * * * * * * * *
```

3' non traduit RR19 et 22 :

```

RR19-3UTR717-1B4  AACGGGTATGAGAATACCAAAAATGAGGTCAAATGAGGATTTTCTCTTGAGCAAACAAA
RR22-3UTR717-1B4  -----

RR19-3UTR717-1B4  GACTCCTAATGGTTTCGTTCAAATAATTATGATTCTTTGGATGATATAGTGAATGCAAT
RR22-3UTR717-1B4  -----GAATAATTTTGGCTCCTTGGAAAGATTGGTGAGCGTAAT
                ***** ** * ***** ** * ***** * **

RR19-3UTR717-1B4  GATCAAACGGCAGGATCAAAATGATGGCGTCTTGATGGATGGAGAATTCGGGTTTGAATC
RR22-3UTR717-1B4  GATCAATCAGGACAAGACAAGGT-----AGTTACCAGAAGGAGACTTTGGATGTGGTGG
                ***** * * * * * ** * ***** ** * * *

RR19-3UTR717-1B4  TTACTCACCTGGATCATGCATTGAGACTCCCTT-----CCTCCATATTGAAGGA
RR22-3UTR717-1B4  TTATTCCTCCAAGGAATTGCATATAAGCAGATTTAAACAGCCAAGGCTCTTAAGAGGGAT
                *** ** * * * ***** * * * ** * * * * *

RR19-3UTR717-1B4  GA--AGAAG-----GCATCCGAGTTCACCTCTCCCATG
RR22-3UTR717-1B4  GATCTGCAGAAGCTTTGTGCTTTCTTGCAGATGAGTTATTCTAGTGAATG-ATACTC
                ** * ** * * * * * * * *

RR19-3UTR717-1B4  GACAAATTTGTATCTTGTAGTTGA-----TCTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTT
RR22-3UTR717-1B4  AATATATCTATGTATCCACTTCTAATTTTCTTTAGAGAAGTGGTTTGTAAATGCAGTTG
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

RR19-3UTR717-1B4  ATTTTTCCTTCCCCTTTTCCCAACGTAATTCATCGGCCTTTTCCATTCTTAT-----
RR22-3UTR717-1B4  TTTTATCCTTCTCAAATTCGTCAGAGTAATTTGTTTTACCTAGTCGATTACAGCTGAGCA
                *** ***** * * * * * * * * * * * * * * * * *

RR19-3UTR717-1B4  -----TCCCTGTCACTAG-----AGTTAATTTACTGGTTAACATTTA
RR22-3UTR717-1B4  TCGCAACCTCAAACATTCCCAAGAACTTGGTTTTGAACTGGGAAATGC-TCACGGGCC
                ***** ** * * * * * * * *

RR19-3UTR717-1B4  TAGCAGGATCCTAGTTTTTTTATCTCTTT-CITTCCTCTTCTCTTGTGATAAACTAGTC
RR22-3UTR717-1B4  CAGAAGAACA--AGTGTTTTGGCATTATTGGTGACATTGAGATTGCACAGGCCCC-A
                ** ** * * * * * * * * * * * * * * * * *

RR19-3UTR717-1B4  GTACATATTAATTCATCTC-----TTTCCTTAATTTTAAATAT
RR22-3UTR717-1B4  CACTAAAGAAAAGAGCTATATTTCTACCAAGAAAAGTGTCTCCACTTGCTATTGACCAG
                * * * * * * * * * * * * * * * *

RR19-3UTR717-1B4  ----TTG-----
RR22-3UTR717-1B4  AAATGTGTTCTGAGTATCT
                **

```

Séquence codante Dorskamp des RR18 et 19 :

```

RR18      ATGGCTGTAGACGACCAAAGGGTGGTAATTCAGTTAATGAAAAAAGTTTCTGTTGGA
DkRR19    ATGACCGTAGAGACCAAAGGGTGGTAATTCAGTTAATGAAAAAAGTTTCTGTTGTT
                *** * ***** *****

RR18      ATGCGTATTCTAGCTGTTGATGATGACCCAATTTGCCTCAAAGTTTGGAGAATTTGCTT
DkRR19    ATGCGTATTCTAGCTGTTGATGATGACCCAATTTGCCTCAAAGTTTGGAGAATTTGCTT
                ***** *****

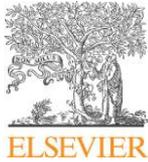
RR18      CGTAAATGCCAGTATGAGGTTACAAC TACCAATCAAGCAGTCACTGCTCTGGAAATGTTG
DkRR19    CGTAAATGCCAGTACGAA GTTACAAC TACCAATCAAGCAGTCACTGCTCTGGAAATGTTG
                ***** * *****

RR18      AGAGAAAACAGAAACAAGTATGACTTGGTTATCAGTGACGTTAACATGCCAGACATGGAT
DkRR19    AGAGAAAACAGAAACAAGTATGACTTGGTTATCAGTGACGTTAACATGCCAGACATGGAT
                ***** *****

RR18      GGCTTTAAGCTCCTTGAACTCGTGGGGCTCGAAATGGA CCTACCCGTCATAATGTTATCA
DkRR19    GGCTTTAAGCTCCTTGAACTCGTGGGGCTCGAAATGGA TCTACCCGTTATCATGTTATCA
                ***** * * * * *

RR18      TCTCATGGTGATAAAGAGTTTGTATAACAAGGGCGTTACACATGGTGCTGTTGACTATTTG
DkRR19    TCTCATGGTGATAAAGAGTTTGTGTATAAAGGGGATTACGCATGGTGCTGTTGACTATTTG
                ***** * * * * *

```



Contents lists available at ScienceDirect

Plant Physiology and Biochemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/plaphy

Research article

Insights into B-type RR members as signaling partners acting downstream of HPT partners of HK1 in the osmotic stress response in *Populus*



Lucie Bertheau^{a, b, c}, Inès Djeghdir^{a, b}, Emilien Foureau^d, Françoise Chedfor^{a, b},
Gaëlle Glevarec^d, Audrey Oudin^d, Christiane Depierreux^{a, b}, Domenico Morabito^{a, b},
Franck Brignolas^{a, b}, Vincent Courdavault^d, François Héricourt^{a, b}, Daniel Auguin^{a, b},
Sabine Carpin^{a, b, *}

^a Université d'Orléans, UPRES EA 1207, Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures (LBLGC), 45067 Orléans Cedex 2, France

^b INRA, USC1328, Arbres et Réponses aux Contraintes Hydriques et Environnementales (ARCHE), 45067 Orléans Cedex 2, France

^c Université de Toulon, EA 3819, Laboratoire Processus de Transferts et d'Echanges dans l'Environnement (PROTEE), 83957 La Garde Cedex, France

^d Université François Rabelais de Tours, EA 2106, Biomolécules et Biotechnologies Végétales (BBV), 37200 Tours, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 February 2015

Received in revised form

12 May 2015

Accepted 8 June 2015

Available online 12 June 2015

Keywords:

B-type response regulator

Gene regulation

Histidine containing phosphotransfer protein

Osmotic stress

Populus

Proteins interaction

ABSTRACT

The B-type response regulators (B-type RRs), final elements of a signaling pathway called "histidine/aspartate phosphorelay system" in plants, are devoted to the regulation of response genes through a transcription factor activity. Signal transduction consists in the transfer of a phosphoryl group from a transmembrane histidine kinase (HK) which recognizes a given *stimulus* to nuclear RRs via cytosolic shuttle phosphotransfer proteins (HPTs). In *Arabidopsis*, the receptors HK are to date the major characterized candidates to be responsible for initiation of osmotic stress responses. However, little information is available concerning the signaling partners acting downstream of HKs. In *Populus*, three HPTs and five B-type RRs were previously identified as interacting partners of HK1, the *Arabidopsis* AHK1 homolog. Here, we report the isolation of RR18, a member of the B-type RR family, which shares high sequence similarities with ARR18 characterized to act in the osmosensing signaling pathway in *Arabidopsis*, from poplar cuttings subjected to osmotic stress conditions. By using yeast and in planta interaction assays, RR18 was further identified as acting downstream of HK1 and its three preferential HPT partners. Besides, our results are in favor of a possible involvement of both RR18 and RR13, the main expressed poplar B-type RR, in the osmotic signaling pathway. Nonetheless, different behaviors of these two B-type RRs in this pathway need to be noted, with one RR, RR13, acting in an early phase, mainly in roots of poplar cuttings, and the other one, RR18, acting in a late phase, mainly in leaves to supply an adequate response.

© 2015 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Living organisms constrained by the changing environmental conditions have to perceive and respond effectively to a wide spectrum of factors. The histidine/aspartate phosphorelay systems are part of signaling pathways which mediate the perception of different signals and drive to the induction of an adapted response from the cell. The prototypical two-component system (TCS) in bacteria consists in a single phosphorelay involving two interacting molecules, a histidine protein kinase (HK) and its cognate partner, a response regulator (RR) which plays mostly a transcription factor role necessary for activation of the transcription of their target genes (Stock et al., 2000). In plants, such as *Arabidopsis thaliana*,

Abbreviations: 3AT, 3-amino-1,2,4-triazole; AD, activation domain; BD, DNA-binding domain; BiFC, bimolecular fluorescence complementation; CFP, cyan fluorescent protein; HK, histidine kinase; HPT, histidine containing phosphotransfer protein; MSP, multistep phosphorelay; PEG₆₀₀₀, polyethylene glycol 6000; RR, response regulator; TCS, two-component system; Y2H, yeast two-hybrid; YFP, yellow fluorescent protein.

* Corresponding author. Université d'Orléans, UPRES EA 1207, Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures (LBLGC), 45067 Orléans Cedex 2, France.

E-mail address: sabine.carpin@univ-orleans.fr (S. Carpin).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.06.006>

0981-9428/© 2015 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

these signaling systems, described as multistep phosphorelay (MSP), are more complex than the TCS, complexity that arises amongst others from the presence of an additional receiver domain (related to one present in the RR architecture) in HKs (Horák et al., 2011), implying a first transfer of phosphate from histidine to aspartate residues in the same molecule of the so-called hybrid-type HK. Moreover, an intermediate element in MSP, a histidine phosphotransfer protein (HPT) has been added in order to spatially link the membrane-localized sensor HK and some nuclear output signaling RR. Several AHKs (11) have been identified in *Arabidopsis* to be involved in different signaling pathways activated by diverse environmental or endogenous stimuli. Although AHKs predominantly share a unique architecture composed of structural domains (i.e. transmembrane domains flanking extracellular input domain, kinase and receiver domains) (Hwang et al., 2002), they notably differ in their sensor domain, key element in the perception of specific signaling molecules. Among them, the presence of CHASE (Cyclases/Histidine kinase Associated sensory Extracellular domain) and ethylene binding domains in AHK is a common feature of the cytokinin (AHK2, 3 and 4) and the ethylene (for which ETR1 is the archetype) receptors respectively (Heyl et al., 2007; Binder, 2008). Concerning the other AHKs, the signal detection by an input domain is less established but their involvement is proposed in mega-gametogenesis (Pischke et al., 2002), stomatal signaling (Desikan et al., 2008), salt regulation, resistance to bacterial and fungal infections (Pham et al., 2012) or drought stress (Urao et al., 1999; Tran et al., 2007). Given their role of shuttle proteins, the abilities of the five canonical AHPs (AHP1 to AHP5) to interact with upstream and downstream proteins of MSP were tested with *in vivo* and *in vitro* studies, what revealed that most AHK (Dortay et al., 2006; Pekárová et al., 2011; Mira-Rodado et al., 2012; Bauer et al., 2013) and ARR (Imamura et al., 1999; Lohrmann et al., 2001; Dortay et al., 2006, 2008; Horák et al., 2008; Veerabagu et al., 2012) family members are partners of the majority of AHPs. However, it appears that AHK1 is, with a limited interacting ability, a singular receptor among them all. Indeed, it cannot interact with most of the AHPs as the other AHKs can, but only with AHP2 when tested in yeast (Urao et al., 2000). Among the canonical ARRs family, 23 members have been identified and divided up into three sub-families on the basis of their slightly divergent protein architectures: A-type (10), B-type (11) and C-type (2) (Hwang and Sheen, 2001; Pils and Heyl, 2009). The B-type RR proteins possess a specific domain organization or protein architecture. Indeed, at the amino-terminal end, there is a domain, so called “receiver domain” for bearing the phosphate reception site (at the second aspartate of the conserved DDK motif), which plays a key role in the interaction with AHPs (Lohrmann et al., 2001). In the middle of the sequence, there is a DNA-binding domain related to the MYB domain family, which in plants, is designated as the GARP domain (Riechmann et al., 2000) and finally, at the carboxy-terminal end, there is a transactivation sequence. Because of its particular architecture, a presumed function of transcription factor has been assigned to B-type RRs and further demonstrated in planta for some *Arabidopsis* RRs (Hwang and Sheen, 2001; Sakai et al., 2001; Veerabagu et al., 2014).

Although the understanding of the cytokinin pathway is advanced, yet information is available concerning the osmosensing pathway in *Arabidopsis*. What is known is that the lethality of the *sln1Δsho1Δ* double yeast mutant (defective for osmosensors) is suppressed by complementation with AHK1 in normal and osmotic stressed conditions (Urao et al., 1999). Other AHKs, as for example cytokinin receptors, are also able to complement this yeast mutant (Tran et al., 2007). However, contrary to AHK1, these AHKs seem to be negative regulators in plant responses to drought stress. Indeed, an overexpression of AHK1 leading to a better tolerance of mutants

to drought (Wohlbach et al., 2008), and to salt stress (Tran et al., 2007) was observed in planta. Likewise, Wohlbach et al. (2008) have shown that this protein is involved in desiccation processes of *Arabidopsis* seeds. All these studies had assigned AHK1 a function related to the one ensured by SLN1 protein in yeast, and on the basis of these results, it had been proposed to play an osmosensor role. Nonetheless, Kumar et al. (2013) have questioned whether this HK induces directly downstream cellular response to drought stress, without excluding that AHK1 could directly sense plant water status in a way that remains to be demonstrated. Obviously, AHK1 is the first element of MSP, probably linked to the osmosensing signaling pathway by a still unknown mechanism. However, the studies which deal with signaling partners acting downstream of this HK have not fully explored the details yet. Indeed, only three AHPs (AHP2, 3 and 5) (Nishiyama et al., 2013) and one B-type RR, the ARR18 (Veerabagu et al., 2014), seem to be negative or positive regulators of drought stress responses respectively.

In *Populus Dorskamp* genotype, once we have localized HK1 in plasma membrane and characterized it as a functional histidine aspartate kinase guided by the existing analogy with *Arabidopsis* AHK1, we have focused our research on the identification of direct interactors among the ten HPTs (HPT1 to HPT10) and the eight B-type RRs isolated (Chefdor et al., 2006; Héricourt et al., 2013; Bertheau et al., 2013). Thus, by interaction studies coupled with transcriptional co-expression analysis, we discovered existence of a preferential interaction network among HK1 and three HPTs (HPT2, 7 and 9) (Héricourt et al., 2013; Bertheau et al., 2013) and among these HPTs and five B-type RRs (RR12, 13, 14, 16 and 19) (Bertheau et al., 2012).

Among the 11 poplar B-type RRs identified by an *in silico* analysis (Ramírez-Carvajal et al., 2008; Singh and Kumar, 2012), we have succeeded to isolate and study eight of them from *Populus Dorskamp* genotype (Bertheau et al., 2012). One of the three missing RRs, the poplar RR18 presents high sequence similarities with ARR18 considered as an actor in the osmosensing signaling pathway in *Arabidopsis* (Veerabagu et al., 2014). The authors concluded that ARR18 could be a major transcriptional factor in seed germination under osmotic stress via interactions with AHP2 (Veerabagu et al., 2012) downstream of AHK1. To complete our identification study of B-type RRs as downstream partners of HK1, a possible sensor of the water status in poplar, we isolated this RR18 in stressed leaves and tested its possible involvement in the induction of the output transcriptional responses of the same pathway by several independent and complementary approaches. First, interaction studies with the three preferential HPT partners of HK1 were carried out using a combination of yeast two-hybrid (Y2H) and Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) assays to determine if inter-molecular contacts are possible between these proteins. Second, to identify the potential participation of last signaling elements, RR18 and RR13 previously highlighted, in the activation -at least in part- of target genes and to establish if they operate in their own specific spatio-temporal way, such a study of these RRs expressions was conducted by real-time PCR in poplar cuttings under the impact of osmotic stress.

2. Materials and methods

2.1. Plant growth conditions and treatment

The clone *Populus euramericana* [*Populus deltoides* (Bartr.) Marsh x *Populus nigra* L.] Dorskamp genotype was selected to carry out this study. On a first phase, the growth of rooted cuttings was undertaken under controlled hydroponic conditions (Caruso et al., 2002). On a second phase, an osmotic stress consisting in the

addition of PEG₆₀₀₀ (100 g L⁻¹) to the growth medium solution to obtain an osmotic potential of 146 mosmol kg⁻¹ of water (osmometer, Roebing 13 DR, Messtechnik, Berlin, Germany) was submitted to cuttings during a long time-course (5, 10, 20, 40, 60, 120, 180, 360 min).

2.2. Stomatal conductance measurement

Three cuttings were used to perform the monitoring of stomatal conductance (g) from both faces of two mature leaves with a steady-state diffusion porometer (Leaf Porometer, Model SC-1; Decagon Devices Pullman, WA). Results were calculated as $g_{\text{abaxial}} + g_{\text{adaxial}}$. Two biological experiments were conducted.

2.3. Plant sample harvesting procedure

Poplar organs, roots, stems and leaves (petioles and blades), were excised and pooled from two independent plants at each time stressed point. Samples were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until RNA extractions, except for roots which were first gently washed in distilled water.

2.4. Isolation of RR18 CDS of *Populus Dorskamp* genotype

Specific pair of RR18 primers (forward primer: ATGGCTGTA-GACGACCAAGGGG; reverse primer: TTA-GAGCACGAAAACCTTGAATGGTG) was designed from sequences of the reference gene of *Populus trichocarpa*, PtRR18, recovered in Phytozome v9.1 (Potri.006G188000.1). RNAs derived from leaves of poplar cuttings stressed during 6 h by PEG₆₀₀₀ at 100 g L⁻¹ were extracted with the NucleoSpin[®] RNA Plant Mini kit (Macherey–Nagel, Düren, Germany) and reverse transcribed (from 1 µg of RNA) using M-MuLV Reverse Transcriptase RNase H- (Finnzyme, Espoo, Finland) according to manufacturer's protocol. Preparations of cDNAs (2 µL) were used as template to amplify RR18 gene. The following procedure was achieved as described in Bertheau et al. (2012).

Sequences alignments were generated using Muscle (Edgar, 2004) with the full-length amino acid sequences of B-type RRs from *A. thaliana* and *Populus* (Table S1) and were represented by an unrooted tree constructed with the neighbor-joining (NJ) approach (Saitou and Nei, 1987) in the software MEGA 5 (Tamura et al., 2011).

2.5. Expression analysis of the RR13 and RR18 genes

After extractions of total RNAs, an additional treatment of samples with 1 Unit of DNase I RNase-free (Thermo-Scientific, Bremen, Germany) at 37 °C for 30 min was carried out. The reverse transcription was realized from 2 µg of total RNAs. The genes RR18 (EMBL HG518156, forward primer: TTGGATCCAAAATGAGGTC-TAAC, reverse primer: TGAAAAGAACGCATATGAAGTTTG, amplicon size: 133 bp); and RR13 (EMBL D7GN44_POPCA, forward primer: TTAGTTTTGACTCTTTTATGGA, reverse primer: GAACTGATCT-GAAACACCACCAGAAC, amplicon size: 139 bp); YLS8 (EMBL EF146046, forward primer: GGGTGCCCTGGTTAATCAAATCTC, reverse primer: CATGGAAGCTGTTATCCACCAACC, amplicon size 65 bp) were amplified by real-time PCR. Assays were performed in a final volume of 15 µL, which contained 0.5 µM of forward and reverse primers, 160 ng of cDNA template and 7.5 µL de SsoAdvanced[™] SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) using the CFX96 real-time PCR detection system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). All PCR reactions were conducted using these parameters: 95 °C for 2 min, 40 cycles at 95 °C for 5 s and 60 °C for 20 s, followed by a final analysis of product melting temperature to confirm the PCR specific product which consisted of an alternating incubation

between 65 °C to 95 °C with increasing set point temperature 0.5 °C per second. PCR products were sequenced to check that these DNA amplifications were specific to RR13 and RR18. Each biological sample was analyzed in triplicate. The relative expression of each B-type RR was normalized to YLS8 as a reference gene (Czechowski et al., 2005) and to either control roots (time 0) of RR13 or control organs (time 0) of RR18 as a control sample. Two independent experiments were performed with consistent results. The data from one triplicate analysis are presented.

2.6. Proteins interaction studies

2.6.1. Yeast two-hybrid experiments

The RR18 fused to GAL4 activation domain plasmid (AD-RR18) was constructed using pGEMT-RR18 clone (*Xma*I-*Bgl*III fragment) and the pGADT7 (Clontech, Mountain View, CA, USA) as destination vector. The BD-HPt (HPT2, 7 and 9 fused to LexA DNA-binding domain) clones were constructed previously as described in Bertheau et al. (2012). The transformations of yeast strain L40Δ were performed using the lithium acetate method from Gietz et al. (1995). Cell yeast suspensions (10 µL) of a dilution series of OD₆₀₀ from 0.2 to 0.002 were dropped onto selective medium (-LW) and interaction selective medium (-LWH) supplemented with 60 mM or 20 mM of 3AT for HPT2 or HPT7 and HPT9 respectively, and incubated for 4 days at 30 °C. X-gal assays (Bertheau et al., 2012) were directly performed on grown drops resulted from the first growth assay. The β-galactosidase activity reflecting the HPT/RR18 interactions was then measured as previously described in Bertheau et al. (2012) using three independent yeast clones, and values were reinstated with those obtained for the other HPT/B-type RR interactions (Bertheau et al., 2012).

2.6.2. Bimolecular fluorescence complementation assays

The YFP^C-RR18 clone was obtained by recombination of the RR18 CDS (*Spe*I fragment) and the destination vector pSPYCE(MR) (Waadt et al., 2008). The different YFP^N-HPt clones were identical to those used in Bertheau et al. (2012). The desired combination of BiFC vectors was used to transiently transform *Catharanthus roseus* cells by particle bombardment according to Guirimand et al. (2009). BiFC analysis was done 15 h post transformation as described previously (Guirimand et al., 2009, 2010).

2.7. Statistical analysis

Data were analyzed with the statistical software SPSS 11.0 (SPSS, Chicago, IL, USA). To test the normality of the distribution, a Shapiro–Wilk test was performed for each variable. Values correspond to means ± standard errors and were compared either by t-test or ANOVA followed by Scheffé test at the $P \leq 0.05$ level.

3. Results

3.1. The isolation of RR18 was achieved from osmotic stressed poplar leaves

Although most of the B-type PtRRs were identified in *P. trichocarpa* (Ramírez-Carvajal et al., 2008) in terms of sequences, the cDNA isolation of the RR18 from *Populus Dorskamp* genotype remained unsuccessful in a previous study (Bertheau et al., 2012). According to the sequence similarity between their conserved receiver domain DDK, PtRR18 and other B-type RR members from *P. trichocarpa*, PtRR19 and PtRR22, and those from *Arabidopsis*, ARR10, ARR12 and ARR18, can be clustered together into one subgroup (Ramírez-Carvajal et al., 2008). Pairwise protein sequence comparison revealed that PtRR19 and PtRR22 shared a good

sequence identity with ARR12 (42.56%) and ARR10 (42.42%) respectively, linking up PtRR18 to ARR18 as plausible orthologs. In *Arabidopsis*, it has been reported an increase of *ARR18* transcripts in leaves when the plants were submitted to an osmotic stress applied for six hours by a PEG₆₀₀₀ treatment (Veerabagu et al., 2014). Based on these results, another attempt to isolate the *RR18* in the Dorskamp genotype was conducted in experimental conditions which were reproduced according to this previous study. By adding PEG₆₀₀₀ at 100 g L⁻¹ directly in the hydroponic solution, the osmotic stress was applied on independent rooted cuttings and the monitoring of stomatal conductance used as an indicator of PEG stress effect was performed punctually at each time point of the time-course. From the beginning of the experiment, the stress conditions have induced a decrease of stomatal conductance to become significantly different from the control from and after 20 min of PEG application (Fig. 1). At the end of the time-course (360 min), the value of stomatal conductance reached by PEG₆₀₀₀-treated plants (50 mmol m⁻² s⁻¹) was approximately 12 times smaller than the one measured at the beginning of the experiment (about 600 mmol m⁻² s⁻¹) (Fig. 1). Thus, the decrease of stomatal conductance during the experiment assures us that the plant material perceives osmotic stress well under these artificial conditions where PEG is used to mimic the effect of soil drying.

The isolation of poplar *RR18* (Dorskamp genotype; EMBL: HG518156) was thus conducted using total RNAs from six hours stressed leaves. An alignment of the deduced amino acid sequences of *RR18* with the other B-type RRs in *Populus* Dorskamp genotype was achieved to connect this new member to this family (Fig. 2A). As predicted, two areas of high conservation corresponding to the characteristic and functional domains of the B-type RRs, i.e. the receiver domain called DDK and the DNA-binding domain known as GARP domain, were clearly delineated in the totality of poplar B-type RR sequences. These domains are connected together by a sequence predicted to have an “hinge” function. Furthermore at the carboxy-terminal, a polymorphic section which is assumed to play a role in transactivation process is found. Then, a comparison of the full-length *RR18* protein sequence to the B-type RR family members in *Populus* Dorskamp genotype (Bertheau et al., 2012) and in *Arabidopsis* was generated giving rise to a sequence similarity unrooted tree (Fig. 2B, Table S1). As expected, the global scheme highlighted in previous studies (Ramírez-Carvajal et al., 2008; Bertheau et al.,

2012) remained identical: RRs segregate predominantly into species-specific pairs related to potential chromosomal duplication events, poplar RR members gather into the clade of *Arabidopsis* subgroup BI as defined by Mason et al. (2004), and the poplar *RR18* and *RR19* being revealed close enough to constitute a sister-pair (80.93% of identity). Here, only a zoom in the receiver domain sequence alignment is presented (Fig. 2C), where the conserved phosphorylation site is properly indicated (D69, according to *RR13* sequence), to recall its primary function which is the reception of phosphate. Generally, patterns of the receiver domain sequences were highly conserved between the different species taken altogether, especially in the RR group sharing high sequence similarity. For example, the hydrophobic sequence motif ‘DIVISD’ located in the position aa 91 to 96 of the first group represented by *ARR1* is slightly modified in all other RR clades, by ‘DLVISD’ or ‘DVVLS D’ for the *RR18* or *RR15* groups respectively.

3.2. *RR18* interacts with the preferential downstream HPt partners of *HK1*

To test the possibility of *RR18* to act downstream of *HK1* and *Hpt2*, 7 and 9, we conducted HPt/*RR18* interactions studies using the Y2H system. As shown in Fig. 3, *RR18* was able to interact with these three HPTs in yeast. The activation of reporter genes (*HIS3* and *LacZ*) was still observed even after 1000-fold dilution, reflecting significant intensity of interaction (Fig. 3A and B). The estimation of β-galactosidase activities (corresponding to the *LacZ* activation) for HPt/*RR18* interactions was conducted and included with those of different HPt/*RR-B* interactions previously obtained (Bertheau et al., 2012). On the whole, it appears that *RR18* is part of the RRs group with the lowest activation levels of β-galactosidase, suggesting weaker interactions with these three HPTs (Fig. S1).

To substantiate the data obtained in an heterologous system, we performed in planta protein–protein interaction studies based on BiFC experiments in transiently transformed *C. roseus* cells (Guirimand et al., 2009, 2010), using as a devoted experimental system (Bertheau et al., 2012, 2013). For that purpose, the C-terminal or the N-terminal of the Yellow Fluorescent Protein (YFP) fragment (Y^C or Y^N) were fused to the N-terminus of HPTs (HPt2, 7 or 9) or *RR18* coding sequences to generate Y^N-HPt or Y^C-*RR18* fusion proteins. The combined expression of BiFC constructs

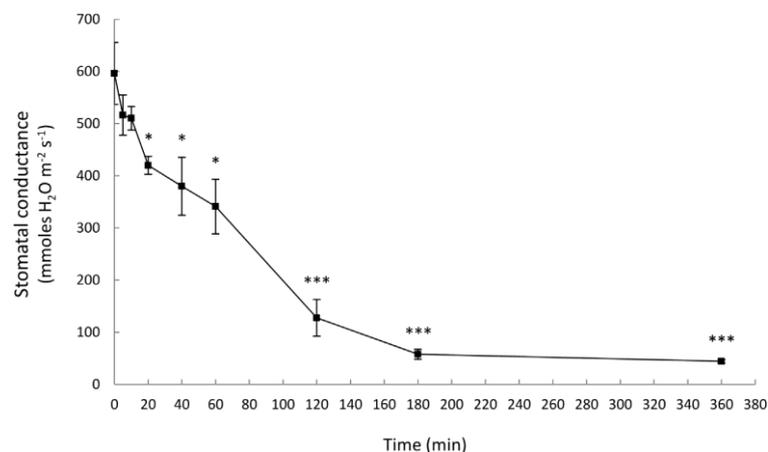


Fig. 1. Physiological effects of PEG₆₀₀₀ treatment on rooted cuttings of *Populus* (Dorskamp genotype) under hydroponic conditions. Time-course of stomatal conductance of *Populus* Dorskamp genotype was realized on cuttings submitted to osmotic stress by PEG₆₀₀₀ treatment (100 g L⁻¹). Means ± standard errors obtained at each time of measurement (n = 6) were compared to the value obtained at control condition (time 0) by t-test; significant differences for PEG treatment are indicated by asterisk (*P < 0.05; ***P < 0.001).

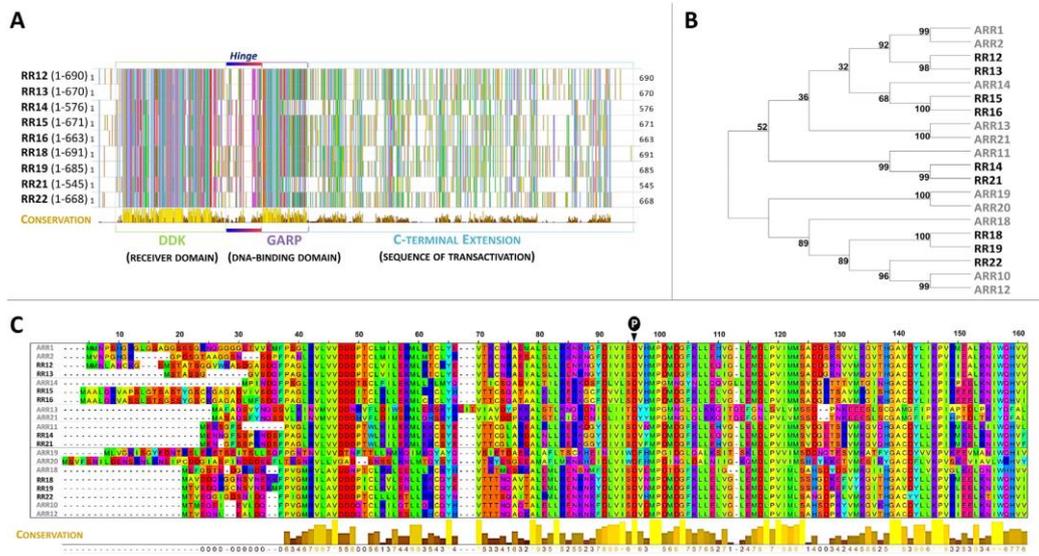


Fig. 2. The poplar RR18 potential homolog of the *Arabidopsis* B-type response regulator ARR18 known transcription factor involved in osmotic stress responses. A. DDK and GARP domains are highly conserved in B-type RR sequences of poplar Dorskamp genotype. Alignment of full protein sequences of all expressed poplar B-type RRs was achieved with clustalW (Thompson et al., 1994) by applying a Blosum62 substitution matrix (Henikoff and Henikoff, 1992). This view was generated by Jalview version 2.8 (Waterhouse et al., 2009) using a coloring scheme (Clustalx) to visualize variations of amino acids. The conservation of residues is shown by vertical bars. B. Amino acid sequence similarity of B-type response regulators between *Arabidopsis* and poplar (Dorskamp genotype). The alignment of multiple full-length protein sequences from *A. thaliana* (grey) and *Populus* (black) were performed using Muscle (Edgar, 2004) as implemented in MEGA 5 (Tamura et al., 2011). A neighbor-joining (NJ) approach (Saitou and Nei, 1987) was applied to construct an unrooted tree from the pairwise distances that were estimated using p-distance computed with MEGA. The robustness of the tree was assessed by 1000 bootstrap replicates and values obtained are indicated at each nodes of the tree. C. Amino acid sequence alignment of the receiver domain (DDK) of the isolated B-type response regulators from *Arabidopsis* and *Populus* (Dorskamp genotype). This alignment of sequences from *Arabidopsis* (grey) and *Populus* (black) was carried out using clustalW (Thompson et al., 1994) by applying a Blosum62 substitution matrix (Henikoff and Henikoff, 1992). This visualization was generated by Jalview version 2.8 (Waterhouse et al., 2009) using a coloring scheme (Clustalx) to visualize variations of amino acids. The conservation of residues is shown by vertical bars accompanied with a score (from 0 to *). The position of the phosphor-accepting aspartate residue is indicated.

displayed an interaction of RR18 with HPt2, 7 and 9 within cells (Fig. 4A, E, I). As expected, this protein interaction took part in the nuclear compartment as the BiFC signal fully merged with the fluorescence emitted by the Cyan Fluorescent Protein (CFP) nucleus

marker (Fig. 4B–C, F–G, J–K). Because interaction experiments using the reciprocal combination of fusion proteins in which the split-YFP nature was exchanged (Y^N -RR against Y^C -HPt) led to similar results in Bertheau et al. (2012), these constructs were not tested here. No

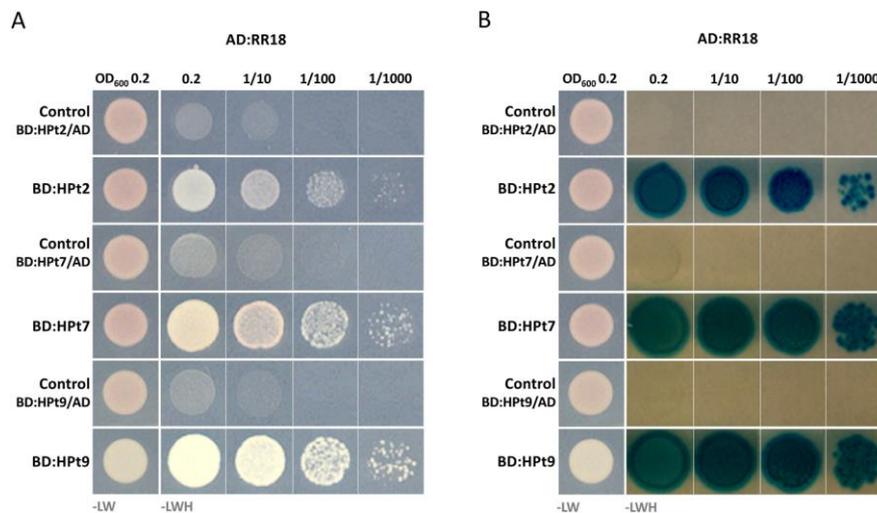


Fig. 3. RR18 interacts with the subset of HPt partners of HK1 osmosensor in Y2H assays. Yeast cells co-expressing RR18 protein fused to the GAL4 activation domain (AD:RR18) and the indicated HPt (HPt2, 7 or 9) fused to the LexA DNA-binding domain (BD:HPt) were used for Y2H analysis. Drops of yeast cell suspensions in a dilution series (OD_{600} from 0.2 to 0.0002) were incubated on vector selective (-LW) and interaction selective (-LWH supplemented by 3AT) media during 4 days. A. Growth test onto interaction selective medium (-LWH). B. X-gal test onto interaction selective medium (-LWH).

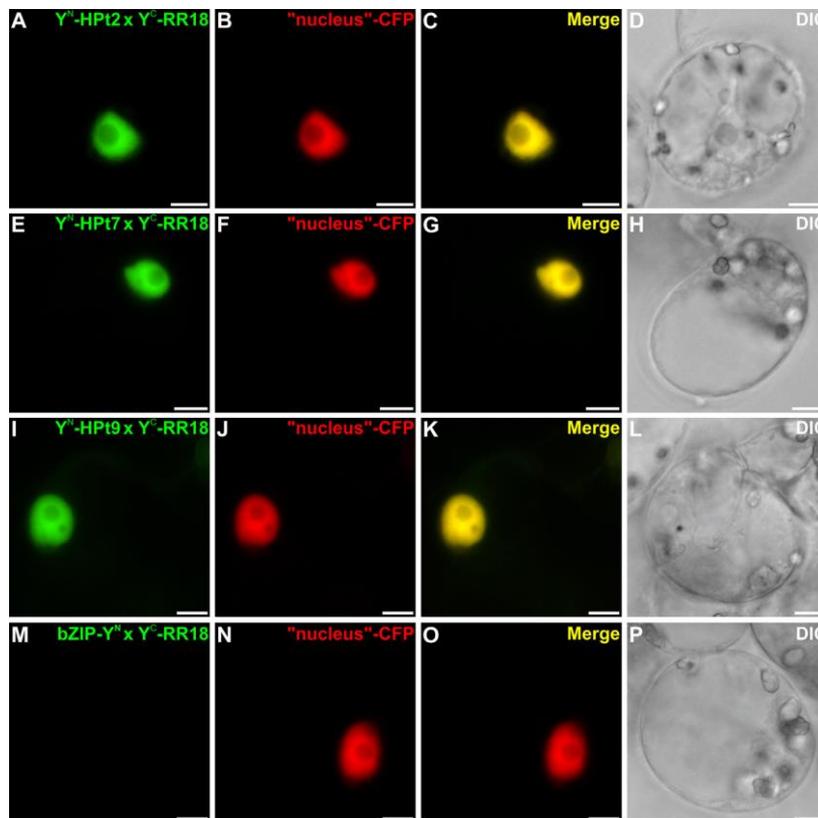


Fig. 4. BiFC experiments showing that RR18 is able to interact with the subset of HPT proteins partner of HK1 osmosensor in planta. Epifluorescence images of *C. roseus* cells expressing both the YFP^C-RR18 fusion protein and respective YFP^N-HPT (HPT2, 7 and 9) or Y^N-bZIP fusion proteins. The YFP (left panel; A, E, I, M) and CFP nuclear marker (middle panel; B, F, J, N) fluorescence images, together with the overlays (middle panel; C, G, K, O) are shown. Differential interference contrast (DIC) microscopy is used to observe cells morphology (right panel; D, H, L, P). Scale bar = 10 μm.

YFP reconstitution between bZIP-Y^N and Y^C-RR18 (Fig. 4M) was observed validating the interaction specificity between HPT tested and RR18. To note, those controls involving an interaction test between HPT and bZIP were already tested and validated (Bertheau et al., 2012).

3.3. RR18 and RR13 appear as osmotic stress responsive genes

To confirm the pertinence of the highlighted HPT/RR18 protein interactions, the simultaneous transcripts expression of both partners in plant organs is mandatory, as previously realized using relative RT-PCR (Bertheau et al., 2012). However, no amplification of RR18 transcripts was detected in experimental conditions identical to those used for HPTs or other B-type RRs (i.e. control and stressed [10 min of PEG₆₀₀₀ application] conditions), probably related to its low expression level under these conditions. According to this hypothesis, we compared by a real-time PCR approach the RR18 gene expression level to the one of RR13, identified to be a RR highly expressed in different organs under unstressed conditions (Bertheau et al., 2012). As expected, we confirmed that RR18 was weakly expressed in roots, stems and leaves of poplar cuttings compared with the level expression of RR13 as shown in Fig. 5, corroborating the results obtained by Ramírez-Carvajal et al. (2008). In an interesting manner, contrary to RR13 which presented higher levels of transcripts in the aerial parts in comparison with roots, the relative abundance of RR18 was identical in different

organs under unstressed conditions (Fig. 5). Subsequently, the regulation of RR18 expression in cuttings submitted to osmotic stress during a long time kinetic was studied in a second approach (Fig. 6A). After six hours of treatment with PEG, the transcripts level detected in roots remained similar to what was measured without osmotic stress. Punctually, increases of expression level could be only observed in stems and petioles at 120 and 5 min respectively. In opposition to what was observed in roots, a differential RR18 expression was exhibited in leaves blades. It consisted in an increase of transcripts abundance from 40 min to end-up with levels 3 or 5-fold higher than the ones observed in the control by the end of the time-course. By way of comparison, the gene expression regulation of RR13 was integrated to this study (Fig. 6B) and it appears that in roots, the expression of RR13 was significantly enhanced by osmotic stress after only 5 min (12-fold) of treatment with a maximum reached at 10 min (20-fold). After this time point, RR13 displayed a decrease of transcripts, without dropping down completely since the level was maintained greater (5-fold) than that of control roots (time 0). The same transcription profile in leaves blades was observed however, from 10 min. It was noted that the increase of transcripts became significant with an 8-fold level change after 20 min of treatment reaching there the highest transcripts abundance measured. As previously, the expression of RR13 decreased after 20 min, but the transcripts amount remaining was still higher than in the control. Moreover, in stems, we noticed a late increase of transcripts from one hour which was maintained until

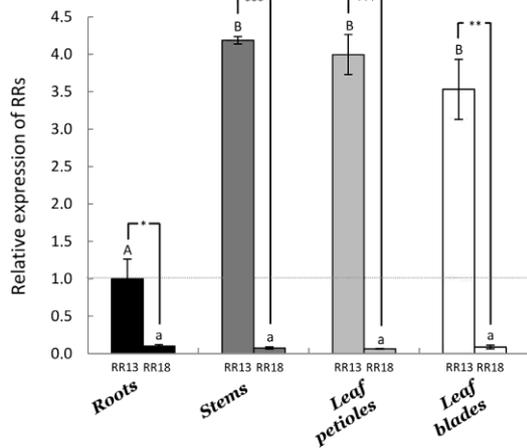


Fig. 5. Transcripts abundance of *RR18* compared to *RR13* in different organs of poplar cuttings. RNAs were extracted from roots, stems and leaves (subdivided up in petioles and blades) under control condition and were used for real-time RT-PCR analysis. Relative transcript levels of *RR18* and *RR13* were normalized to the abundance of the *YSL8* transcript and to the root expression level of *RR13* at time 0. Means \pm standard errors of three independent replicates ($n = 3$) are presented. The mean values of *RR18* relative expression within each organ were compared to transcript abundance of *RR13* in same conditions by t-test, and asterisks indicate significant differences: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. The mean values of *RR* transcripts abundance within each organ were compared by considering separately the *RR18* and the *RR13* by ANOVA followed by Scheffe test, and letters indicate significant differences at $P < 0.05$ level.

six hours of stress application. In leaves petioles, the transcription profile displayed a rapid accumulation of *RR13* at 10 min, followed by a return to basal level relatively comparable to what was observed in the control.

4. Discussion

In plants, the histidine/aspartate multistep phosphorelay

constitutes signaling pathways devoted to signal perception and transduction to establish specific responses, depending upon a network of interacting partners. On the basis of evidence, these actors can be classified into three families of signal molecules, HK, HPT and RR, which may comprise several isoforms in different plant species (Hwang et al., 2002; Pareek et al., 2006; Le et al., 2011; Singh and Kumar, 2012). Contrary to bacterial systems, the functional redundancy found within one protein family was suggested as a noteworthy characteristic of these systems. From the observed redundancy, the current opinion supports two hypothetical kinds of interacting networks or models. On one hand, it is an 'aspecific' system based mostly on redundant proteins with high sequence similarities where many cross-talks are possible. In such a scheme, each protein has the potential to behave as a signaling hub (Dortay et al., 2006; Horák et al., 2011), as illustrated by cytokinin receptors or by other HKs implicated in several functions in planta which are able to interact with the same HPTs with no preferential way. On the other hand, it is a system relying on an existing specificity to achieve subtly an appropriate response. In such a model, different stages to ensure that specificity could be required: i) at the signal perception level via the HK recruitment since the isoforms are specialized in a specific signal detection defined by the sensor domain, for instance the CHASE domain (Romanov et al., 2006), ii) at the specificity level of interaction since the effective interaction is to be weighted by both differences in affinities between potential interactors (Pekárová et al., 2011) and spatio-temporal regulation of gene transcripts and protein abundances, and iii) at the regulation of expression level of response genes via the presence (or absence) of partners in the transcription factors set leading to their activation or repression.

The present study is inclined to favor the second hypothetical model. It begins with the isolation of an additional RR, the *RR18*, which led to a total of nine RR-B isoforms expressed in poplar Dorskamp genotype. The required protein architecture to link this protein to the B-type RRs family was found as shown for the other members, i.e joint presence of two functional domains, the receiver domain DDK and the DNA-binding domain GARP with a polymorphic transactivation sequence at carboxy-terminal end of the

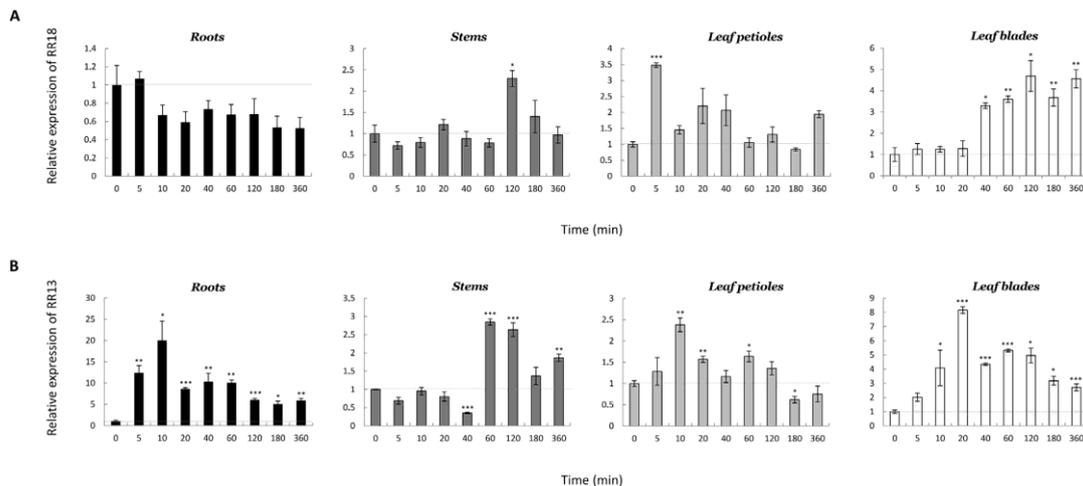


Fig. 6. Time-course of *RR18* (A) and *RR13* (B) expressions in different organs subjected to osmotic stress. RNAs were extracted from roots, stems and leaves (petioles and blades) under control and stressed conditions (PEG₆₀₀₀ 100) at each time point and were used for real-time RT-PCR analysis. Relative transcript levels of B-type RR were normalized to the abundance of the *YSL8* transcript and control organs (time 0) of *RR13* or *RR18*. Means \pm standard errors of three independent replicates ($n = 3$) are presented. The mean values of *RR* transcripts abundance at different time points were compared to *RR* relative expression at control condition (time 0) for each organ respectively by t-test and asterisks indicate significant differences: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

protein.

Among the B-type RRs highlighted previously (Bertheau et al., 2012), the RR13 has demonstrated to be a good candidate for further studies since interactions with three HPT were established in vivo and in planta, and expression of its transcripts merged perfectly with those of its HPT partners in our conditions (control and stress [10 min of PEG₆₀₀₀ application] conditions) (Bertheau et al., 2012). Similarly, here, the interactions of the newly isolated RR18 with the three HPTs were validated, consistent with the ability of its homologous protein in *Arabidopsis*, ARR18, to establish intermolecular contacts notably with AHP1 (Veerabagu et al., 2012), and protein sharing high sequence similarities with poplar HPT2, 7 and 9 (Héricourt et al., 2013). The conditions of its isolation, the interactions observed with downstream interacting HPT proteins of HK1 and the highlighted role of its homologous protein in *Arabidopsis* (Veerabagu et al., 2014) prompted us to study the regulation of RR18 expression in poplar cuttings submitted to osmotic stress during a six hours time-course. Although the levels of RR18 transcripts in different organs in control condition are relatively identical, they were increased in the leaves after 40 min of osmotic stress and so it went on until the end of the kinetic. This temporal regulation of this gene was also demonstrated for ARR18 from the same plant material (*Arabidopsis* leaves) under the same stress conditions (after six hours of PEG₆₀₀₀ application in hydroponic culture), positioning it as an atypical B-type RR in *Arabidopsis* (Veerabagu et al., 2014). To compare with *Arabidopsis*, we extended the RR18 expression study to other plant organs subjected to osmotic stress over a time-course and showed that RR18 presents a specific spatio-temporal regulation. Concerning the RR13, we confirmed in this study by real-time RT-PCR our previous results that suggested a positive transcriptional regulation of this RR in roots and leaf petioles after 10 min of osmotic stress (Bertheau et al., 2012). Besides, it appears clearly that transcripts of this gene were highly accumulated in both roots and leaves from the first minutes of stress application. This increase is particularly striking in the roots since transcript levels were the lowest in control condition. On the other hand, levels of transcript remained relatively high compared to control condition during the kinetic in roots and leaves, in agreement with rises, although moderate, of ARR2 transcripts, reached at six hours of osmotic stress in leaves (Veerabagu et al., 2014). This comparison is relevant since this latter RR shares the highest sequence identity with RR13 (52.94%). Given that ARR1, constituting a sister-pair with ARR2 protein, did not present the same specific transcriptional regulation, it would be interesting to complete this regulation study in *Arabidopsis* by using plant material stressed at time points of kinetic comparable to those of our study. Thus, the transcriptional regulation of RR13 and RR18 pointed out that these RRs behave as osmotic stress responsive genes, suggesting their potential involvement in the induction of response downstream of HK1. Yet, these two B-type RRs seem to take place differently in this pathway. In fact, it was noted that RR13 was already expressed indifferentially in all tested organs of poplar cuttings and when osmotic stress happens the transcripts accumulate quickly, but mainly in roots, the organ responsible for this stress perception. In contrast, RR18 could act later in this pathway; as it is very slightly expressed in the different organs under control condition (compared to RR13), and it undergoes a later increase of its transcripts far from the perception area.

5. Conclusion

The main object of our study was to isolate RR18, a particular B-type RR in poplar based on the involvement of its *Arabidopsis* homolog ARR18 in drought response. Although undetectable in a previous screening, with a new attempt, it turned out that this RR

could be isolated from osmotic stressed cuttings, and further be characterized in interaction tests that resulted positive with the preferential HPT partners of HK1. The late regulation of RR18 expression in leaves during the osmotic stress supports the hypothesis of a possible involvement of this RR in the osmotic stress signaling pathway in poplar. Besides, the early regulation by the osmotic stress of RR13 expression in both roots and leaves was unexpected but demonstrated here. To date, in poplar, the involvement of RR13 in cytokinin signaling pathway is considered clearly attested and now undoubted (Ramírez-Carvajal et al., 2008), but it should not be taken as exclusive. Indeed, a possible involvement of this RR in osmotic signaling pathway was never hitherto discussed and these new findings may lead to a new research direction concerning the other B-type RRs as they could also be involved in this pathway too. To begin with, one should for instance reconsider on one hand RR19 and RR22 because they belong to the RR18 group, and on the other RR12 pairwise of RR13 as they could be key actors in the potential cross-talk between both, the cytokinin and osmotic stress pathways. In this sense, an RNAi strategy targeting B-type RR genes could be suitable to elucidate their involvement in the osmotic signaling pathway.

Contributions

LB and SC conceived and designed the research work. LB, ID, EF, FC, GG, VC performed experiments. LB, SC and DA wrote the manuscript. All of the authors revised, discussed and commented on the manuscript.

Acknowledgments

This research was supported by grants from Conseil Régional du Centre n°2008-0033673 (SiSeP) and n° 2013-00085478 (SiSCyLi). LB and ID were supported by PhD grants from the Conseil Régional du Centre (France). We are grateful to A. Guichard and M. Larcher (EA 1207, University of Orléans, France) for their technical assistances. We also thank Pr. R. Islam, teacher in the Biology department at George Mason University (Fairfax, USA) for English reviewing.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.06.006>.

References

- Bauer, J., Reiss, K., Veerabagu, M., Heunemann, M., Harter, K., Stehle, T., 2013. Structure–function analysis of *Arabidopsis thaliana* histidine kinase AHK5 bound to its cognate phosphotransfer protein AHP1. *Mol. Plant* 6, 959–970.
- Bertheau, L., Chefdor, F., Guirmand, G., Courdavault, V., Depierreux, C., Morabito, D., Brignolas, F., Héricourt, F., Carpin, S., 2012. Identification of five B-type response regulators as members of a multistep phosphorelay system interacting with histidine-containing phosphotransfer partners of *Populus* osmosensor. *BMC Plant Biol.* 12, 241.
- Bertheau, L., Miranda, M., Foureau, E., Rojas Hoyos, L.F., Chefdor, F., Héricourt, F., Depierreux, C., Morabito, D., Papon, N., Clastre, M., Scippa, G.S., Brignolas, F., Courdavault, V., Carpin, S., 2013. In planta validation of HK1 homodimerization and recruitment of preferential HPT downstream partners involved in poplar multistep phosphorelay systems. *Plant Biosyst.* 147, 991–995.
- Binder, B.M., 2008. The ethylene receptors: complex perception for a simple gas. *Plant Sci.* 175, 8–17.
- Caruso, A., Morabito, D., Delmotte, F., Kahlem, G., Carpin, S., 2002. Dehydrin induction during drought and osmotic stress in *Populus*. *Plant Physiol. Biochem.* 40, 1033–1042.
- Chefdor, F., Bénédicti, H., Depierreux, C., Delmotte, F., Morabito, D., Carpin, S., 2006. Osmotic stress sensing in *Populus*: components identification of a phosphorelay system. *FEBS Lett.* 580, 77–81.
- Czechowski, T., Stitt, M., Altmann, T., Udvardi, M.K., Scheible, W.R., 2005. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript

- normalization in *Arabidopsis*. Plant Physiol. 139, 5–17.
- Desikan, R., Horák, J., Chaban, C., Mira-Rodado, V., Witthöft, J., Elgass, K., Grefen, C., Cheung, M.-K., Meixner, A.J., Hooley, R., Neill, S.J., Hancock, J.T., Harter, K., 2008. The Histidine kinase AHK5 integrates endogenous and environmental signals in *Arabidopsis* guard cells. PLoS One 3, e2491.
- Dortay, H., Mehnert, N., Bürkle, L., Schmülling, T., Heyl, A., 2006. Analysis of protein interactions within the cytokinin-signaling pathway of *Arabidopsis thaliana*. FEBS J. 273, 4631–4644.
- Dortay, H., Gruhn, N., Pfeifer, A., Schwerdtner, M., Schmülling, T., Heyl, A., 2008. Toward an interaction map of the two-component signaling pathway of *Arabidopsis thaliana*. J. Proteome Res. 7, 3649–3660.
- Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic Acids Res. 32, 1792–1797.
- Gietz, R.D., Schiestl, R.H., Willems, A.R., Woods, R.A., 1995. Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. Yeast 11, 355–360.
- Guirimand, G., Burlat, V., Oudin, A., Lanoue, A., St-Pierre, B., Courdavault, V., 2009. Optimization of the transient transformation of *Catharanthus roseus* cells by particle bombardment and its application to the subcellular localization of hydroxymethylbutenyl 4-diphosphate synthase and geraniol 10-hydroxylase. Plant Cell. Rep. 28, 1215–1234.
- Guirimand, G., Courdavault, V., Lanoue, A., Mahroug, S., Guihur, A., Blanc, N., 2010. Stricostidine activation in Apocynaceae: towards a “nuclear time bomb”? BMC Plant Biol. 10, 182.
- Henikoff, S., Henikoff, J.G., 1992. Amino acid substitution matrices from protein blocks. Proc. Natl. Acad. Sci. 89, 10915–10919.
- Héricourt, F., Chedfor, E., Bertheau, L., Tanigawa, M., Maeda, T., Guirimand, G., Courdavault, V., Larcher, M., Depierreux, C., Bénédicti, H., Morabito, D., Brignolas, F., Carpin, S., 2013. Characterization of histidine-aspartate kinase HK1 and identification of histidine phosphotransfer proteins as potential partners in a *Populus* multistep phosphorelay. Physiol. Plant 149, 188–199.
- Heyl, A., Wulfetange, K., Pils, B., Nielsen, N., Romanov, G.A., Schmülling, T., 2007. Evolutionary proteomics identifies amino acids essential for ligand-binding of the cytokinin receptor CHASE domain. BMC Evol. Biol. 7, 62.
- Horák, J., Grefen, C., Berendzen, K.W., Hahn, A., Stierhof, Y.D., Stadelhofer, B., Stahl, M., Konz, C., Harter, K., 2008. The *Arabidopsis thaliana* response regulator ARR22 is a putative AHP phospho-histidine phosphatase expressed in the chalaza of developing seeds. BMC Plant Biol. 8, 77.
- Horák, J., Janda, L., Pekárová, B., Hejático, J., 2011. Molecular mechanisms of signalling specificity via phosphorelay pathways in *Arabidopsis*. Curr. Protein Pept. Sci. 12, 126–136.
- Hwang, I., Sheen, J., 2001. Two-component circuitry in *Arabidopsis* cytokinin signal transduction. Nature 413, 383–389.
- Hwang, I., Chen, H.C., Sheen, J., 2002. Two-component signal transduction pathways in *Arabidopsis*. Plant Physiol. 129, 500–515.
- Imamura, A., Hanaki, N., Nakamura, A., Suzuki, T., Taniguchi, M., Kiba, T., Ueguchi, C., Sugiyama, T., Mizuno, T., 1999. Compilation and characterization of *Arabidopsis thaliana* response regulators implicated in His-Asp phosphorelay signal transduction. Plant Cell. Physiol. 40, 733–742.
- Kumar, M.N., Jane, W.N., Verslues, P.E., 2013. Role of the putative osmosensor *Arabidopsis* histidine kinase 1 in dehydration avoidance and low-water-potential response. Plant Physiol. 161, 942–953.
- Le, D.T., Nishiyama, R., Watanabe, Y., Mochida, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., Tran, L.-S.P., 2011. Genome-wide expression profiling of soybean two-component system genes in soybean root and shoot tissues under dehydration stress. DNA Res. 18, 17–29.
- Lohrmann, J., Sweere, U., Zabaleta, E., Bäurle, I., Keitel, C., Kozma-Bognar, L., Brennicke, A., Schäfer, E., Kudla, J., Harter, K., 2001. The response regulator ARR2: a pollen-specific transcription factor involved in the expression of nuclear genes for components of mitochondrial complex I in *Arabidopsis*. Mol. Genet. Genomics 265, 2–13.
- Mason, M.G., Li, J., Mathews, D.E., Kieber, J.J., Schaller, G.E., 2004. Type-B response regulators display overlapping expression patterns in *Arabidopsis*. Plant Physiol. 135, 927–937.
- Mira-Rodado, V., Veerabagu, M., Witthöft, J., Teply, J., Harter, K., Desikan, R., 2012. Identification of two-component system elements downstream of AHK5 in the stomatal closure response of *Arabidopsis thaliana*. Plant Signal. Behav. 7, 1467–1476.
- Nishiyama, R., Watanabe, Y., Leyva-Gonzalez, M.A., Ha, C.V., Fujita, Y., Tanaka, M., Seki, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., Herrera-Estrella, L., Tran, L.-S.P., 2013. *Arabidopsis* AHP2, AHP3, and AHP5 histidine phosphotransfer proteins function as redundant negative regulators of drought stress response. Proc. Natl. Acad. Sci. 110, 4840–4845.
- Pareek, A., Singh, A., Kumar, M., Kushwaha, H.R., Lynn, A.M., Singla-Pareek, S.L., 2006. Whole-genome analysis of *Oryza sativa* reveals similar architecture of two-component signaling machinery with *Arabidopsis*. Plant Physiol. 142, 380–397.
- Pekárová, B., Klumpler, T., Trísková, O., Horák, J., Jansen, S., Dopitová, R., Borkovcová, P., Papoušková, V., Nejedlá, E., Sklenář, V., Marek, J., Zídek, L., Hejático, J., Janda, L., 2011. Structure and binding specificity of the receiver domain of sensor histidine kinase CKI1 from *Arabidopsis thaliana*. Plant J. 67, 827–839.
- Pham, J., Liu, J., Bennett, M.H., Mansfield, J.W., Desikan, R., 2012. *Arabidopsis* histidine kinase 5 regulates salt sensitivity and resistance against bacterial and fungal infection. New Phytol. 194, 168–180.
- Pils, B., Heyl, A., 2009. Unraveling the evolution of cytokinin signaling. Plant Physiol. 151, 782–791.
- Pischke, M.S., Jones, L.G., Otsuga, D., Fernandez, D.E., Drews, G.N., Sussman, M.R., 2002. An *Arabidopsis* histidine kinase is essential for megagametogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. 99, 15800–15805.
- Ramírez-Carvajal, G.A., Morse, A.M., Davis, J.M., 2008. Transcript profiles of the cytokinin response regulator gene family in *Populus* imply diverse roles in plant development. New Phytol. 177, 77–89.
- Riechmann, J.L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C.Z., Keddie, J., Adam, L., Pineda, O., Ratcliffe, O.J., Samaha, R.R., Creelman, R., Pilgrim, M., Broun, P., Zhang, J.Z., Ghandehari, D., Sherman, B.K., Yu, G.-L., 2000. *Arabidopsis* transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. Science 290, 2105–2110.
- Romanov, G.A., Lomin, S.N., Schmülling, T., 2006. Biochemical characteristics and ligand-binding properties of *Arabidopsis* cytokinin receptor AHK3 compared to CRE1/AHK4 as revealed by a direct binding assay. J. Exp. Bot. 57, 4051–4058.
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 4, 406–425.
- Sakai, H., Honma, T., Aoyama, T., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., Oka, A., 2001. ARR1, a transcription factor for genes immediately responsive to cytokinins. Science 294, 1519–1521.
- Singh, G., Kumar, R., 2012. Genome-wide *in silico* analysis of plant two component signaling system in woody model plant *Populus trichocarpa*. Res. Plant Biol. 2, 13–23.
- Stock, A.M., Robinson, V.L., Coudreau, P.N., 2000. Two-component signal transduction. Annu. Rev. Biochem. 69, 183–215.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol. Biol. Evol. 28, 2731–2739.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 22, 4673–4680.
- Tran, L.-S.P., Urao, T., Qin, F., Maruyama, K., Kakimoto, T., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., 2007. Functional analysis of AHK1/ATHK1 and cytokinin receptor histidine kinases in response to abscisic acid, drought, and salt stress in *Arabidopsis*. Proc. Natl. Acad. Sci. 104, 20623–20628.
- Urao, T., Yakubov, B., Satoh, R., Yamaguchi-Shinozaki, K., Seki, M., Hirayama, T., 1999. A transmembrane hybrid-type histidine kinase in *Arabidopsis* functions as an osmosensor. Plant Cell. 11, 1743–1754.
- Urao, T., Miyata, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., 2000. Possible His to Asp phosphorelay signaling in an *Arabidopsis* two-component system. FEBS Lett. 478, 227–232.
- Veerabagu, M., Elgass, K., Kirchler, T., Huppenberger, P., Harter, K., Chaban, C., Mira-Rodado, V., 2012. The *Arabidopsis* B-type response regulator 18 (ARR18) homomerizes and positively regulates cytokinin responses. Plant J. 72, 721–731.
- Veerabagu, M., Kirchler, T., Elgass, K., Stadelhofer, B., Stahl, M., Harter, K., Mira-Rodado, V., Chaban, C., 2014. The interaction of the *Arabidopsis* response regulator ARR18 with bZIP63 mediates the regulation of proline dehydrogenase expression. Mol. Plant 7, 1560–1577.
- Waadt, R., Schmidt, L.K., Lohse, M., Hashimoto, K., Bock, R., Kudla, J., 2008. Multi-color bimolecular fluorescence complementation reveals simultaneous formation of alternative CBL/CIPK complexes in planta. Plant J. 56, 505–516.
- Waterhouse, A.M., Procter, J.B., Martin, D.M.A., Clamp, M., Barton, G.J., 2009. Jalview version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. Bioinformatics 25, 1189–1191.
- Wohlbach, D.J., Quirino, B.F., Sussman, M.R., 2008. Analysis of the *Arabidopsis* Histidine kinase ATHK1 reveals a connection between vegetative osmotic stress sensing and seed maturation. Plant Cell. 20, 1101–1117.

Inès DJEGHDIR

Identification et caractérisation de facteurs de transcriptions appartenant à la famille des régulateurs de réponse de type B, impliqués dans la réponse à la sécheresse chez le peuplier

Résumé : Les plantes sont de plus en plus confrontées à une diminution de la disponibilité en eau du sol, constituant une contrainte hydrique et osmotique impactant leur survie. La tolérance des plantes face à cette contrainte sera conditionnée par la perception de celle-ci.

Un des mécanismes de signalisation de cette contrainte est appelé MultiStep Phosphorelay (MSP) et est composé de 3 partenaires : un récepteur Histidine-aspartate Kinase (HK), des protéines Histidine Phosphotransfert (HPT) et des Régulateurs de Réponse (RR), dont les facteurs de transcription RR-B.

Chez *Arabidopsis*, un MSP constitué d'AHK1, AHP2 et ARR18 a été identifié dans le cadre de la contrainte osmotique.

Pour le peuplier, HK1a et b, gènes paralogues et homologues à AHK1, ainsi que 10 et 9 gènes codant respectivement des HPT et des RR-B ont été isolés. La fonction d'osmosenseur d'HK1a a été avancée, et une voie de signalisation de la contrainte osmotique chez le peuplier constituée de ce récepteur, 3 HPT et 6 RR-B a été proposée.

L'objectif de la thèse visait à déterminer et caractériser des facteurs de transcription RR-B liés à la contrainte osmotique de façon spécifique. Les résultats phares de cette thèse sont la mise en évidence de la fonction de facteur de transcription de deux RR-B, RR13 et RR19, *via* l'étude de leur capacité à dimériser et à transactiver ou non des gènes de réponses à la contrainte osmotique. Le RR13 semblerait spécifique de la voie cytokinines et le RR19 de la voie osmosensing. Ce travail étaye fortement l'implication du RR19 dans le MSP dédié à cette contrainte. De nombreuses études ont par ailleurs été initiées durant ce travail de thèse et pourront faciliter la caractérisation du MSP étudié.

Mots clés : phosphorelais multiple, contrainte osmotique, RR-B, peuplier, dimérisation

Identification and characterization of B-type Response Regulators transcription factors involved in the poplar osmosensing pathway

Summary: Plants are increasingly faced with a decrease in soil's water availability, leading to an hydric and osmotic stress and impacting on their survival. Plant tolerance to this stress will be dependent on its perception.

One of the signaling mechanisms related to this stress is called MultiStep Phosphorelay (MSP) and is composed by 3 partners: an histidine-aspartate receptor kinase (HK), histidine phosphotransfer proteins (HPT) and response regulators (RR), including the B-type RR transcription factors.

In *Arabidopsis*, an MSP with AHK1, AHP2 and ARR18 has been identified for osmotic stress signaling.

For poplar, HK1a and b, paralogous genes and homologous with AHK1, 10 HPT and 9 B-type RR genes have been isolated respectively. The osmosensor function of HK1a was proposed, and an osmosensing signaling pathway composed by HK1a, 3 HPT proteins, and 6 B-type RR has been suggested.

The purpose of this work was focused on the identification and characterization of B-type RR transcription factors specifically linked to osmotic stress in poplar. The main results of this work are the highlight of the transcription factor function of two B-type RR, RR13 and RR19, through the study of their ability to dimerize and transactivate or not osmotic stress-responsive genes. The RR13 seems to be specific for cytokinins signaling pathway, whereas the RR19 seems to be specific for the osmosensing one. This work strongly supports the involvement of RR19 in the osmosensing MSP. Many studies have also been initiated during this work and will facilitate the characterization of the studied MSP.

Keywords: Multistep Phosphorelay, osmotic stress, B-type RR, poplar, dimerization



UPRES EA 1207 Laboratoire de Biologie des Ligneux et des
Grandes Cultures
INRA USC 1328 Arbres et Réponses aux Contraintes
Hydriques et Environnementales
EA 2106 Laboratoire Biomolécules et Biotechnologies
Végétales

