



HAL
open science

Caractérisation fonctionnelle de deux facteurs de transcription de type bHLH chez *Arabidopsis thaliana*

Nabila Abderrahmani

► **To cite this version:**

Nabila Abderrahmani. Caractérisation fonctionnelle de deux facteurs de transcription de type bHLH chez *Arabidopsis thaliana*. [Stage] France. Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines (UVSQ), FRA. 2013, 27 p. hal-02807715

HAL Id: hal-02807715

<https://hal.inrae.fr/hal-02807715>

Submitted on 17 Sep 2020

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.

Caractérisation fonctionnelle de deux facteurs de transcription de type bHLH chez *Arabidopsis thaliana*

Nabila Abderrahmani

► **To cite this version:**

Nabila Abderrahmani. Caractérisation fonctionnelle de deux facteurs de transcription de type bHLH chez *Arabidopsis thaliana*. Sciences du Vivant [q-bio]. 2013. hal-02935961

HAL Id: hal-02935961

<https://hal.inrae.fr/hal-02935961>

Submitted on 10 Sep 2020

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.

Nabila ABDERRAHMANI

Licence professionnelle de biotechnologie

Université de Versailles-Saint-Quentin

Promotion 2012-2013



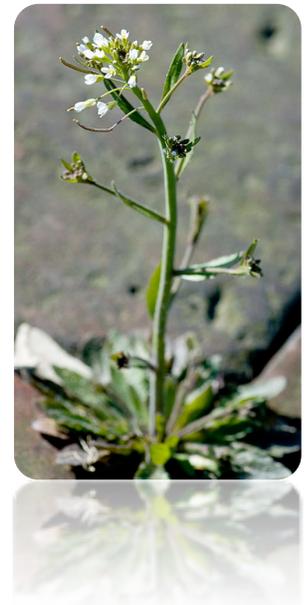
Caractérisation fonctionnelle de deux facteurs de transcription de type bHLH chez *Arabidopsis thaliana*

Maître de stage : Rozenn LE HIR

Maître tuteur : Marie-Clotilde ZACHARIA

Maître rapporteur : Christophe LEMAIRE

Lieu du stage : Institut Jean-Pierre Bourgin, Institut National de la Recherche Agronomique à Versailles



Remerciements :

Tout d'abord, je remercie Sylvie DINANT, pour m'avoir accueillie dans l'équipe PATS (Phloème, Allocation, Transport et Signalisation).

Je tiens à remercier ma maître de stage Rozenn LE HIR pour m'avoir encadrée, aidée, et prodigué de nombreux conseils.

Je souhaite également à remercier chaque membre de l'équipe PATS, pour m'avoir soutenue et aidée.

Je tiens également à remercier mes parents, mon frère Walid, mon fiancé Samir et ma cousine Roza pour m'avoir encouragée durant ce stage.

Merci à tous pour m'avoir permis de mener à bien mon projet.

Abréviations :

bHLH : basic/ Loop-Helix-Loop (ou domaine basique, boucle-hélice-boucle)

ABA : acide abscissique

Col_0 : Ecotype Columbia (sauvage)

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

t-DNA : ADN transféré.

PCR : Polymerase Chain Reaction

BET : Bromure d'éthidium

GUS : gène de la β -glucuronidase

CaMV : virus de la mosaïque du chou-fleur

Sommaire :

1. Présentation de l'entreprise.....	6
2. Synthèse bibliographique.....	9
2.1. Présentation du matériel végétal.....	9
2.2. Fonction et structure du système vasculaire.....	9
2.2.1. Le xylème.....	9
2.2.2. Le phloème.....	9
2.3. Les facteurs de transcription de type bHLH.....	10
2.3.1. Définition et structure.....	10
2.3.2. Mode d'action et fonction.....	11
2.4. L'acide abscissique.....	11
2.4.1. Définition et fonction.....	11
2.4.2. Interactions entre l'ABA et les facteurs de transcription bHLH.....	12
2.5. Présentation des résultats obtenus précédemment.....	12
2.6. Objectifs du travail.....	14
3. Matériel et méthodes.....	14
4. Résultats-Discussion.....	17
5. Conclusion-Perspectives.....	27

Introduction :

J'ai effectué mon stage à l'institut Jean-Pierre Bourgin situé à l'Institut National de la Recherche Agronomique à Versailles. Lors de ce stage l'objectif a été la caractérisation fonctionnelle de deux facteurs de transcription de type bHLH chez *Arabidopsis thaliana*. Mon stage a été encadré par Rozenn Le Hir, au sein de l'équipe PATS (Phloème, Allocation, Transport et Signalisation). L'équipe a plusieurs projets de recherche sur le phloème, qui joue un rôle dans la distribution des nutriments, dans le développement de la plante ainsi que le transport de signaux à longue distance lors de stress biotiques et abiotiques (stress par des facteurs : lumière, sécheresse).

On a fait un phénotypage des lignées dérégulées dans l'expression de facteurs de transcription de la sous-famille 12 des bHLH, qui sont bHLH68 et bHLH112 qui sont exprimés dans le phloème. On a travaillé sur la plante *Arabidopsis thaliana* qui est un organisme modèle chez les plantes, notamment grâce à son petit génome et à sa reproduction rapide, ainsi que son autofécondation. Cette plante est de la famille des *Brassicaceae* (ex : choux et moutarde), faisant partie de la classe des dicotylédones.

Avant mon arrivée en stage, des lignées simples mutants, double mutant et sur-expresses ont été construites, et je vais vous présenter les résultats obtenus sur l'analyse de ces lignées.

1. Présentation de l'entreprise :

J'ai effectué mon stage à l'Institut Jean-Pierre Bourgin (IJPB) qui appartient à l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA). Dans ce contexte je vais vous présenter l'INRA, ensuite je présenterai l'IJPB, puis le pôle et enfin l'équipe dans laquelle j'ai effectué mon stage.

1.1 L'INRA :

1.1.1 Historique de l'INRA :

L'Institut National de la Recherche Agronomique ou INRA est un organisme de recherche fondé en 1946, qui est axé sur l'agronomie, la biologie (végétale, animale), la microbiologie, l'environnement et l'écologie. C'est le premier institut de recherche agronomique en Europe, et le deuxième dans le monde. Les recherches actuelles de l'INRA se font sur l'agriculture, l'environnement et l'alimentation. C'est un institut multi-disciplinaire qui contient comme disciplines scientifiques les sciences de la vie à 68%, ensuite 12% de sciences des milieux et des procédés, ainsi que 8% d'écotechnologies et biotechnologies, puis 8% de sciences sociales et 4% de sciences du numérique. De plus l'INRA effectue de nombreuses collaborations avec la communauté scientifique dans le monde.

1.1.2 Implantation géographique en région parisienne :

L'INRA est présent dans toute la France y compris Outre-Mer sur 18 centres, et se compose en 13 départements scientifiques.

Comme on peut le voir sur la figure 1, sept centres régionaux sont présents dans la région parisienne, parmi eux le centre dans lequel j'ai fait mon stage, qui est l'INRA de Versailles Grignon, situé à Versailles.



Figure 1: Carte de l'implantation géographique de centres INRA en région parisienne (Versailles Thiverval Grignon dans les Yvelines, Jouy en Josas (<http://www.versailles-grignon.inra.fr/Le-Centre-et-les-recherches/Presentation/Implantation>))

1.1.3 Statut de l'entreprise et budget :

L'INRA est sous le statut de l'Etablissement public à caractère scientifique et technologique (EPST), et est sous la double tutelle du Ministère chargé de la recherche et du ministère chargé de l'Agriculture, de

l'Agroalimentaire et de la Forêt. Le budget pour 2013 est de 881,61 M d'euros.

1.1.4 Le centre INRA de Versailles Grignon :

L'INRA de Versailles Grignon compte 27 unités de recherche. Ce centre est composé de 82591 m² carré de laboratoires et locaux techniques répartis sur 14 bâtiments. Le budget annuel est de 80 M d'euros.

Sur le site INRA de Versailles il y a différentes structures (Pessac, URGI, Pisc) dont l'IJPB.

1.2 L'Institut Jean-Pierre Bourgin (IJPB) :

1.2.1 Historique et organisation de l'IJPB :

L'IJPB, créé en 2010, fait parti de l'axe de recherche Biologie végétale intégrative, biotechnologies et ressources de l'INRA de Versailles. L'IJPB est hébergé dans le centre INRA. Il contient 5 pôles de recherche, contenant au total 25 équipes de recherche. L'IJPB est une grande unité mixte INRA-AgroParisTech. Les travaux menés concernent la biologie végétale.

L'IJPB se compose de 4500 m² de serres, et 500 m² de chambres à culture de niveaux de confinement biologique S1, S2, S3.

L'IJPB est constitué de trois plateformes (la plateforme de Cytologie et Imagerie Végétale, le Laboratoire Commun de Biochimie, la Plateforme de Chimie du Végétal) et de deux collections de ressources végétales qui sont *Arabidopsis thaliana* et *Brachypodium distachyon*.

L'unité s'axe sur les génomes des plantes, les réponses des plantes aux stress, en s'aidant de la biologie et de la chimie végétale. Cinq pôles scientifiques constituent cette unité (APE, DEG, MSM, PAVE, RG) (Figure 2).

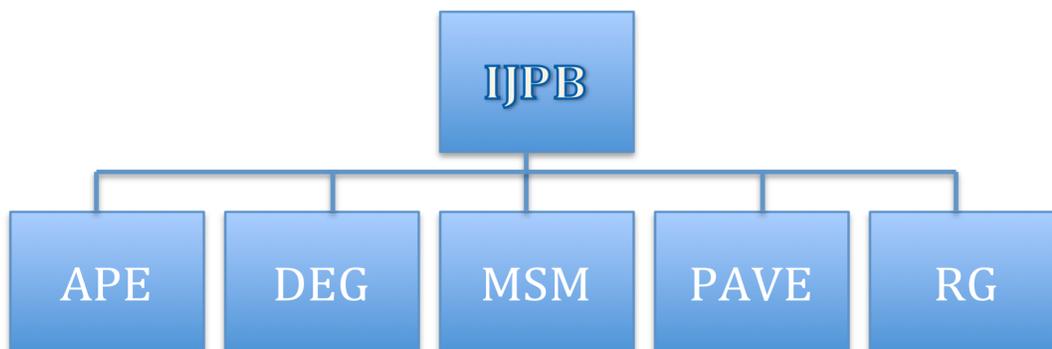


Figure 2: Organigramme des pôles de l'IJPB. Les pôles sont les suivantes : Adaptation des plantes à leur environnement (APE), Dynamique et expression des génomes (DEG), Morphogenèse, signalisation, modélisation (MSM), Paroi végétale, fonction et usage (PAVE), Reproduction et graines (RG).

1.2.2 Pôle APE :

L'équipe dans laquelle j'ai effectué mon stage fait partie du pôle Adaptation des plantes à l'environnement (APE). Le pôle APE est constitué de 6 équipes. Dans ce pôle on travaille sur l'espèce modèle *Arabidopsis thaliana* ainsi que sur le maïs et *Brachypodium distachyon*. On y étudie les réponses des plantes aux contraintes du milieu. Ces contraintes environnementales peuvent être de nature biotiques (relations plante-pathogène) et abiotiques (stress azoté, froid, etc.). Les recherches faites concernent le métabolisme de l'azote, et celui du carbone.

1.2.3 Equipe PATS :

Mon stage s'est effectué dans l'équipe Phloème, Allocation, Transport et Signalisation (PATS). L'équipe se compose de 6 personnels permanents : 1 directeur de recherche, 3 chargés de recherche, 1 assistante ingénieur et 1 technicienne de recherche. L'équipe étudie l'adaptation des plantes à certains environnements, en s'intéressant plus particulièrement au phloème qui est un grand intégrateur de ces réponses. Y sont étudiés les protéines phloémiennes, les sucres et leurs transports.

2. Synthèse bibliographique :

2.1 Présentation du matériel végétal :

Arabidopsis thaliana est une petite plante à fleur qui est utilisée comme organisme modèle en biologie végétale. *Arabidopsis* est un membre de la famille des Brassicacées ou moutarde. Son petit génome de 114,5 Mb a été entièrement séquencé en 2000 (*Arabidopsis* GI, 2000).

Son cycle de vie est rapide, il y a six semaines entre la germination et la graine mature. De plus la production de graines est prolifique et la culture se fait facilement dans un espace restreint. On peut transformer la plante à l'aide de méthodes de transformation utilisant *Agrobacterium tumefaciens*. (<http://www.arabidopsis.org/portals/education/aboutarabidopsis.jsp>)



Figure 3: Dessin de la plante *Arabidopsis thaliana* (www.arabidopsis.org)

2.2 Fonctions et structure du système vasculaire :

2.2.1 Le xylème :

Au sein d'une plante, deux tissus vasculaires sont présents, ce sont le xylème et le phloème. Le xylème conduit la sève brute vers les feuilles. Il a un rôle conducteur d'eau et de sels minéraux, et a également un rôle de soutien. Le xylème est donc constitué de cellules conductrices de sève, de fibres ligneuses et de parenchymes ligneux. Le xylème permet plus précisément le transport d'hormones telles que l'ABA, l'ACC (un précurseur de l'éthylène), et des cytokinines, et des strigolactones (hormone végétale) (Lucas *et al.*, 2013).

2.2.2 Le phloème :

Comme on peut le voir dans la figure 4 le phloème se compose de tubes criblés, chaque tube criblé s'associe à une ou plusieurs cellules compagnes, et communiquent à l'aide de plasmodesmes. Les tubes criblés possèdent aussi des cribles. Ces derniers sont des cellules allongées et ce sont eux qui permettent la circulation de la sève élaborée à partir des feuilles.

De même que le xylème, le phloème joue aussi un rôle de réserve et de soutien. Le phloème a aussi des parenchymes libériens verticaux jouant un rôle de réserve. Le phloème est un organe important et vital car il a pour fonction de permettre le transport de phytohormones (auxine, cytokinines, ABA), de petits ARN, d'ARNm et de protéines (Lucas *et al.*, 2013).

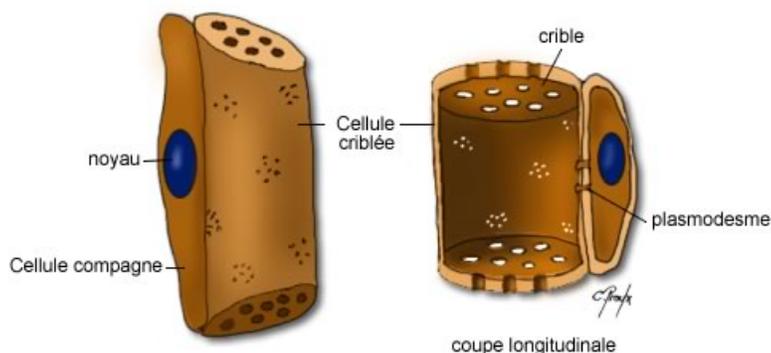


Figure 4: Schémas illustrant la structure du phloème. Le phloème se compose de tubes criblés associés à une ou plusieurs cellules compagnes, entre eux il y a les plasmodesmes (Lucas *et al.*, 2013).

2.3 Les facteurs de transcription de type bHLH :

2.3.1 Définition et structure :

Les protéines bHLH basique/hélice-boucle-hélice sont une superfamille de facteurs de transcription, ils se fixent en tant que dimères spécifiquement à des sites cibles de l'ADN (Toledo-Ortiz *et al.*, 2003). 147 gènes bHLH ont été identifiés chez Arabidopsis (Toledo-Ortiz *et al.*, 2003). Des analyses phylogénétiques suggèrent que les protéines bHLH de plantes se regroupent en 26 sous-familles. La diversité des protéines bHLH de plantes s'est établie il y'a environ 440 millions d'années (Pires and Dolan, 2010).

Les protéines bHLH sont composées d'une boucle, qui est la région la plus divergente dans le domaine en terme de taille et de composition en acides aminés (Massari and Murre, 2000 ; Toledo-Ortiz *et al.*, 2003). Le cœur de la séquence d'ADN reconnue par la protéine bHLH est une séquence appelée E-box (Toledo-Ortiz *et al.*, 2003).

Chez Arabidopsis, la région basique des protéines bHLH est de 17 acides aminés. On a localisé les gènes bHLH dans l'ensemble du génome d'Arabidopsis, composé de 5 chromosomes (Toledo-Ortiz *et al.*, 2003).

La famille bHLH comprend un domaine spécifique de 60 acides aminés avec deux régions distinctes. La région basique située en N-terminal est impliquée dans la fixation à l'ADN avec un haut nombre de résidus basiques. La région HLH en C terminal, fonctionne comme un domaine de dimérisation (Toledo-Ortiz *et al.*, 2003), constituée de deux hélices alpha amphipatiques séparées par une région hélice avec une séquence et une longueur variable (Toledo-Ortiz *et al.*, 2003) (Figure 5).

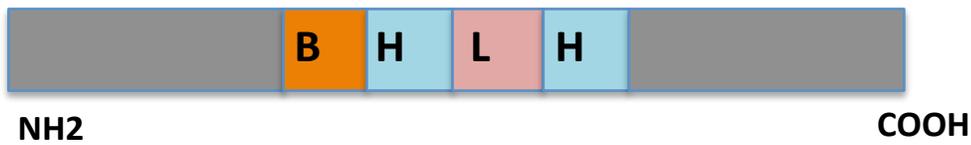


Figure 5 : Schéma d'une protéine bHLH, de 202 acides aminés (en conformation linéaire). B correspond au domaine basique, H au domaine hélice (Helix), et L au domaine boucle (Loop).

2.3.2 Mode d'action et fonction :

La régulation des protéines bHLH se produit à différents niveaux moléculaires, incluant les activités de liaison à l'ADN et les modifications post-traductionnelles. (Toledo-Ortiz *et al.*, 2003 ; Kim and Kim, 2006)

Les séquences en acides aminés du domaine bHLH définissent deux activités : la liaison à l'ADN ainsi que la dimérisation. On prédit 120 protéines se liant à l'ADN, et 27 protéines ne se liant pas à l'ADN, car ayant une région moins basique. (Toledo-Ortiz *et al.*, 2003)

Parmi les bHLH il y a ceux qui se lient à la boîte E-box et ceux qui n'y lient pas. Cette liaison se fait par les résidus Glu-13 et Arg-16 présents dans la région basique. Dans la famille de protéines AtbHLH 108 protéines ont la paire d'acides aminés Glu-13/Arg-16 conservée. (Toledo-Ortiz *et al.*, 2003). Les protéines HLH peuvent fonctionner comme des régulateurs négatifs de protéines bHLH en formant des hétérodimères non-liants à l'ADN avec d'autres protéines bHLH se liant à l'ADN (Toledo-Ortiz *et al.*, 2003).

Les bHLH sont des composants de régulation importants dans divers processus biologiques tels que la prolifération cellulaire et l'établissement de lignée cellulaire (Massari and Murre, 2000 ; Toledo-Ortiz *et al.*, 2003). La majorité des protéines bHLH sont impliquées dans des régulations transcriptionnelles, et sont impliquées dans la biosynthèse de pigments (anthocyanine), le phytochrome, la déhiscence des fruits, dans le carpelle et le développement épidermal, ainsi que dans la réponse aux stress dont le stress hydrique lié à la voie de signalisation de l'acide abscissique. (Li *et al.*, 2007).

2.4 L'acide abscissique :

2.4.1 Définition et fonction :

L'ABA est une phytohormone qui joue un rôle vital dans la réponse au stress hydrique. Elle permet la limitation hydrique de la plante en période de sécheresse. Elle joue un rôle dans de nombreux processus physiologiques incluant la germination des graines, la dormance, la croissance des semis, l'ouverture des stomates, et les réponses aux stress environnementaux tels que la

sécheresse, la salinité et le froid (Li *et al.*, 2007). Cette hormone favorise également l'abscission des feuilles et des fruits (revue Physiologie végétale, 2. Développement, R. Heller)

En condition de déshydratation, de l'ABA est accumulé. En effet de nombreux gènes inductibles par le stress sont activés par l'ABA (Li *et al.* 2007).

L'ABA inhibe la croissance et le développement, c'est un antagoniste des gibbérellines, qui retarde la croissance des rameaux, où les entrenoeuds ne s'allongent plus. Son deuxième rôle est de fermer les stomates (revue Physiologie végétale, 2. Développement, R. Heller).

2.4.2 Interactions entre l'ABA et les facteurs de transcription bHLH :

Dans la littérature, deux facteurs de transcription de type bHLH ont été identifiés comme intervenant dans la voie de signalisation liée à l'ABA. Le facteur de transcription AtAIB (bHLH17) localisé dans le noyau, agit comme un régulateur positif dans la modulation de la réponse à l'ABA dans Arabidopsis. Ceci est confirmé lorsque l'on surexprime le gène *AtAIB*, puisque dans ce cas les plantes transgéniques obtenues sont plus résistantes à la sécheresse. (Li *et al.* 2007).

Le gène *AtAIG1* (*bHLH32*) est régulé par l'ABA et code un facteur de transcription de type bHLH chez Arabidopsis. Ce gène a été ciblé dans le noyau et se fixe à la séquence E-box de l'ADN, qui est dans de nombreuses régions promotrices de plusieurs gènes de réponse à l'ABA. Des analyses fonctionnelles ont montré que le mutant knockout pour le gène *atAIG1* fait augmenter la sensibilité à l'ABA. L'ARNm de *AtAIG1* est accumulé en faible quantité dans les tiges, les racines, et les feuilles en rosettes. Il est plus abondant dans les fleurs. (Kim and Kim, 2006)

2.5 Présentation des résultats obtenus précédemment :

A mon arrivée, plusieurs lignées étaient disponibles :

- Des lignées d'insertion dans les gènes *bHLH68* ou *bHLH112*. Ces lignées ont été testées et ont été confirmées comme étant des mutants knock-out pour chacun de ces gènes.
- Des lignées doublement mutées dans les gènes *bHLH68* et *bHLH112*.
- Des lignées exprimant le gène rapporteur de la B-glucuronidase (GUS) sous le contrôle des promoteurs *bHLH68* et *bHLH112*.
- Des lignées surexprimant le gène *bHLH68* ou *bHLH112* grâce à l'utilisation du promoteur 35S.

Dans un premier temps, l'analyse des lignées d'insertion avec le gène rapporteur GUS (*prombHLH68 :GUS* et *prombHLH112 :GUS*) a permis de montrer que les séquences promotrices de ces deux gènes étaient exprimées au niveau du phloème, spécifiquement ou non. De plus une

expérience préliminaire a permis de montrer qu'en conditions de stress hydrique, les simples mutants présentent un flétrissement de la base des feuilles, et ne résistent pas bien par rapport au type sauvage (Figure 6). En revanche les sur-expresseurs présentent des feuilles plus petites mais sont plus jolies car elles résistent mieux (Figure 6).

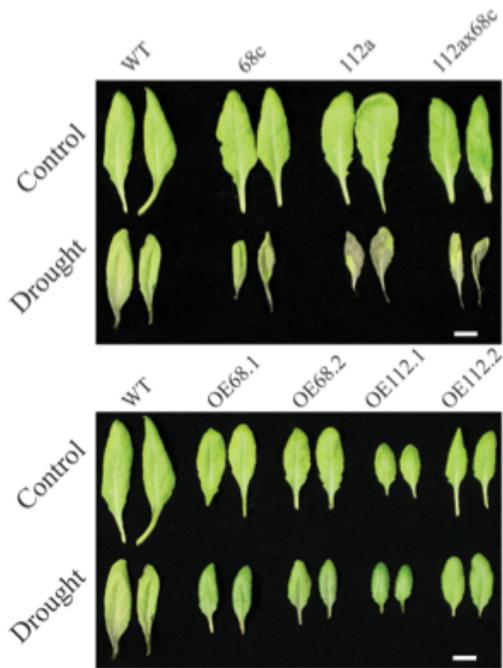


Figure 6 : Observation des feuilles du type sauvage (WT), des simples mutants (68c et 112a) du double mutant (112ax68c) (panneau du haut) et des lignées surexprimeuses (OE68.1, OE68.2, OE112.1 et OE112.2) (panneau du bas) en condition d'arrosage normal (Control) et en condition de sécheresse (Drought).

L'analyse du système racinaire des différentes lignées a également permis de montrer que les racines des simples et double mutants avaient une taille légèrement inférieure au sauvage, les sur-exprimeuses ont une plus petite taille, avec toutefois OE112.1 se rapprochant du 68c. De plus, le comptage du nombre de racines latérales a permis de montrer que les lignées surexprimants *bHLH68* et *bHLH112* ne présentaient pas de racines latérales développées alors que les précurseurs de ces racines (primordia des racines latérales) étaient présents en grande quantité. Ce résultat laisse donc penser à un problème de croissance des racines latérales. Finalement l'observation approfondie des racines a permis de constater la présence de dépôt jaunâtre sur les racines des plantes surexprimants ces gènes (Figure 7). Dans la littérature, ce phénotype est décrit dans le cas de lignées présentant des défauts liés à la synthèse d'ABA.

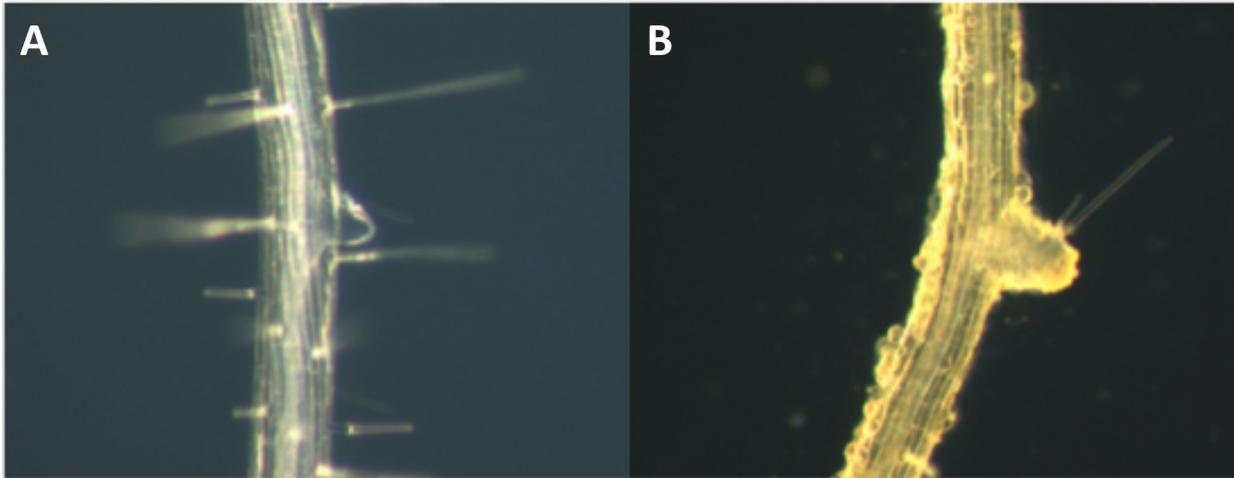


Figure 7 : Phénotype du système racinaire chez des plantules *in vitro* âgées d'environ 10 jours de type sauvage (A) ou surexprimant le gène BHLH68 (B).

2.6 Objectifs du travail :

Dans le cadre de mon stage, l'objectif a été de confirmer certains des résultats précédemment obtenus mais aussi d'approfondir l'analyse phénotypique de ces différentes lignées. J'ai ainsi analysé la qualité des graines produites par ces lignées. Pour cela, j'ai réalisé des pesées de 1000 graines pour les différents génotypes afin de donner le poids d'une graine, et donc de pouvoir visualiser la variabilité phénotypique des graines, puisque le poids est un indice de qualité de la graine. Ensuite, afin de compléter cette analyse des graines les mesures des ratios carbone sur azote (C/N) seront réalisées. Les résultats obtenus permettront de voir si les graines des lignées mutantes et sur-expresseurs sont différentes ou non de celles du type sauvage. De plus l'observation des colorations GUS sur les lignées *prombHLH68:GUS* et *prombHLH112:GUS* cultivées en présence ou non d'ABA, devrait permettre de montrer si ces promoteurs sont induits ou non en présence de cette hormone. Finalement, afin d'approfondir la caractérisation phénotypique de ces lignées, des mesures de la taille des hypocotyles après croissance à la lumière ou à l'obscurité seront réalisées.

3. Matériel et méthodes :

3.1 Matériel végétal :

Pour l'ensemble des lignées produites précédemment, le fond génétique de référence est l'écotype Columbia-0 (Col-0, encore appelé type sauvage ou WT). Les lignées simples mutantes sont des mutants des gènes *bHLH68* et *bHLH112*. Des lignées doubles mutantes, nommées *bHLH68bHLH112* ont également été réalisées. Des lignées surexprimant les gènes *bHLH68* ou

bHLH112 ont été produites par insertion d'un vecteur portant la séquence codante du gène cible en aval du promoteur 35S. Ce promoteur vient du virus CaMV et sa présence conduit à la surexpression du gène cible dans tous les tissus de la plante à tous les stades de développement. Pour simplification dans la suite du rapport les lignées *p35S::bHLH68-1-1-6* et *p35S::bHLH68-1-16-1* seront nommées OE68-1 et OE68-2 respectivement. De la même manière les lignées *p35S::bHLH112-1-2-1* et *p35S::bHLH112-1-14-3* seront notées OE112-1 et OE112-2 respectivement. Finalement des lignées présentant des fusions promoteur-gène rapporteur GUS ont été utilisées.

3.2 Culture *in vitro* :

3.2.1 Stérilisation des graines :

2 comprimés de bayrochlore sont dissous dans 80 ml d'eau distillée (solution de bayrochlore). 5 ml de solution de bayrochlore sont ajoutés dans 45 ml d'éthanol à 95 % (solution de stérilisation). Environ 100 µl de graines sont placées dans un eppendorf de 1,5 ml. Ensuite on ajoute 1 ml de la solution de stérilisation. Au bout de 6 min d'agitation on laisse sédimenter les graines puis on élimine le surnageant. On effectue 2 rinçages avec 1 ml d'éthanol à 95%. L'excédent d'alcool sur les graines est enlevé et les graines sont mises à sécher toute la nuit, bouchon ouvert sous la hotte à flux laminaire.

3.2.2 Préparation du milieu de culture :

Dans un bécher de 4l, 11,8 g de milieu Arabidopsis « Duchefa » (11,8227 g/l) est mélangé à 3 litres d'eau. On ajoute 328,2 mg de $(\text{CaNO}_3)_2$ (236,15 g/mol) à cette solution. On basidifie le milieu jusqu'à un pH de 5,7 par l'ajout de KOH à 10N. 3 grammes d'agar et 500 ml du milieu sont versés dans chaque bouteille. Le milieu est stérilisé à l'autoclave pendant 20 min.

3.2.3 Semis *in vitro* :

A partir de 500 µM de solution mère d'ABA on souhaite obtenir une concentration finale de 0,5 µM de solution d'ABA (dilution 1/1000^{ième}). Pour avoir 500 µM de concentration initiale on pèse 1,32 mg de poudre d'ABA (MM (ABA)=264,32 g pour 1 mol et pour 1l) que l'on met dans 10 ml d'EtOH (70%). On prélève 100 µl de solution ABA (500 µM) que l'on verse dans le milieu Arabidopsis de 500ml. Pour la condition sans ABA on met 100 µl d'éthanol (70%) dans 500 ml de milieu Arabidopsis. Le milieu est coulé dans des boîtes de Petri. Sous la hotte stérile à flux laminaire 30 graines sont semées par boîte de Petri et par lignée. Les boîtes sont placées 2 jours au frigo. Les

boites sont mises en chambre sur les tourelles pour 10 jours.

3.3 Coloration histochimique GUS :

3.3.1 Tampon GUS :

Pour 10 ml : on dissout sous la hotte à produits chimiques 10 mg de X-gluc dans 500 μ l de DMSO. On ajoute à cela 100 μ l de triton (X100, 10%), 200 μ l d'EDTA (0,5M), 125 μ l de potassium ferrocyanide (0,5mM) et 125 μ l de potassium ferricyanide (0,5mM). On complète avec du tampon phosphate jusqu'à 50 ml. Le tampon GUS se conserve au frigo, dans de l'aluminium.

3.3.2 Test GUS :

Dans une plaque multipuits on verse 1 ml d'acétone (80%) dans chaque puits. Les échantillons sont placés dans ces puits. La plaque est mise à -20°C pendant 20 min. Les plantules sont lavées 3 fois à l'eau distillée. Ensuite les plantules sont immergées dans 1 ml de tampon GUS. On filtre sous vide pendant 10min dans le tampon GUS. La plaque est mise dans de l'aluminium, à l'étuve (37°C). On vérifie toutes les 2h la coloration des plantules. On met la plaque 20min au frigo, puis on enlève le tampon GUS que l'on remplace par 2 ml d'EtOH (70%). La plaque se conserve au frigo.

3.2 Mesures sur Image J :

Les boites sont scannées. Le réglage de résolution choisi est de 600 Dpi, enregistrer la photo au format .tif. L'échelle est réglée dans le logiciel ImageJ en remplaçant « inch » par « cm ». Calculer la taille de l'hypocotyle avec l'option « segmented lines » (Figure 8).

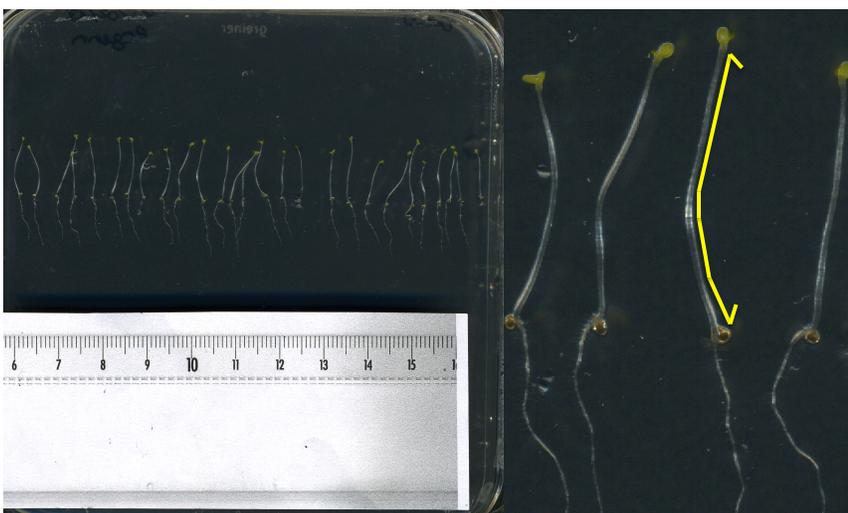


Figure 8 : Photo d'une boite en condition d'obscurité à 8 jours. L'hypocotyle est mesuré sur l'image de droite (flèche jaune) entre les cotylédons et le début de la racine.

3.3 PCR et géotypage :

Le mix est composé de 125 µl de buffer , 125 µl de MgCl₂, 12,5 µl de dNTPs, 12,5 µl de primer, 1,5 µl de l'autre primer, 6,25 µl de Taq (Taq fermentase), 331,25 µl d'H₂O pour compléter ce mix. Dans chaque puits sont mis 20 µl du mix avec 5 µl d'ADN. Lorsque l'on réalise le mix on ne doit pas oublier de compter des puits de contrôle positif (sauvage), et de contrôle négatif (eau).

Le programme de la PCR est la suivante :

Dénaturation 98°C 3 min

Cycle X40 :

Dénaturation 98°C 10 sec

Hybridation 65°C 30 sec

Elongation 72°C 3 min

Elongation finale 72°C 5 min.

On ajoute aux échantillons 10 µl de bleu de charge, ensuite on place 10 µl des échantillons dans les puits. On met également 6 µl d'échelle de poids moléculaire.

4. Résultats-Discussion :

4.1 Mesure des hypocotyles :

La mesure des hypocotyles se fait dans deux conditions : une en condition d'obscurité, une autre en condition de lumière. Les boîtes seront mises, après deux jours de vernalisation, sur les tourelles en position verticale. Pour la manipulation obscurité une série sera observée à 10 jours, une deuxième à 6 jours. Pour la manipulation en lumière on observera les hypocotyles à 8 jours.

On a décidé de faire 2 séries de mesures d'hypocotyles pour les conditions d'obscurité car à 6 jours (au lieu de 10 jours) de croissance, la crosse présente juste avant les premiers cotylédons est bien visible, et cela facilite la mesure de l'hypocotyle, ce qui de plus améliore la précision des résultats, et permet de comparer encore mieux les tailles d'hypocotyles des sauvages face aux autres lignées.

Croissance des hypocotyles à l'obscurité à 10 jours :

La taille moyenne d'un hypocotyle d'une plantule de type sauvage (Col_0) est de $0,8456 \pm 0,0686$ cm. Le sur-expresser OE112-1 a une taille quasiment égale à celle du sauvage. Les simples mutants

et double mutant et autres sur-expresseurs sont significativement plus petits que le sauvage (Figure 9A).

Croissance des hypocotyles à l'obscurité à 6 jours :

L'hypocotyle du sauvage mesure $0,51 \pm 0,064$ cm. A ce stade, les deux simples mutants ne sont pas statistiquement différents du sauvage. En revanche pour les autres génotypes ils sont bien différents. Avec un comportement de taille inférieure au sauvage excepté pour le double mutant qui lui est supérieur (Figure 9B).

Croissance des hypocotyles en lumière à 8 jours :

Après une croissance à la lumière, le type sauvage (Col_0) a une taille d'hypocotyle de $0,058 \pm 0,0094$ cm. Le simple mutant *bHLH112a* et le double mutant *bHLH112bHLH68* ne sont pas statistiquement différents du sauvage (Figure 9C) alors que les sur-expresseurs et le simple mutant *bHLH68c* sont significativement et respectivement plus petits ou plus grands que le sauvage (Figure 9C).

Discussion des résultats de l'expérience de la mesure des hypocotyles :

On peut constater que la taille des hypocotyles est environ 11 fois supérieure en condition d'obscurité par rapport aux conditions de lumière, pour le sauvage, pour le même nombre de jours (8 jours). Ceci s'explique par le fait qu'en condition d'obscurité, la plante va chercher la lumière manquante donc la graine va s'étioler, ce qui fait qu'il y aura de plus petites racines et un plus grand hypocotyle. Pour les deux conditions on peut voir que les sur-expresseurs ont un plus petit hypocotyle que le sauvage, différence très marquée chez les OE68.

On peut conclure que pour les sur-expresseurs du gène *bHLH68* la différence de taille des hypocotyles avec le sauvage est plus marquée. La différence est notable pour les manipulations en obscurité à 8 jours et en lumière à 8 jours. En obscurité à 8 jours les simples mutants et le double mutant ont un plus petit hypocotyle que le sauvage. Le sur-expressueur OE112-1a une taille d'hypocotyle presque similaire au Col_0, le sur-expressueur OE112-2 est plus petit.

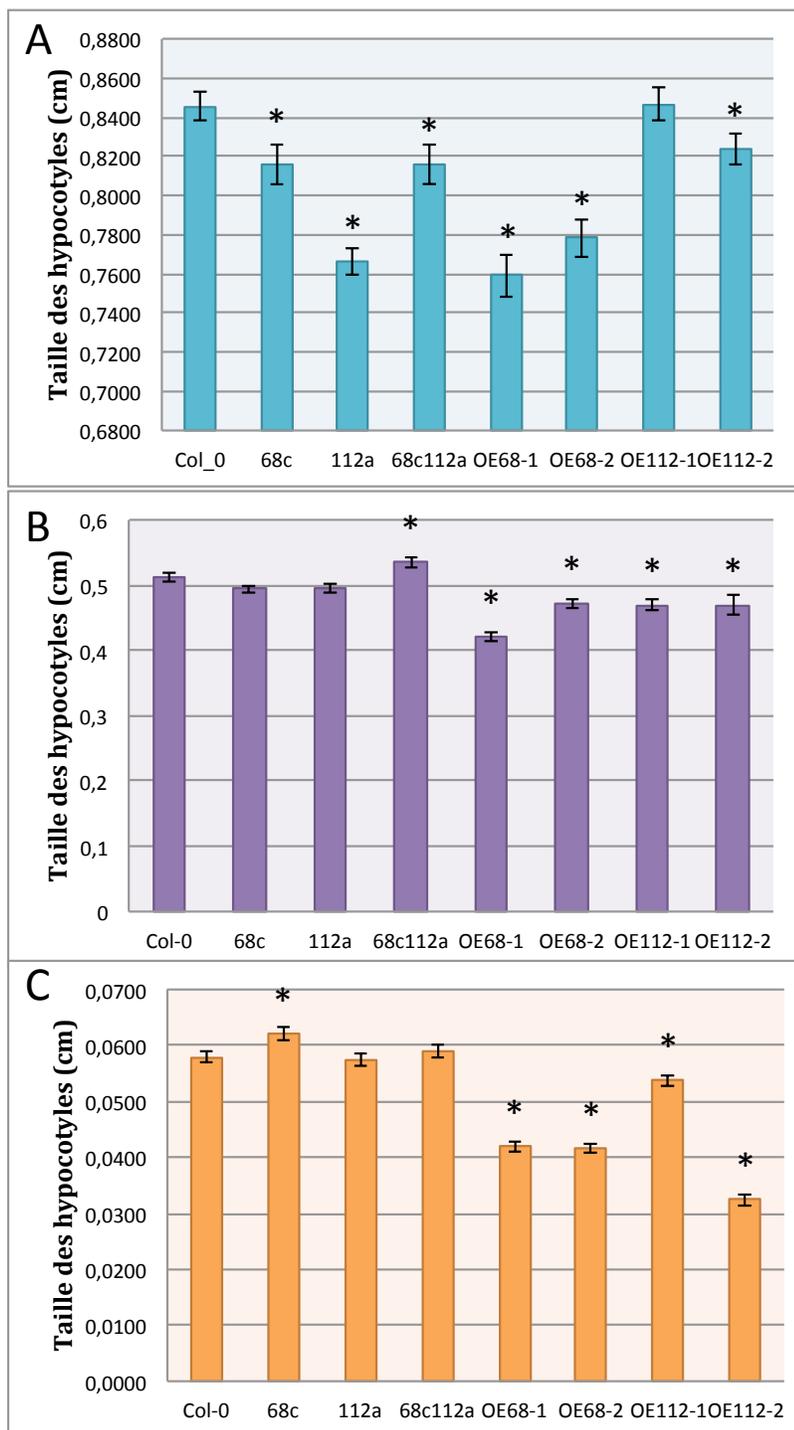


Figure 9 : Taille des hypocotyles de plantules cultivées *in vitro* après 10 jours (A) ou 6 jours (B) de croissance à l'obscurité, ou après 8 jours de croissance à la lumière (C). Les mesures ont été faites sur les génotypes suivants : Col_0, *bHLH68c* et *bHLH112a*, *bHLH68cbHLH112a*, OE68-1, OE 68-2, OE112-1 et OE 112-2. Un test t de Student a été utilisé pour confirmer que les différences observées entre le sauvage et les lignées mutantes étaient significatives (*). Les valeurs représentent les moyennes±SE (n >60).

4.2 Poids de 1000 graines :

Pour chaque génotype 1000 graines ont été comptées puis pesées. Le poids de ces 1000 graines est ensuite reporté à une seule. Afin d'estimer la variabilité de ce paramètre, les graines provenant de 3 récoltes indépendantes (année 2009, 2010 et 2013) ont été analysées.

Poids de 1000 graines : Série de 2009 :

Le poids de 1000 graines du type sauvage Col_0 est de $0,0148 \pm 0,0014$ mg. Les poids de 1000 graines des génotypes des simples, double mutant, et de OE68-1 et OE112-2 ne sont pas statistiquement différents du sauvage. OE68-2 et OE112-1 ont un poids significativement supérieur à celui du sauvage (Figure 10A).

Poids de 1000 graines Série de 2010 :

1000 graines de génotype Col_0 pèsent $0,0208 \pm 0,0001$ mg. OE68-2 et OE 112-2 ont un poids significativement inférieur à celui du Col_0. Les poids des graines des autres génotypes ne sont pas statistiquement différents du sauvage (Figure 10B).

Série de 2013 :

Le poids de 1000 graines de type sauvage est de $0,0185 \pm 0,0005$ mg.

Tous les poids des graines des autres génotypes ont un poids significativement inférieur à celui du sauvage (Figure 10C).

Poids de 1000 graines : Génotypes toutes les années confondues :

Le poids de 1000 graines de type Col_0 est de $0,0180 \pm 0,0027$ mg. Les simples et double mutants, OE68-1, OE68-2 et OE112-1 ne sont pas statistiquement différents du poids des graines Col_0. Le poids des graines de type OE 112-1 est significativement supérieur au poids des graines de type sauvage (Figure 10D).

Discussion des résultats de la manipulation des poids de 1000 graines :

On peut expliquer la différence du poids entre les graines sauvages pour de la récolte 2009 par rapport à celles des récoltes de 2010 et 2013 par le fait que pour la récolte de 2009 la conditions de culture fut différente (production de graines à Uméa en Suède, et celles de 2010 et 2013 à Versailles). Il semblerait donc que les lignées étudiées soient sensibles à différents environnement. Globalement le sur-expresser OE112-1 se distingue des autres génotypes par son poids de 1000 graines supérieurs.

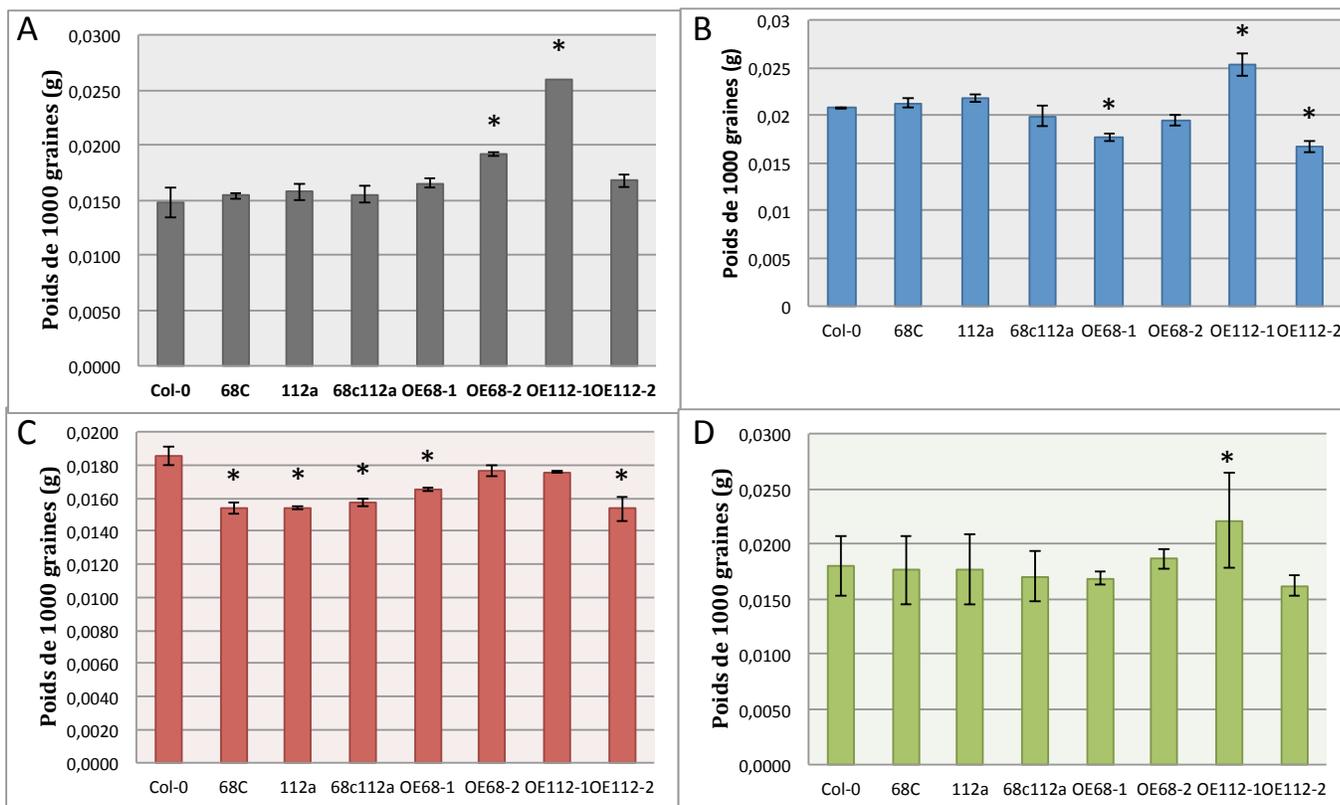


Figure 10 : Poids de 1000 graines pour 8 génotypes, sur trois années (A: série de 2009, B: série de 2010, C: série de 2013), D: pour les trois années confondues. Les mesures ont été faites sur les génotypes suivants : Col_0, *bHLH68c* et *bHLH112a*, *bHLH68cbHLH112a*, OE68-1, OE 68-2, OE112-1 et OE 112-2. Un test t de Student a été utilisé pour confirmer que les différences observées entre le sauvage et les lignées mutantes étaient significatives (*). Les valeurs représentent les moyennes \pm SD.

4.3 Ratios C sur N :

Moyenne du pourcentage en carbone :

Série 2009 : Le pourcentage de carbone dans les graines de type Col_0 est de $52,68 \pm 0,13\%$. Les simples, double mutants et OE68-1 ne sont pas statistiquement différents. OE68-2, OE112-1, OE112-2 sont significativement supérieurs au sauvage (Figure 11A).

Série 2010: Le pourcentage de carbone dans une graine de type sauvage est de $54,35 \pm 1,5767\%$. Les autres génotypes ne sont pas statistiquement différents (Figure 11B).

Série 2013 : Les graines Col_0 contiennent $54,82 \pm 0,1827\%$ de carbone. Tous les autres génotypes sont significativement supérieurs à Col_0 (Figure 11C).

Pour les trois années : Le pourcentage de carbone chez Col_0 est à $54 \pm 1,1611\%$. Les autres génotypes ne sont pas statistiquement différents (Figure 11D).

Moyenne du pourcentage en azote :

Série 2009 : Les graines de type Col_0 contiennent $4,67 \pm 0,1103\%$ d'azote. Les quantités d'azote pour les graines de type 68c et 112a et double mutant ne sont pas statistiquement différentes du sauvage. Les sur-expressseurs sont significativement inférieurs à Col_0 (Figure 12A).

Série 2010: Les graines de type Col_0 contiennent $3,45 \pm 0,0084\%$ d'azote. Les graines de type 112a et double mutant ne sont pas statistiquement différents. Les taux d'azote chez 68c et les sur-expressseurs sont significativement supérieurs à celui de Col_0 (Figure 12B).

Série 2013 : Le taux d'azote dans les graines Col_0 est de $4,02 \pm 0,0201\%$. Les autres génotypes sont tous significativement supérieurs à Col_0 (Figure 12C).

Pour les trois années : Les graines de type sauvage contiennent $4,11 \pm 0,4822\%$. Les autres génotypes ne sont pas statistiquement différents (Figure 12D).

Discussion des résultats de la manip ratios C sur N :

Le pourcentage de carbone dans les surexpressseurs des gènes *bHLH68* et *bHLH112* pour les graines des années 2009 et 2013 est supérieur par rapport à celui des graines WT.

Le pourcentage d'azote dans les graines de type surexpressseurs chez les graines 2010 et 2013 est supérieur par rapport au pourcentage des graines WT.

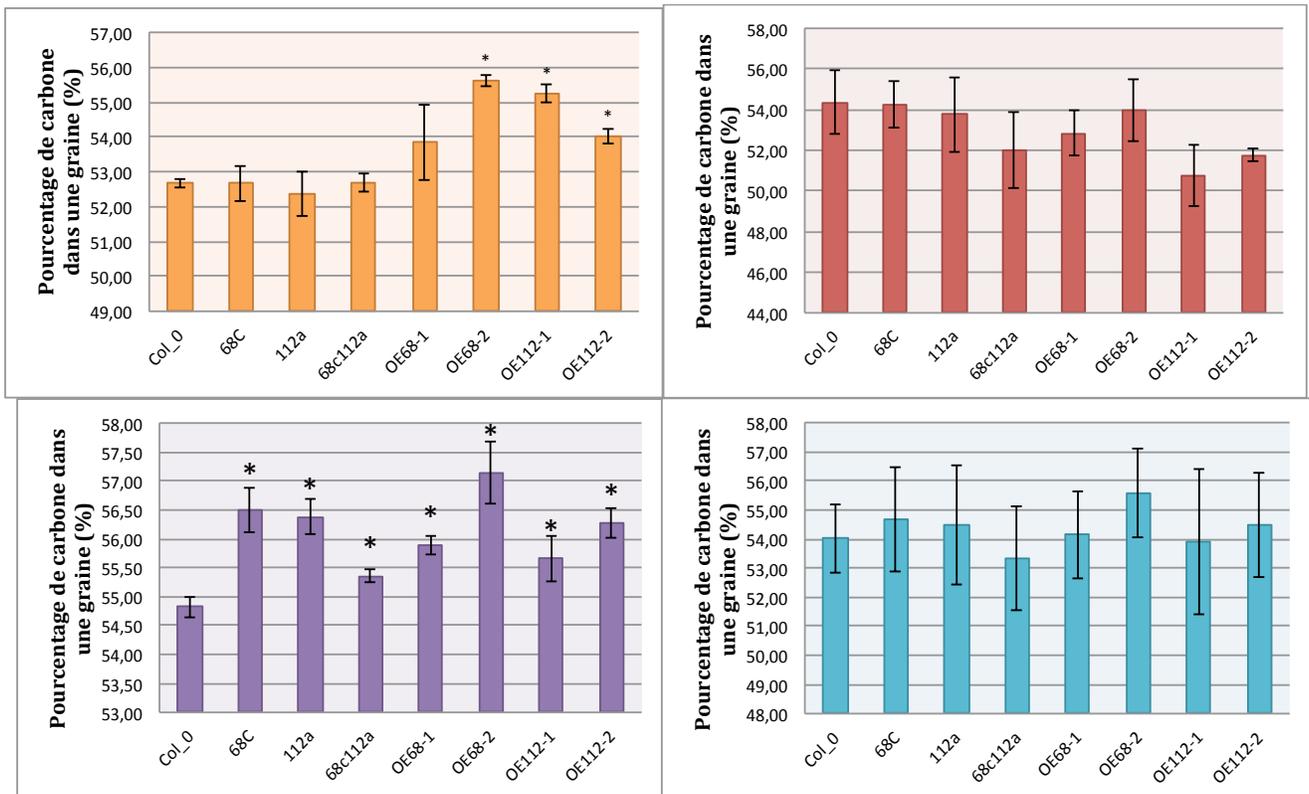


Figure 11: Moyenne des pourcentages de carbone dans une graine, pour 3 années (A: série de 2009, B: série de 2010, C: série de 2013), D: moyennes pour les trois années confondues. Les mesures ont été faites sur les génotypes suivants : Col_0, *bHLH68c* et *bHLH112a*, *bHLH68cbHLH112a*, OE68-1, OE 68-2, OE112-1 et OE 112-2. Un test t de Student a été utilisé pour confirmer que les différences observées entre le sauvage et les lignées mutantes étaient significatives (*)

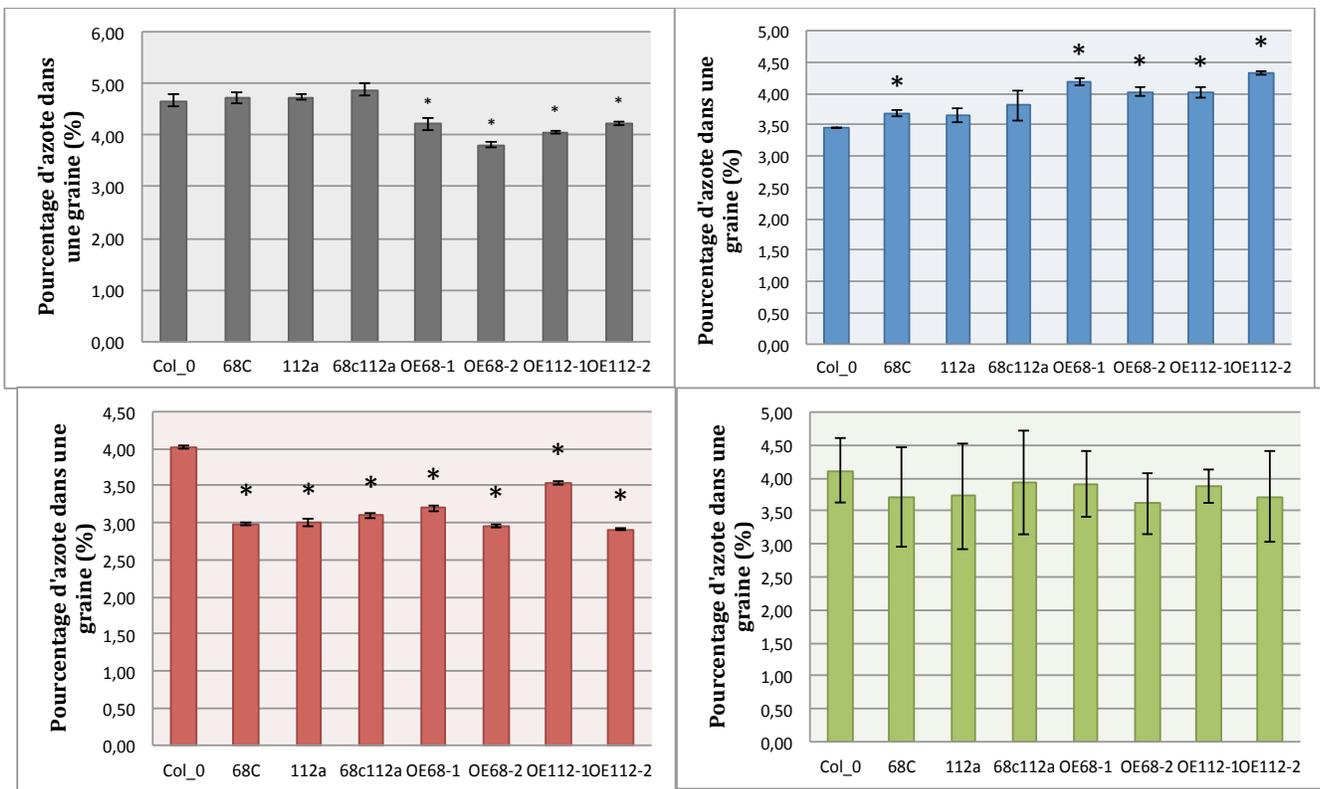


Figure 12: moyenne des pourcentages d'azote dans une graine, pour 3 années (A: série de 2009, B: série de 2010, C: série de 2013), D: moyennes pour les trois années confondues. Les mesures ont été faites sur les génotypes suivants : Col_0, *bHLH68c* et *bHLH112a*, *bHLH68cbHLH112a*, OE68-1, OE 68-2, OE112-1 et OE 112-2. Un test t de Student a été utilisé pour confirmer que les différences observées entre le sauvage et les lignées mutantes étaient significatives (*).

4.4 Test Gus :

On effectue deux choses : après la construction des lignées *prombHLH68::GUS* et *prombHLH112::GUS* on regarde la visualisation des gènes construits là où ils sont exprimés, c'est-à-dire là où l'enzyme la bêta-glucuronidase a été dégradée. Deux conditions sont faites : en milieu témoin (milieu Arabidopsis+EtOH), et en condition avec de l'acide abscissique (milieu Arabidopsis+ABA). Ensuite sur d'autres plantes qui ont été semées par le même protocole en vitro seront utilisées pour la quantification (Figure 13).

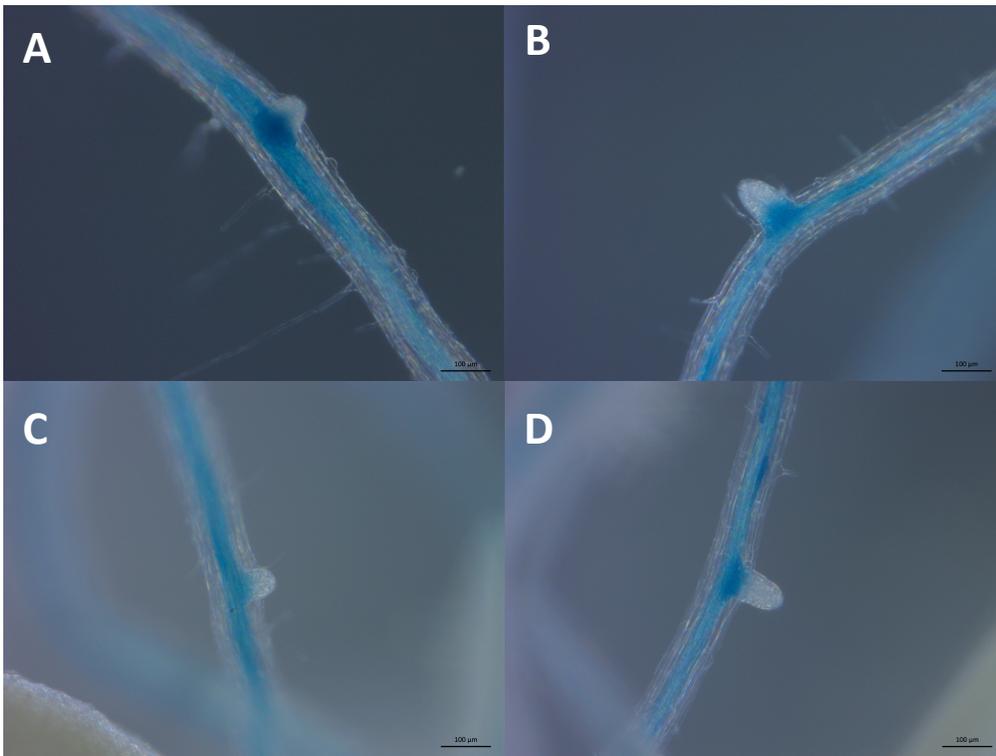


Figure 13 : Observation de primordia de racines latérales au macroscope des lignées GUS. A : *prombHLH68 ::GUS-ABA*, B: *prombHLH68 ::GUS+ABA*, C:*prombHLH112 ::GUS-ABA*, D:*prombHLH112 ::GUS+ABA*.

Discussion des résultats du test GUS :

On observe bien la présence du promoteur des gènes *bHLH68* et *bHLH112* au niveau des tissus vasculaire ainsi qu'à la base des racines latérales (Figures 13B et 13D). A ce stade aucune augmentation ou diminution de l'intensité de la coloration GUS n'est observée en présence d'ABA par rapport à la condition sans ABA. Cependant cela ne signifie pas que les promoteurs des gènes *bHLH68* et *bHLH112* ne sont pas activés en présence d'ABA. En effet l'utilisation histochimique de la coloration GUS ne permet pas toujours de quantifier l'intensité de l'activité du promoteur. Une expérience de cinétique d'accumulation de l'expression du gène *GUS* devrait permettre de répondre.

4.5 Sécheresse :

Des graines des 8 génotypes Col_0, simples et double mutants, et sur-expresssurs ont été semés en deux réplicats. Dans une barquette 12 graines sont semées. Les graines ont été préalablement vernalisées, ce qui permet aux plantes de pousser au même rythme, ceci afin qu'elles aient le même stade de développement. Pour la moitié des plateaux, l'arrêt de l'arrosage se fait 3^{ème} semaine après le semis et les plantes sont observées au bout de 5 semaines après le semis (Figure 14).

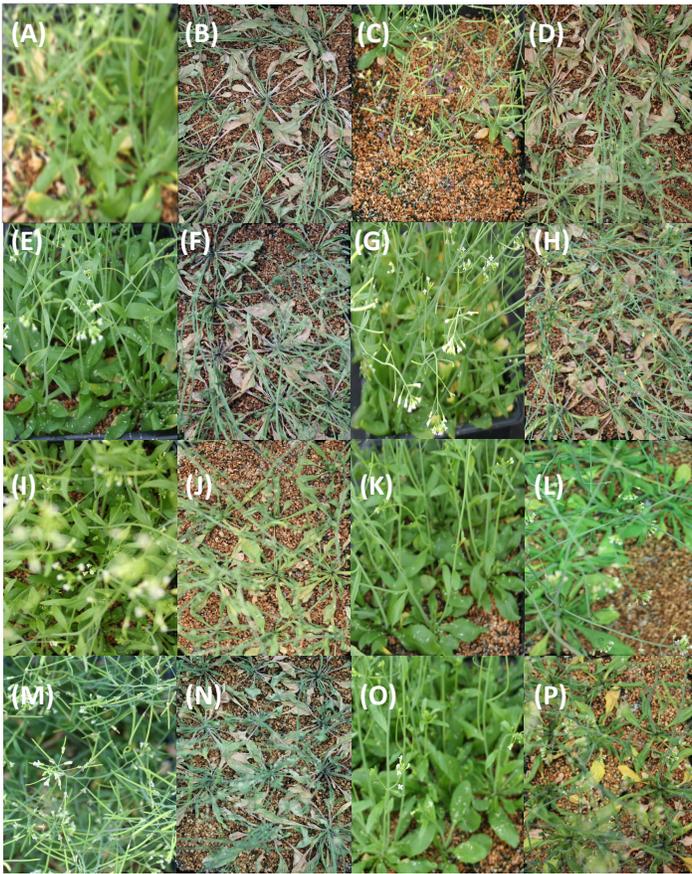


Figure 14 : Observations des plantes après 5 semaines de culture en serre, en conditions d'arrosage normal (A, C, E, G, I, K, M and O) ou après 2 semaines de sécheresse (arrêt d'arrosage) (B, D, F, H, J, L, N and P). (A, B): Col_0, (C, D): *bhlh68c* avec arrosage, (E, F): *bhlh112a*, (G, H): *bhlh68cbhlh112a*, (I, J) : *OE68-1*, (K, L) : *OE68-2*, (M, N): *OE112-1*, (O, P) : *OE112-2*.

Discussion des résultats de la manipulation sécheresse :

Après 2 semaines d'arrêt de l'arrosage, nous observons que les graines de génotype sauvage (Figure 14B), des simples et double mutants (Figure 14D, E, H) ne résistent pas à la sécheresse et meurent. En revanche les sur-expressseurs (Figure 14J, L, N, P) présentent une résistance à la sécheresse avec des feuilles plus vertes. Ces résultats semblent donc confirmer ce qui avait précédemment obtenu.

4.6 Autres expériences :

Au cours de mon stage, du matériel a également été généré afin de réaliser des dosages de la quantité d'ABA endogène des différents génotypes. Ainsi, les parties aériennes et racinaires ont été prélevées séparément sur des plantules *in vitro* de 10 jours des génotypes sauvages (WT), des simples mutants *bHLH68c* et *bHLH112a*, du double mutant *bHLH68c112a* et des lignées sur-exprimant les gènes *bHLH68* et *bHLH112*. Les échantillons ont été placés dans l'azote liquide et envoyés à l'UPSC (Umea Plant Science Center) où ils sont en cours de traitement par le Pr T. MORITZ, collaborateur de l'équipe.

De plus, au cours de ma période de stage, j'ai été amené à participer à d'autres projets. Ainsi, j'ai pu participer au projet sur les transporteurs de la sous-famille des ABCG en faisant du semis en serre, et du tuteurage. De même j'ai participé au projet sur les transporteurs de sucres de la famille des SWEET en faisant des prélèvements de feuilles, de la récolte d'échantillons de sève du phloème et du xylème, ainsi que des récoltes de graines et une initiation à la PCR de génotypage.

Au cours de mon stage j'ai ainsi pu découvrir que les qualités nécessaires pour un travail de technicien de recherche, sont tout d'abord l'adaptabilité, l'organisation, et la rigueur ; à cela s'ajoute la patience pour pouvoir répéter plusieurs fois une expérience.

5. Conclusion-Perspectives :

Au cours de ce projet, j'ai majoritairement participé à la caractérisation phénotypique des lignées dérégulées dans l'expression des gènes *bHLH68* et *bHLH112*. Ces gènes sont préférentiellement exprimés dans le phloème, chez la plante *Arabidopsis thaliana*. Différentes expériences ont donc été menées, en mesurant la taille des hypocotyles en conditions de lumière et d'obscurité, en observant les ratios C/N et la mesure du poids de 1000 graines. Ensuite nous avons étudié si l'activité des promoteurs de *bHLH68* et *bHLH112* était modifiée ou non en présence d'ABA. Nous avons également étudié le comportement des lignées mutantes et surexpresses face à la sécheresse. Ces observations ont permis de confirmer certaines des résultats obtenus précédemment dans l'équipe mais également d'approfondir le phénotype de ces lignées en montrant notamment des modifications de la composition des graines des différentes lignées ainsi que des défauts de croissance des hypocotyles à la lumière et également à l'obscurité. Ces résultats vont permettre d'ouvrir de nouvelles pistes d'études afin de mieux comprendre le rôle de ces gènes au cours du développement chez *Arabidopsis thaliana*. Ainsi, parmi les perspectives de ce stage l'étude d'autres paramètres sur les graines (dosage d'autres hormones), et du comportement des plantules dans d'autres conditions (quantité d'azote, salinité) seront envisagés.

Bibliographie :

Articles :

Toledo-Ortiz, G., Huq, E. and Quail P. (2003) The Arabidopsis Basic/Helix-Loop-Helix Transcription Factor Family. *The plant cell*, **15**, 1749-1770.

Lucas, W., Groover, A., Lichtenberger, R., Furuta, K., Yadav, S., Helariutta, Y., He, X., Fukuda, H., Kang, J., Brady, S., Patrick, J., Sperry, J., Yoshida, A., Lopez-Millan, A., Grusak, M. and Kachroo, P. (2013) The Plant Vascular System: Evolution, Development and Functions. *Journal of integrative Plant Biology*, **55**, 294-388.

Li, H., Sun, J., Xu, Y., Jiang, H., Wu, X. and Li, C. (2007) The BHLH-type transcription factor AtAIB positively regulates ABA response in Arabidopsis. *Plant Mol Bio*, **65**, 655-665.

Kim, J. and Kim, H. (2006) Molecular characterization of a bHLH transcription factor involved in Arabidopsis abscisic acid-mediated response. *Biochimica et Biophysica Acta* 1759, 191-194.

Massari, M. and Murre, C. (2000) Helix-Loop-Helix Proteins: Regulators of Transcription in Eucaryotic Organisms. *Molecular and cellular biology*, **20**, 429-440.

Pires, N. and Dolan, L. (2010) Origin and Diversification of Basic-Helix-Loop Proteins in Plants. *Mol. Biol. Evol*, **27**, 862-874.

Ouvrage :

Physiologie végétale, Tome 2. Développement, R. Heller

Sites internet :

<http://www.versailles-grignon.inra.fr/Le-Centre-et-les-recherches/Presentation/Implantation>)

<http://www.versailles-grignon.inra.fr/Le-Centre-et-les-recherches/Unite>

<http://www.arabidopsis.org/portals/education/aboutarabidopsis.jsp>