



HAL
open science

Rôle des thiorédoxines et glutarédoxines ainsi que de certains gènes impliqués dans leur régulation chez *Arabidopsis thaliana* dans la réponse à l'inoculation par *Phyllobacterium brassicacearum*

Laurie Amenc

► To cite this version:

Laurie Amenc. Rôle des thiorédoxines et glutarédoxines ainsi que de certains gènes impliqués dans leur régulation chez *Arabidopsis thaliana* dans la réponse à l'inoculation par *Phyllobacterium brassicacearum*. *Biologie végétale*. 2007. hal-02816919

HAL Id: hal-02816919

<https://hal.inrae.fr/hal-02816919v1>

Submitted on 6 Jun 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.

*Rôle des thioredoxines et glutaredoxines ainsi que de certains
gènes impliqués dans leur régulation chez Arabidopsis
thaliana dans la réponse à l'inoculation par Phyllobacterium
brassicacearum*

Présenté le 06 JUILLET 2007

Encadrement : Fabrice Varoquaux (fabrice.varoquaux@univ-montp2.fr)

*UMR 113 LSTM (Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes) - équipe RPM
(Réponses des Plantes aux Microorganismes) /UMII/CIRAD/INRA/IRD/AGRO M.*

Abréviations:

ACCCase : Acétyl-CoA carboxylase
ADP : Adénosine DiPhosphate
AGPas : ADPglucose pyrophosphorylase
ADN / DNA : acide désoxyribonucléique
ADNc / cDNA : acide désoxyribonucléique complémentaire
ADNg : ADN génomique
ADN-T : ADN de transfert
ANR : Agence Nationale pour la recherche
ARN : acide ribonucléique
ARNm : ARN messenger
CATMA: Complet Arabidopsis Transcriptome MicroArray
CoA : Coenzyme A
Col-0 : *Arabidopsis thaliana*, écotype Columbia 0
CTAB : hexadecyl trimethyl-ammonium bromide
DEPC : diethyl Pyrocarbonate
dNTP : désoxynucléotides
DO : densité optique
E' : milieu de culture de *Phyllobacterium* STM 196
EDTA : acide éthylène-diamine-tétra- acétique
FAD : flavine adénine dinucléotide
FBP : fructose-1,6 biphosphate
FTR : ferrédoxine-thiorédoxine réductase
GOGAT : Glutamine OxoGlotarate AminoTransférerase
GRX : glutarédoxine
GS : glutathion synthase
GSA : Glutamine Amylcystéine synthase
GSH/GSSG : glutathion réduit/ oxydé
GST : glutathion S-transférerase
NADPH/NAD⁺ : Nicotiamide Adénine Dinucléotide réduit/oxydé
NTR : NADPH-thiorédoxine réductase
Q-RT-PCR : RT-PCR quantitative
PGPB : Plant Growth Promoting Bacteria
PCR : Polymerase Chain Reaction réaction de polymérisation en chaine
PRX : peroxyredoxine
RPM : rotation par minute
RT-PCR : Reverse transcriptase - Polymerase chain reaction
STM196: *Phyllobacterium brassicacearum* STM196
TRX : thiorédoxine
WS : *Arabidopsis thaliana*, écotype Wassilewskija

Remerciements

Je remercie Fabrice pour son aide, son attention, ses conseils. Pour tout. Merci à Guilhem pour ses conseils avisés. Merci à Bruno pour son soutien.

Merci à Céline, Cécile, Florie, Hélène, Lydia, Mado et Marc pour l'ambiance si particulière et chaleureuse du labo. Pour leur aide et soutien aussi.

Je tiens à remercier Benoît, Claude et Jean Jacques pour m'avoir donné l'opportunité de faire cette formation.

Merci à Marie-violaine.

Un merci très particulier à Nadège, aux escargots et au barbotage.

Merci enfin au Soldat Rose et à Calogéro, Mylène et Roch.

Sommaire

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | Introduction | 1 |
| 1.1 | Effets des PGPB (Plant Growth Promoting Bacteria) sur les plantes | 1 |
| 1.2 | <i>Arabidopsis thaliana</i> / <i>Phyllobacterium</i> STM196 : le modèle d'étude de l'équipe « Réponses des Plantes aux microorganismes » | 1 |
| 1.3 | Les régulations par oxydo-réduction pourraient être importantes dans la réponse des plantes aux PGPB | 2 |
| 1.4 | Objectifs du stage | 4 |
| 2 | Résultats | 5 |
| 2.1 | Analyse de l'expression des gènes impliqués dans le statut rédox par RT-PCR quantitative dans des plantules d' <i>A.thaliana</i> , 7 jours après inoculation par <i>Phyllobacterium</i> STM 196 | 5 |
| 2.1.1 | Recherche de gènes surexprimés dans les plantes inoculées dans les données CATMA | 5 |
| 2.1.2 | Validation des résultats CATMA | 5 |
| 2.1.3 | Expression des gènes candidats dans les racines 7 jours après inoculation | 6 |
| 2.1.4 | Cinétique d'expression des gènes impliqués dans le statut rédox, entre 30 minutes et 24 heures après inoculation | 6 |
| 2.1.5 | Niveau d'expression des gènes candidats au cours d'une journée sans inoculation | 6 |
| 2.1.6 | Niveau d'expression des gènes candidats au cours d'une journée avec inoculation | 7 |
| 2.2 | Caractérisation phénotypique | 7 |
| 2.2.1 | Caractérisation phénotypique des lignées <i>cad2</i> ; <i>ntra-ntrb</i> ; <i>trx h</i> ($\Delta 1,2,3,5$) .. | 7 |
| 2.2.2 | Impact des mutations <i>cad2</i> ; <i>ntra-ntrb</i> ; <i>trx h</i> ($\Delta 1,2,3,5$) dans la réponse d' <i>Arabidopsis</i> à l'inoculation | 9 |
| 3 | Discussion | 11 |
| 3.1 | Apport de notre phénotypage à la compréhension du rôle des thiorédoxines et glutarédoxines dans les plantes | 11 |
| 3.2 | Les voies des thiorédoxines et des glutarédoxines sont impliquées dans la réponse d' <i>Arabidopsis</i> à <i>Phyllobacterium</i> | 12 |
| 4 | Matériel et méthodes | 13 |
| 4.1 | Matériel biologique | 13 |
| 4.1.1 | <i>Arabidopsis thaliana</i> | 13 |
| 4.1.2 | <i>Phyllobacterium</i> STM196 : | 14 |
| 4.2 | Méthode | 14 |
| 4.2.1 | Caractérisation phénotypique | 14 |
| 4.2.2 | RT-PCR quantitative | 15 |
| 4.2.3 | Analyse statistique | 15 |

1 Introduction

1.1 Effets des PGPB (Plant Growth Promoting Bacteria) sur les plantes

Les PGPB sont des bactéries qui ont des effets positifs sur les plantes avec lesquelles elles s'associent. Lors de ces interactions, On observe une stimulation du développement des organes végétatifs des plantes à graines ainsi qu'une induction de la résistance aux pathogènes et aux stress abiotiques.

La stimulation de la croissance de l'appareil aérien, *via* une augmentation de la surface totale des feuilles, de leur biomasse et d'une précocité de l'émergence des pointes foliaires, aboutit dans certains cas à une augmentation du rendement grainier (Berge *et al.*, 1990). L'inoculation par des PGPB provoque des changements marqués de l'architecture racinaire tel que l'augmentation de la longueur des racines latérales (Mantelin et Touraine, 2004). Cette modification morphologique est accompagnée d'un accroissement de la densité et de la longueur des poils absorbants ainsi que d'une modification de leur rythme de croissance. Ces transformations morphologiques aboutissent toutes à une plus grande surface d'échange entre les racines et le sol, ce qui pourrait conduire à l'augmentation du prélèvement des nutriments. Cette hypothèse est communément proposée pour expliquer les effets bénéfiques des PGPB sur la croissance des plantes. L'amélioration de la nutrition minérale peut ainsi expliquer la stimulation de la croissance des plantes. Les modifications morphologiques consécutives à l'inoculation de la plante par une PGPB sont donc susceptibles d'expliquer, au moins en partie, les effets bénéfiques des PGPB sur la croissance des plantes (Mantelin et Touraine, 2004).

1.2 *Arabidopsis thaliana* / *Phyllobacterium* STM196 : le modèle d'étude de l'équipe « Réponses des Plantes aux microorganismes »

L'équipe « Réponses des plantes aux microorganismes » dirigée par Bruno Touraine s'intéresse particulièrement à *Phyllobacterium* STM196, une PGPB efficace sur le colza (*Brassica napus*) mais aussi sur l'Arabette (*Arabidopsis thaliana*) (Mantelin *et al.*, 2006). Le génome de l'Arabette est entièrement séquencé et de très nombreux outils permettant des approches de génomique fonctionnelle sont disponibles.

Phyllobacterium STM196 appartient à la famille des *Phyllobacteriaceae*, ordre des *Rhizobiales* dans la classe des α -Protéobactéries. L'organisation génomique du genre *Phyllobacterium* est différente des autres genres de *Rhizobia* ; elle consiste en un seul chromosome et en quatre méga plasmides pour une taille totale de 5330 kb (Jumas-Bilak *et al.*, 1998 ; Moreno, 1998). Ce génome, malgré sa taille réduite, n'a pas encore été séquencé. Bien que le genre *Phyllobacterium* ait été peu étudié, il apparaît clairement comme un genre fréquemment associé aux plantes. Certaines souches de *Phyllobacterium* fixent librement l'azote atmosphérique de l'air mais, en dehors des souches isolées par notre équipe et par Chanway (1998), peu ont une action positive sur la croissance des plantes.

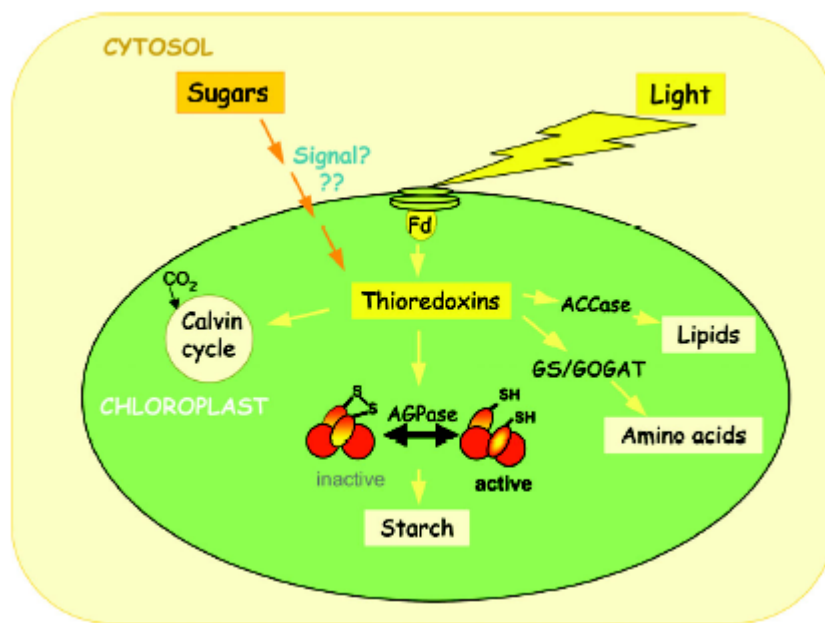


Figure 1 : Rôle des thiorédoxines sur les différents métabolismes chloroplastiques.
 Fd = Ferredoxine, AGPase = ADPglucose pyrophosphorylase, ACCase = acetyl-CoA carboxylase, GS = Glutamine Synthase, GOGAT = Glutamine oxoglutarate aminotransferase. D'après Geigenberger *et al.*, 2005.

La souche *Phyllobacterium* STM196, isolée de la rhizosphère du colza (*Brassica napus*) est une PGPB très efficace (Larcher *et al.*, 2003). Elle induit une augmentation de 66% du poids sec de l'appareil aérien et de 52% du poids sec du système racinaire après 15 jours d'inoculation en tubes d'attapulgite. Cette souche stimule l'absorption du nitrate par le colza : une augmentation de 56% de la quantité totale d'azote absorbée est observée dans des plantules de colza inoculées (Larcher, 2002).

Le groupe de Bruno Touraine utilise le système biologique modèle *A. thaliana* / *Phyllobacterium* comme outil pour essayer de comprendre quelles sont les réponses moléculaires mises en place par la plante en réaction à la bactérie expliquant les effets bénéfiques sur sa croissance. Dans une première étape, l'équipe a abordé l'impact de *Phyllobacterium* sur le métabolisme azoté. Ce choix se justifie par le fait que l'azote est un nutriment souvent limitant pour la croissance des plantes et que la régulation de ce métabolisme affecte le développement racinaire. Classiquement, le développement racinaire d'*A. thaliana* est réprimé par des fortes concentrations en azote. L'inoculation par *Phyllobacterium* atténue fortement cette répression. Il en résulte que le développement racinaire des plantes cultivées en présence de fortes concentrations d'azote est plus important lorsque les plantes sont inoculées. Cette observation indique que la voie de signalisation impliquée dans l'interaction avec *Phyllobacterium* affecte également la régulation azote dépendante du développement racinaire.

D'autres mécanismes pourraient être impliqués dans l'action bénéfique de *Phyllobacterium* STM196 sur le colza et l'Arabette. Par exemple, *Phyllobacterium* pourrait avoir une action sur la croissance des racines via l'amélioration de la nutrition phosphatée (Mantelin *et al.*, 2006). *Phyllobacterium* pourrait aussi, en réponse aux exsudats racinaires, excréter des substances capables de modifier la production d'hormones par la plante (par exemple, l'auxine), du tréhalose ou des molécules similaires à des facteurs nuds (Douay, 2007).

Bien que l'équipe continue de développer chacune de ces pistes, le développement d'approches massives telles que des analyses de transcriptomes (puces CATMA) a permis de dégager d'autres voies métaboliques potentiellement modifiées par l'inoculation par *Phyllobacterium*. L'équipe souhaite ainsi étudier l'implication des thiorédoxines et des glutarédoxines de plantes (ainsi que de leurs protéines régulatrices) dans l'interaction *Phyllobacterium* / *Arabidopsis*.

1.3 Les régulations par oxydo-réduction pourraient être importantes dans la réponse des plantes aux PGPB

L'amélioration de croissance de la plante par la PGPB nécessite un changement en profondeur du métabolisme carboné mettant en jeu des régulations multiples conduisant à la modification de l'activité de nombreuses enzymes (Tasselli, 2007). Chez les plantes, un mode de régulation important consiste en l'activation des enzymes par réduction (Figure 1). Des enzymes clés des voies aussi différentes que le cycle de Calvin, la synthèse d'amidon, l'assimilation de l'ammonium ou la biosynthèse d'acides gras (Geigenberger *et al.*, 2005) sont modifiées de cette manière. Le large spectre des modifications induites par une PGPB pourrait être couvert par une simple modification du système rédox. Il est ainsi envisageable que les modifications observées dans la nutrition azotée chez *A. thaliana* inoculée par *Phyllobacterium* soient dues à des modifications du statut rédox qui à son tour régulerait l'activité d'enzymes clés dans l'assimilation de l'ammonium comme la GS (Glutamine Synthase) ou la GOGAT (Glutamate Synthase) (Figure 2).

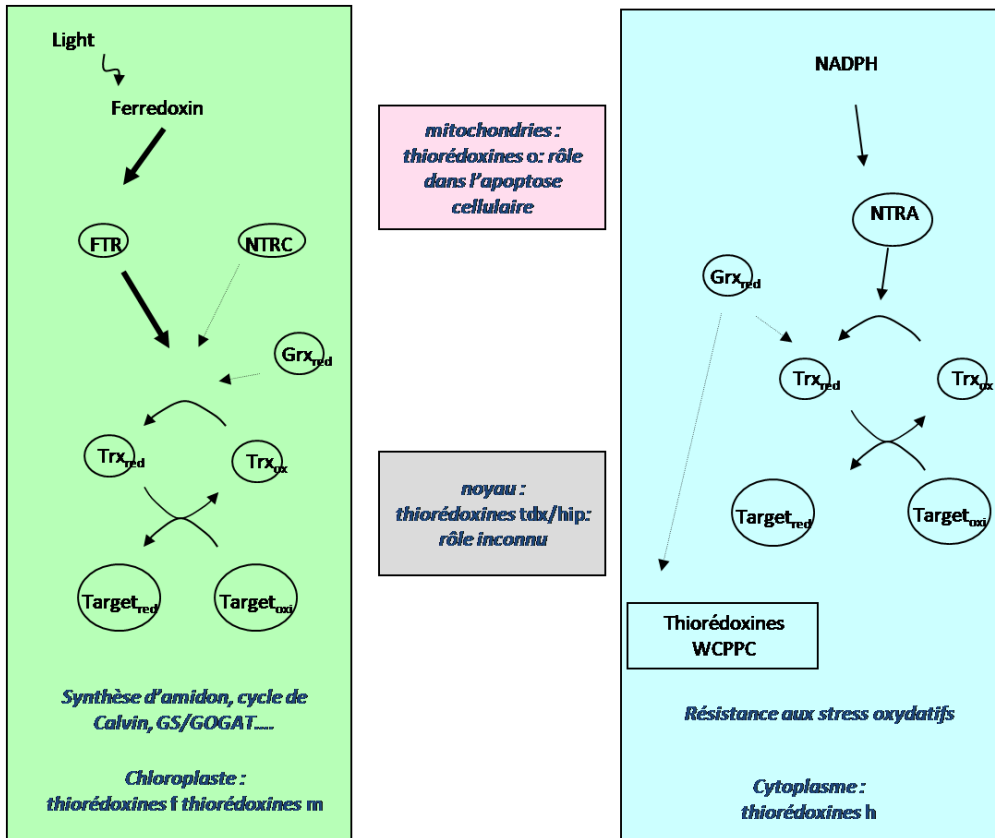


Figure 2 Régulation de l'activation d'enzymes par les thioredoxines. FTR =Ferredoxine-thioredoxine réductase, GR =Glutathion réductase, GSH/GSSG =Glutathion réduit/oxydé, Grx=glutarédoxine, NTR =thioredoxine réductase, Trx =thioredoxine. D'après Gelhaye et al., 2005

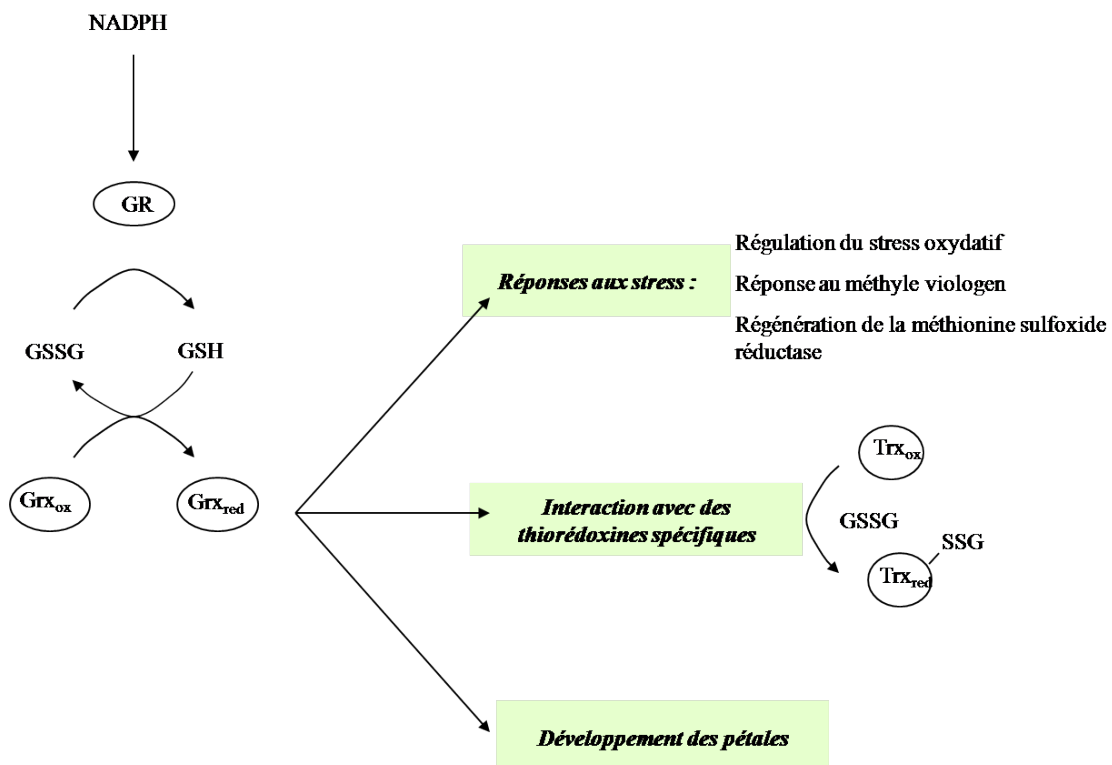


Figure 3 : Mécanisme et cibles des glutarédoxines chez la plante. D'après Gelhaye et al., 2005.

Une autre indication de l'implication du statut rédox dans l'interaction plante/bactérie est que lorsque les *A. thaliana* croissent *in vitro* sur un milieu non supplémenté en sucre, les portions de racines issues d'une croissance nocturne se révèlent quasiment imberbes alors que celles produites durant une période diurne présentent de nombreux poils bien développés. Les poils racinaires poussent par alternance. Après inoculation par *Phyllobacterium* STM196, les poils poussent aussi bien la nuit que le jour : le phénomène d'alternance est ainsi supprimé (Desbrosses, communication personnelle). Le fait que l'état rédox des cellules au cours d'une journée évolue et que l'application de glutathion exogène (molécule réductrice) stimulent la croissance du poil (Sanchez-Fernandez *et al.*, 1997) pose naturellement la question du contrôle de l'allongement des poils racinaires ainsi que l'alternance nyctéméral via le système rédox. Des expériences d'analyse de promoteur fusionné au gène rapporteur GUS montrent clairement que certains gènes codant des thiorédoxines *h* cytosoliques sont fortement exprimés dans les poils racinaires (Reichheld *et al.*, 2002), cellules très sensibles et réactives à la présence de bactéries. La transcription du gène codant la thiorédoxine cytosolique *h 5* est stimulée par la présence de bactéries (Laloi *et al.*, 2004) confortant l'hypothèse d'une influence bactérienne. D'autre part, des données d'analyse d'expression de gènes justifient que l'équipe s'intéresse au rôle du statut rédox. La comparaison de transcriptomes entre *Arabidopsis* témoins et *Arabidopsis* inoculées par *Phyllobacterium* STM196 ou d'autres bactéries montre clairement une modification d'expression de gènes impliqués dans le maintien du statut rédox.

Les thiorédoxines (TRX) et les glutarédoxines (GRX) sont des protéines aux fonctions multiples codés par des grandes familles multi-géniques capables de modifier l'activité des enzymes en ouvrant des ponts disulfures. Ce changement de conformation permet ainsi l'activation ou l'inactivation de celles-ci (Meyer *et al.*, 1999). Un autre rôle des TRX et GRX est de fournir du pouvoir réducteur à des enzymes tel que les PAPS Réductases (Meyer *et al.*, 1999).

Les thiorédoxines sont présentes chez tous les organismes. Chez *Arabidopsis thaliana*, il existe une petite quarantaine de thiorédoxines. Certaines sont nucléaires ou mitochondriales mais la majorité d'entre elles sont cytoplasmiques ou chloroplastiques (Figure 2). Différentes voies permettant la réduction des thiorédoxines coexistent chez les plantes. (Meyer *et al.*, 1999, 2005). Elles font intervenir les systèmes ferrédoxines-thiorédoxines réductases (chloroplaste), des thiorédoxines réductases (cytoplasmique et chloroplaste). Le nombre de gènes codant les enzymes en charge de la réduction des thiorédoxines est beaucoup plus réduit : il n'existe par exemple que 2 gènes de thiorédoxines réductases cytosoliques (*NTRA* et *NTRB*). Les thiorédoxines participent à la lutte contre le stress oxydatif. Les thiorédoxines chloroplastiques sont impliquées dans le contrôle de différentes voies métaboliques (Figure 1) alors que les thiorédoxines mitochondriales seraient compromises dans la mort cellulaire programmée. Par contre, peu d'indications existent sur le fonctionnement des thiorédoxines cytoplasmiques et nucléaires.

Les glutarédoxines sont directement réduites par le glutathion qui est maintenu à l'état réduit par des glutathion réductases (Figure 3). Les glutarédoxines ont des rôles aussi différents que la lutte contre le stress oxydatif (Compant *et al.*, 2005), la synthèse d'ADN, le développement des pétales ou la régulation du cycle de Calvin. Les glutarédoxines peuvent aussi agir avec les thiorédoxines (figure 4). Il existe pléthore de gènes (plus de quarante) codant les glutarédoxines : celles-ci sont majoritairement chloroplastiques ou cytoplasmiques.

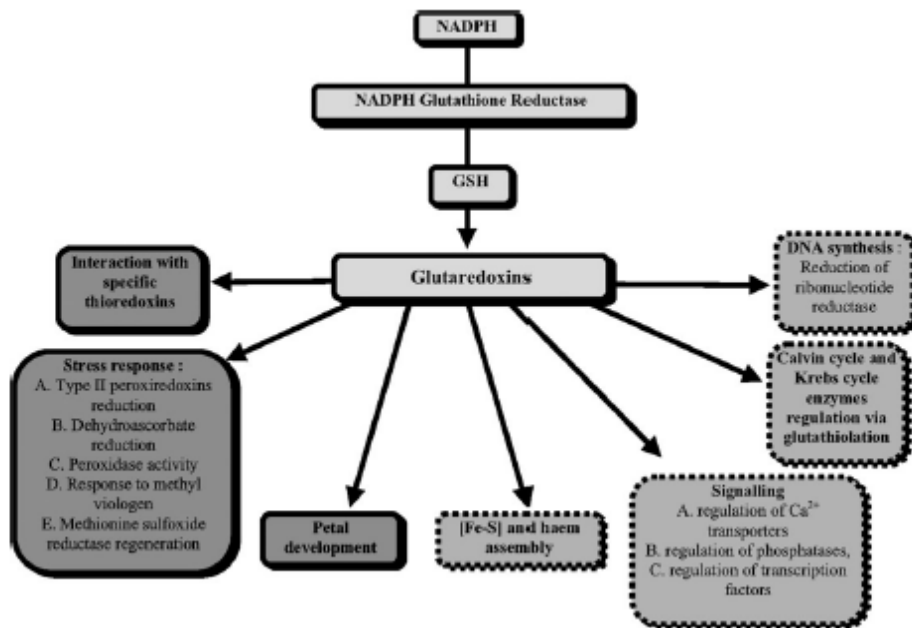


Figure 4 : Rôle des glutarédoxines.

Les glutarédoxines sont directement réduites par le glutathion (GSH). Ce dernier est maintenu à l'état réduit par l'intermédiaire d'une glutathion réductase au prix de la dépense d'une molécule de NADPH. Il existe plus d'une trentaine de glutarédoxine chez *A. thaliana* qui sont majoritairement cytoplasmiques. D'après Rouhier *et al.*, 2006.

La synthèse de glutathion est bien connue et une mutation dans *GSH1*, un des gènes clé de sa biosynthèse, conduit à des plantes avec des teneurs réduite en ce métabolite (mutants *cad2* et *pad2*) (Cobbet *et al.*, 1998).

1.4 Objectifs du stage

Mon premier objectif est d'identifier un certain nombre de candidats parmi les gènes impliqués dans le maintien du statut rédox. La première étape consiste à repérer, dans des expériences de transcriptomique réalisées par l'équipe de Bruno Touraine, des *TRX* et des *GRX* ainsi que des gènes impliqués dans leur régulation, qui sont stimulés ou réprimés dans les feuilles, 7 jours après inoculation. Bien évidemment, les régulations mises en évidence doivent être confirmées par q-RT-PCR dans une seconde étape. Enfin, la caractérisation de l'expression des gènes candidats est poursuivie : nous analyserons ainsi l'expression de ces gènes dans les racines mais aussi dans les temps courts pour savoir si les gènes candidats pourraient intervenir dans les phases précoces de l'interaction entre *Phyllobacterium* STM196 et *Arabidopsis*.

Mon second objectif consiste à essayer de trouver des preuves fonctionnelles de l'implication des thiorédoxines et des glutarédoxines en utilisant des approches de génétique inverse. Un choix des mutants à étudier à été réalisé suivant la disponibilité de mutants déjà bien caractérisés (homozygotes et mono-insertionnel pour chacun des gènes mutés). Tous les mutants nous ont été fournis par Jean Philippe Reichheld du laboratoire « Génome et Développement des Plantes » (UMR5096). *cad2-1* est le premier mutant à avoir été choisi. C'est un mutant dans le gène de la γ -glutamylcystéine synthase (*GSH1*) impliqué dans la première étape de la biosynthèse du glutathion. D'ailleurs, du point de vue biochimique, ce mutant se caractérise par une teneur en glutathion 70% moins importante que le sauvage (Cobbett *et al.*, 1998). L'activation des GRX par le glutathion devrait être très réduite dans ce mutant. Un avantage de ce mutant est qu'il ne présente pas d'anomalies de croissance pourvu qu'il ne soit pas placé sur un milieu contenant du cadmium. Il ne possède donc pas de phénotypes délétères qui pourraient perturber l'observation d'un effet *Phyllobacterium*. L'étude de ce mutant est très intéressante pour essayer de révéler une éventuelle implication des glutarédoxines dans l'interaction.

ntra-ntrb est le second mutant choisi. C'est un double mutant dans les gènes *NTRA* et *NTRAB* dans lequel aucune activation des TRX cytoplasmiques n'est théoriquement possible. L'étude de ce mutant nous permet donc de tester fonctionnellement l'implication des TRX cytoplasmiques dans l'interaction. Enfin nous avons essayer de tester l'importance de certaines thiorédoxines cytoplasmiques TRXh1, TRXh2, TRXh3 et TRXh5 en étudiant le quadruple mutant *trx h* ($\Delta 1,2,3$ et 5). L'étude de ce quadruple mutant est aussi intéressante du fait que l'expression du gène *TRXh5* est stimulée par l'inoculation avec des bactéries.

| | Accession | nom | description | localisation | STM196 (terre <i>in vitro</i>) | STM196 (0,5mM) | STM196 (2mM) | STM196 (10mM) |
|------------------------------|-----------|--------|--|--------------|---------------------------------|----------------|--------------|---------------|
| Thiorédoxine | AT4G04610 | APR1 | Thiorédoxine | PLASTE | OUI | NON | NON | NON |
| | AT1G62180 | APR2 | Thiorédoxine | PLASTE | NON | OUI | NON | NON |
| | AT1G45145 | h5 | Thiorédoxine h | CYTO | OUI | NON | NON | NON |
| Thiorédoxine réductase | AT2G17420 | NTRA | NADPH thiorédoxine réductase | CYTO | OUI | NON | NON | NON |
| | AT2G41680 | NTRC | NADPH thiorédoxine réductase | PLASTE | OUI | NON | NON | NON |
| Glutarédoxines | AT1G03850 | CXXS13 | Glutarédoxine S13 | PLASTE | OUI | OUI | NON | OUI |
| | AT1G28480 | CXXC9 | Glutarédoxine C9 | CYTO | OUI | OUI | NON | NON |
| Glutathion transférase | AT4G02520 | GSTF2 | GST (glutathion transférase) | CYTO | OUI | OUI | OUI | OUI |
| | AT2G02930 | GSTF3 | GST (Glutathion transférase) 16 | CYTO | OUI | NON | NON | NON |
| | AT2G29420 | GSTU7 | GST (Glutathion transférase) 25 | CYTO | OUI | OUI | NON | NON |
| | AT1G69930 | GSTU11 | GST (Glutathion transférase) 11 | CYTO | OUI | OUI | NON | NON |
| | AT1G74590 | GSTU10 | GST (Glutathion transférase) 10 | CYTO | OUI | NON | NON | NON |
| | AT1G78380 | GSTU19 | GST (Glutathion transférase) 8 | CYTO | OUI | NON | NON | NON |
| Glutathion synthase | AT4G23100 | GSH1 | g-glutamylcystéine synthase | PLASTE | OUI | NON | NON | NON |
| Biosynthèse de la vitamine C | AT4G26850 | VTC2 | Gène impliqué dans la biosynthèse de l'ascorbate | ? | OUI | OUI | NON | NON |
| | AT1G04860 | UBI | gène considéré comme ubiquitaire - couramment utilisé dans les analyses d'expression de gène | | | | | |

Tableau 1 : Résultats CATMA sur les thiorédoxines d'*Arabidopsis thaliana*.

Des *Arabidopsis* ont été inoculées par *Phyllobacterium*. 7 jours après inoculation, les plantes sont récoltées et l'ARN extrait. Une analyse transcriptomique est ensuite effectuée à résultat « oui » signifie qu'il existe une sur ou sous expression du gène considéré dans la plante inoculée par rapport au témoin. A résultat « non » signifie que le niveau d'expression du gène considéré est identique entre les plantes inoculées et non inoculées. La localisation cellulaire est aussi précisée : plaste pour chloroplaste et cyto pour cytoplasme.

2 Résultats

2.1 Analyse de l'expression des gènes impliqués dans le statut rédox par RT-PCR quantitative dans des plantules d'*A.thaliana*, 7 jours après inoculation par *Phyllobacterium* STM 196

2.1.1 Recherche de gènes surexprimés dans les plantes inoculées dans les données CATMA

Différentes analyses transcriptomiques ont été réalisées au sein du laboratoire. Dans une première série d'expérience « Phyllo terre », les plantes ont été cultivées en terre (Tableau 1). Dans les trois autres expériences, réalisées dans le cadre du projet ANR ARCOLE, les plantes ont été cultivées *in vitro* sur des concentrations différentes en azote (0,5 mM, 2 mM et 20 mM). Ces puces étant relativement mal annotées, nous avons décidé de partir de revues décrivant des familles multigéniques impliquées dans le statut rédox. Ces revues permettent de récupérer les numéros d'accession de chacun des membres des familles testées. La recherche de surexpression des gènes dans les résultats des quatre expériences de CATMA est ensuite réalisée gène à gène grâce aux numéros d'accession. Nous avons sur les familles multi géniques codant les thiorédoxines (TRX), les NADPH dépendantes Thiorédoxines Réductases (NTR), les Glutarédoxines (GRX), les glutathion transférases (GST) et les γ -glutamylcystéine synthases (GSA). En plus de ces gènes, nous avons sélectionné un gène clé dans la biosynthèse de l'ascorbate (*VTC2*), une molécule importante pour lutter contre les stress oxydatifs. Bien évidemment, il existe d'autres familles de gènes intervenant dans le maintien du statut rédox comme par exemple des familles de peroxydases. Elles ne sont pas prises en compte dans cette étude. Ce travail nous a permis de définir 15 gènes surexprimés dans les feuilles 7 jours après inoculation (Tableau 1). Parmi ces gènes se trouvent 3 thiorédoxines (*APR1*, *APR2* et *TRXh5*), 2 NADPH Dépendantes Thiorédoxines Réductases (*NTRA* et *NTRC*), 1 γ -glutamylcystéine synthase (*GSH1*), 2 glutarédoxines (*CXXS13* et *CXXC9*), 6 Glutathion transférases (*GSTF2*, *GSTF3*, *GST7*, *GSTU10*, *GSTU11*, *GSTU8*) et le gène *VTC2*. Le candidat le plus sérieux est probablement *GSTF2* qui est le seul à montrer une surexpression dans les quatre expériences de CATMA considérées.

2.1.2 Validation des résultats CATMA

Des amorces spécifiques ont été définies pour chacun de ces gènes (tableau2, § 4.2.2.2). Les séquences nucléotidiques présentant un fort degré d'identité, il a fallu faire des alignements de séquence pour trouver les zones divergentes. Avant de faire des q-RT-PCR, les amorces ont été testées sur de l'ADN génomique et des ADNc avec un programme PCR semblable à celui utilisé pour faire des q-RT-PCR. Seules les amorces d'*APR1* ne permettent pas d'obtenir une amplification satisfaisante. Les amorces de *CXXS9*, *CXS13*, *GST7*, *GST10* et *GST8* n'ont pas permis d'obtenir de résultats probant en Q-RT-PCR sur les ADNc testés (données non montrées). Ces amorces pourront être utilisées ultérieurement sur d'autres ADNc afin d'approfondir les résultats obtenus.

Des plantes ont été cultivées *in vitro* sur du milieu contenant 2 mM de nitrate avant d'être transférées sur un milieu inoculé ou non par la bactérie. Les parties aériennes et racinaires sont

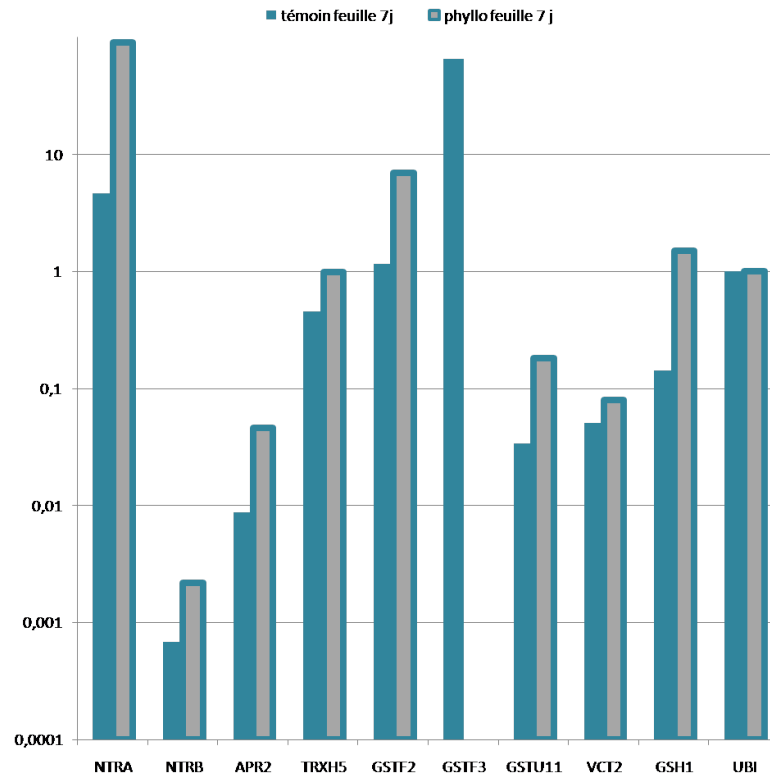


Figure 5 : Résultat de Q-RT-PCR réalisée sur des ADNc de feuilles d'*Arabidopsis thaliana* inoculées ou non par *Phyllobacterium STM196* 7 jours après inoculation. Les niveaux d'expression sont normalisés par rapport au gène constitutif (ubiquitine). *NTRA* et *NTRC* : NADPH Dépendantes Thiorédoxines Réductases, *GSH1* : γ -glutamylcystéine synthase, *GSTF2*, *GSTF3* et *GSTU11* : Glutathion transférases, *VCT2* : biosynthèse de la vitamine C, *UBI* : ubiquitine.

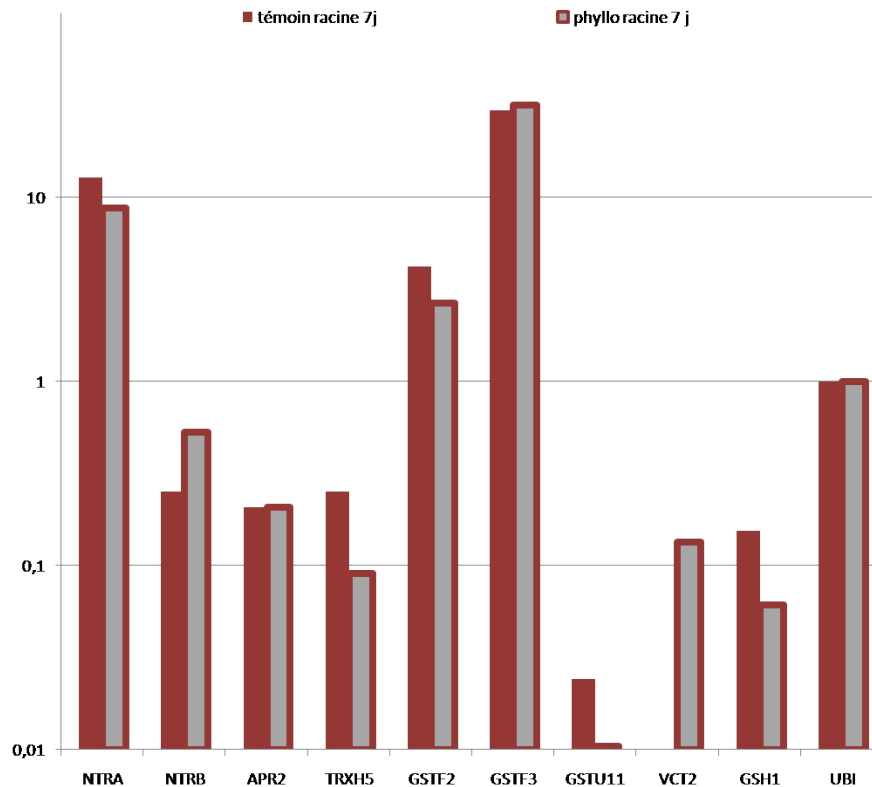


Figure 6 : Résultat de Q-RT-PCR réalisée sur des ADNc de racines d'*Arabidopsis thaliana* inoculées ou non par *Phyllobacterium STM196* 7 jours après inoculation. Les niveaux d'expression sont normalisés par rapport au gène constitutif (ubiquitine) *NTRA* et *NTRC* : NADPH Dépendantes Thiorédoxines Réductases, *GSH1* : γ -glutamylcystéine synthase, *GSTF2*, *GSTF3* et *GSTU11* : Glutathion transférases, *VCT2* : biosynthèse de la vitamine C, *UBI* : ubiquitine.

récoltées 7 jours après inoculation. Des q-RT-PCR ont été réalisées sur des ADNc produits à partir de ce matériel (cf.§4.1.1.2).

Les gènes choisis présentent des niveaux d'expression très variables (Figure 5). *NTRA* et *GSTF3* sont très exprimés puisque le niveau d'accumulation de leur transcrite est supérieur à celui du gène codant l'ubiquitine. A l'opposé, sur ce lot d'ADNc, *APR2* et *NTRC* sont respectivement exprimés 100 et 1000 fois moins. Les q-RT-PCR permettent de confirmer la surexpression des gènes *NTRA*, *NTRC*, *APR2*, *TRXH5*, *GSTF2*, *GSTU11*, *VTC2*, *GSH1* 7 jours après inoculation. Par contre, un problème technique ne nous a pas permis de confirmer la surexpression de *GSTF3*. Il est aussi intéressant de noter que le niveau de surexpression est variable selon les gènes considérés. Ainsi la quantité de transcrits accumulés des gènes *NTRA* et *GSH1* dans les plantes inoculées est 10 fois plus importante que dans les plantes non-inoculées. Ce sont donc deux candidats sérieux comme gènes spécifiquement ciblés par *Phyllobacterium* STM196 pour modifier la croissance des plantes.

2.1.3 Expression des gènes candidats dans les racines 7 jours après inoculation

Dans les racines, certains gènes ont un niveau d'expression très différent de celui qui a été observé dans les feuilles (Figure 6). Ainsi, le niveau d'expression de *NTRC* et de *APR2*, normalisé par rapport à l'expression d'*UBI* (ubiquitine) est respectivement 100 et 10 fois plus important dans les racines que dans les feuilles. Ce sont donc plutôt des gènes racinaires.

Une surexpression qui a été mise en évidence dans les feuilles suite à une inoculation par *Phyllobacterium* ne se retrouve dans les racines que pour le gène *NTRC*. Dans la majorité des cas (*NTRA*, *APR2*, *GSTF2*, *GSTF3*), l'inoculation ne provoque pas de modification dans l'expression des gènes dans les racines. Enfin, dans le cas des gènes *TRXH5*, *GSTU11* et *GSH1* une répression transcriptionnelle est observée (Figure 6).

2.1.4 Cinétique d'expression des gènes impliqués dans le statut rédox, entre 30 minutes et 24 heures après inoculation

Précédemment, une surexpression de gènes intervenant dans le maintien du statut rédox 7 jours après inoculation, a été mise en évidence par des analyses de transcriptome et validée par la réalisation de q-RT-PCR. Ces résultats suggèrent que ces gènes interviennent plus ou moins directement dans l'adaptation d'*Arabidopsis* à *Phyllobacterium*. La question qui se pose maintenant est l'implication de ces gènes dans les phases précoces de l'interaction, dans lesquelles il y a reconnaissance de la bactérie par la plante et émission d'un signal de reconnaissance. Des ADNc ont été réalisés (Tasselli, 2006) à partir de plantes ayant subi ou non des durées d'inoculations diverses : 30 secondes, 1h, 8h et 24h.

2.1.4.1 Niveau d'expression des gènes candidats au cours d'une journée sans inoculation

L'expression des gènes va être mesurée au cours de la journée :

- ✓ à 10 heures du jour 1
- ✓ à 11 heures du jour 1

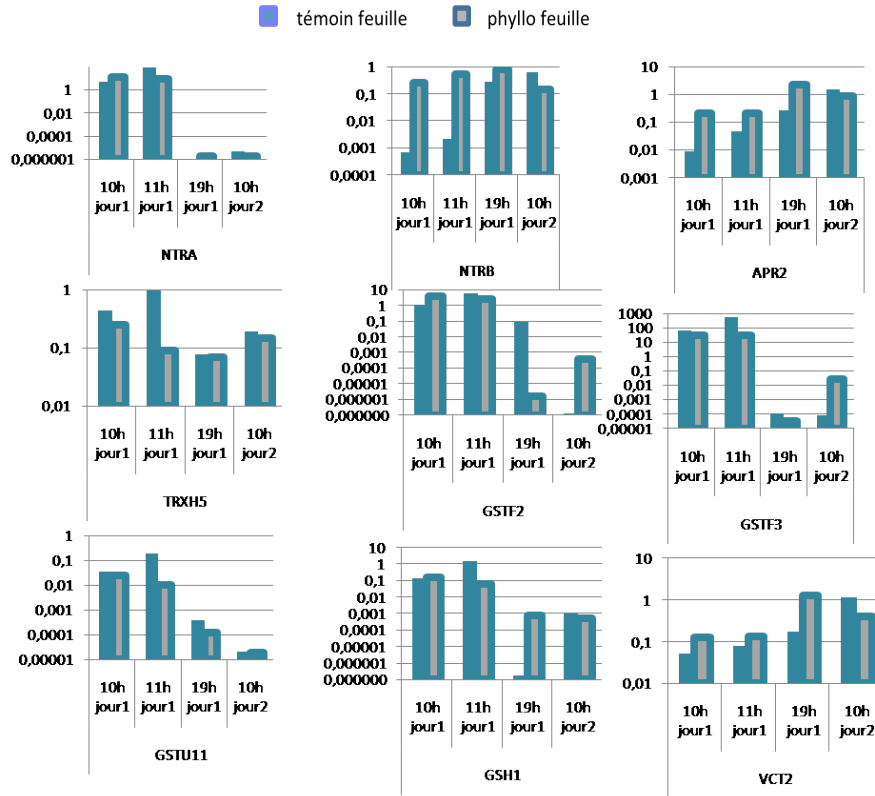


Figure 7 : Résultat de la cinétique d'expression Q-RT-PCR entre 10h du matin du jour 1 (30min après inoculation) et 10h du matin du jour 2 (24h après inoculation) sur des ADNc de feuilles d'*Arabidopsis thaliana* inoculé ou non par *Phyllobacterium STM196*. Les niveaux d'expression sont normalisés par rapport au gène constitutif (ubiquitine). *NTRA* et *NTRC* : NADPH Dépendantes Thiorédoxines Réductases, *GSH1* : γ -glutamylcystéine synthase, *GSTF2*, *GSTF3* et *GSTU11* : Glutathion transférases, *VCT2* : biosynthèse de la vitamine C, *UBI* : ubiquitine.

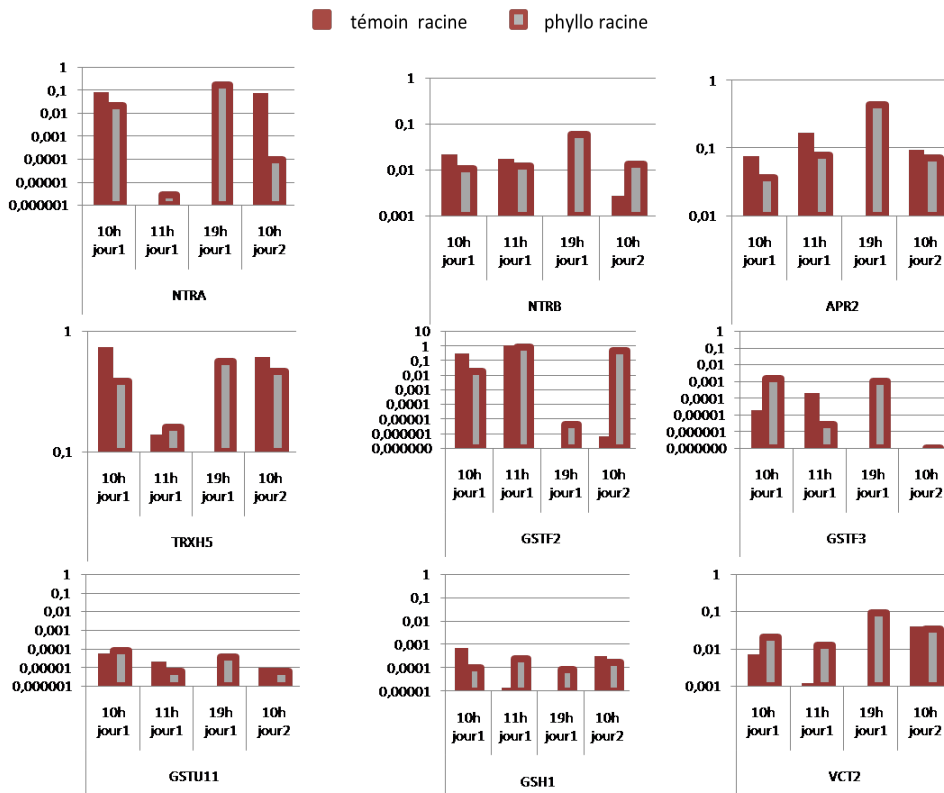


Figure 8 : Résultat de la cinétique d'expression Q-RT-PCR entre 10h du matin du jour 1 (30min après inoculation) et 10h du matin du jour 2 (24h après inoculation) sur des ADNc de racines d'*Arabidopsis thaliana* inoculé ou non par *Phyllobacterium STM196*. Les niveaux d'expression sont normalisés par rapport au gène constitutif (ubiquitine). *NTRA* et *NTRC* : NADPH Dépendantes Thiorédoxines Réductases, *GSH1* : γ -glutamylcystéine synthase, *GSTF2*, *GSTF3* et *GSTU11* : Glutathion transférases, *VCT2* : biosynthèse de la vitamine C, *UBI* : ubiquitine.

- ✓ à 19 heures du jour 1
- ✓ à 10 heures du jour 2

La comparaison du niveau d'expression de chacun des gènes à 10h le jour 1 et 10h le jour 2 permet d'avoir une idée de la fiabilité des résultats obtenus. Normalement, le niveau d'accumulation des transcrits devrait être similaire. C'est le cas pour *TRXh5* dans les feuilles et les racines et pour *GSTU11*, *VTC2*, *NTRA*, *GSH1* et *APR2* dans les racines (Figure 7). Parmi ces gènes, seul *GSTU11* semble avoir une expression relativement constante au cours de la journée. Dans les racines *VTC2*, *GSH1*, *APR2* et *TRXh5* présentent une diminution de l'accumulation de leur transcrit à 11h. Au contraire dans les feuilles, c'est à 11h que l'accumulation des transcrit de *TRXh5* est la plus forte (Figure 8). Pour les gènes dont le niveau d'expression est variable entre les points « 10h jour 1 » et « 10h jour 2 » il est difficile de conclure. Ces différences peuvent être expliquées par des problèmes techniques ou par le fait que l'expression du gène varie, d'une manière que nous ne comprenons pas encore, au cours d'une journée. Dans les deux cas, il est nécessaire de faire respectivement des répétitions techniques et biologiques afin de confirmer ces résultats.

2.1.4.2 Niveau d'expression des gènes candidats au cours d'une journée avec inoculation

Des observations sont faites sur l'effet de l'inoculation sur l'expression des gènes dans les temps courts après inoculation. Les résultats laissent supposer que, dans les feuilles, *NTRC*, *APR2*, *VTC2* seraient surexprimés et *TRXh5* et *GSTU11* seraient sous exprimés dans les plantes inoculées.

Dans les racines l'effet de l'inoculation est encore moins clair que dans les feuilles. Il est néanmoins possible qu'il y ait une surexpression de *VTC2* et une sous-expression d'*APR2*.

2.2 Caractérisation phénotypique

2.2.1 Caractérisation phénotypique des lignées *cad2* ; *ntra-ntrb* ; *trx h* ($\Delta 1,2,3,5$)

Les mutants *cad2*, *ntra-ntrb* et *trx h* ($\Delta 1,2,3,5$) n'ont jamais été caractérisés dans notre mode de culture. En particulier, la plupart des analyses de mutant d'*Arabidopsis* sont réalisées sur des milieux de type Murashige et Skoog supplémenté avec un sucre, généralement du saccharose ou du glucose. Ces conditions sont peu physiologiques et peuvent masquer des phénotypes intéressants. La croissance, la taille des poils racinaires et l'architecture racinaire sont trois phénotypes caractéristiques de l'interaction *Arabidopsis* / *Phyllobacterium*. Ils seront donc analysés chez les trois mutants cités ci-dessus dans de plus faibles concentration d'azote (2 mM ; 5 mM et 10 mM de KNO_3) et sans sucres ajoutés.

2.2.1.1 La croissance des plantes

Cette expérience permet de révéler de nombreuses différences intéressantes. La première se situe au niveau de croissance entre les différents écotypes : dans ces conditions de culture, WS a une croissance des parties aériennes (+30%) (Figure 9A) et des parties racinaires (+33,4%) (Figure 9B) bien supérieures à celle de Col-0. La morphologie des plantes de ces deux écotypes est aussi affectée puisque le rapport PA/PR est aussi significativement différent : le PA/PR de Col-0 est plus

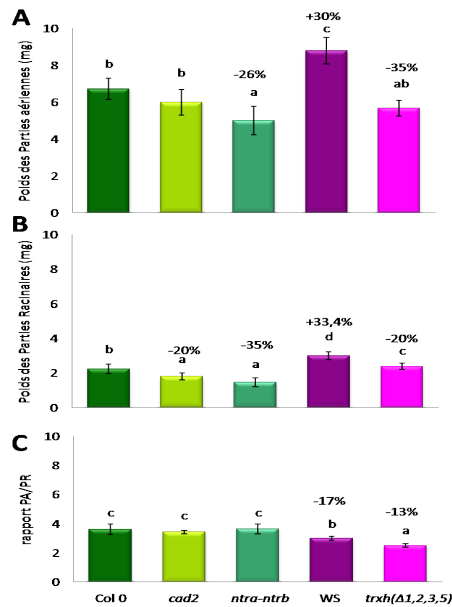


Figure 9 : Poids moyen de différentes lignées d'*Arabidopsis thaliana*. **A)** Parties aériennes (PA) **B)** Parties Racinaires (PR) **C)** rapport Partie aérienne/ Partie Racinaire (PA/PR). **Col 0** : écotype Columbia 0 ; **cad2** : simple mutant **Col 0** affecté dans le gène **CAD2** impliqué dans la synthèse du glutathion ; **ntra-ntrb** : double mutant **Col 0** affecté dans les NADPH-Réductases Transférases cytoplasmiques A et B ; **WS** : wassilewskija ; **trxh** ($\Delta 1,2,3,5$) : quadruple mutant **WS** affecté dans les thiorédoxines *h1,2,3,5*. Les plantules d'*Arabidopsis* sont transférées sept jours après germination sur un milieu plante 10 mM KNO_3 gélosé. Le poids des Parties aériennes (PA) et des parties racinaires (PR) est mesuré à 0,1 mg de précision huit jours après transfert. Le rapport Partie aérienne/ Partie Racinaire (PA/PR) permet de voir si la croissance de la plante est homogène. Les données constituent la moyenne de 4 répétitions biologiques indépendantes. Les barres d'erreur représentent les intervalles de confiance au seuil de 5%. Les groupes d'homogénéité LSD Fisher ont été réalisés sur Statistica 6.0.

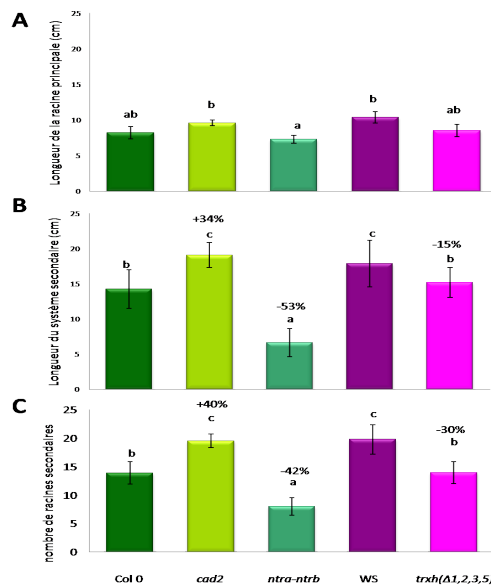


Figure 10 : Longueur moyenne de la racine principale et du système secondaire de différentes lignées d'*Arabidopsis thaliana*. **A)** longueur moyenne de la racine principale **B)** longueur moyenne du système racinaire secondaire. **C)** nombre de racines secondaires. **Col 0** : écotype Columbia 0 ; **cad2** : simple mutant **Col 0** affecté dans le gène **CAD2**; **ntra-ntrb** : double mutant **Col 0** affecté dans gènes **NTRA** et **NTRB**; **WS** : wassilewskija; **trxh** ($\Delta 1,2,3,5$) : quadruple mutant **WS** affecté dans les thiorédoxines *h1,2,3,5*. Les plantules d'*Arabidopsis* sont transférées sept jours après germination sur un milieu plante 5 mM KNO_3 gélosé. Les plantes sont scannées et les images analysées avec Image J et le module d'extension NeuronJ huit jours après transfert. Les données constituent la moyenne de 2 répétitions biologiques indépendantes. Les barres d'erreur représentent les intervalles de confiance au seuil de 5%. Les groupes d'homogénéité LSD Fisher ont été réalisés sur Statistica 6.0. Les pourcentages indiqués sont calculés par rapport à Col 0 sauf pour *trxh* ($\Delta 1,2,3,5$) qui est calculé par rapport à WS.

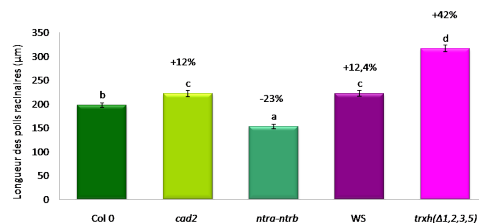


Figure 11 : Longueur moyenne des poils absorbants de la racine principale de différentes lignées d'*Arabidopsis thaliana*. **Col 0** : écotype Columbia 0 ; **cad2** : simple mutant **Col 0** affecté dans le gène **CAD2**; **ntra-ntrb** : double mutant **Col 0** affecté dans gènes **NTRA** et **NTRB**; **WS** : wassilewskija; **trxh** ($\Delta 1,2,3,5$) : quadruple mutant **WS** affecté dans les thiorédoxines *h1,2,3,5*. Les plantules d'*Arabidopsis* sont transférées sept jours après germination sur un milieu plante 2 mM KNO_3 gélosé. La longueur des poils racinaires est mesurée huit jours après transfert. Les données constituent la moyenne de 2 répétitions biologiques indépendantes. Les barres d'erreur représentent les intervalles de confiance au seuil de 5%. Les groupes d'homogénéité LSD Fisher ont été réalisés sur Statistica 6.0. Les pourcentages indiqués sont calculés par rapport à Col 0 sauf pour *trxh* ($\Delta 1,2,3,5$) qui est calculé par rapport à WS.

important que celui de WS (17%) (Figure 9C). La conclusion est qu'il faut tenir compte du fond génétique (Col-0 ou WS) pour comparer les mutants entre eux.

Le poids des parties aériennes de *cad2* est équivalent à celui de col-0. *ntra-ntrb* a une réduction de la croissance des parties aériennes de 25% par rapport à Col-0 (Figure 9A). Le poids des parties racinaires des mutants est inférieur de 20% pour *cad2* et de 5% pour *ntra-ntrb* par rapport à col-0 (Figure 9B). Le rapport PA/PR ne varie pas entre les mutants (*cad2* et *ntra-ntrb*) et Col-0.

trx h ($\Delta 1,2,3,5$) a un poids de parties aériennes inférieur de 35% à celui de WS (Figure 9A). Le (Figure 9C) poids des parties racinaires du mutant est inférieur et de 20%) par rapport à celui de WS (Figure 9B). Le rapport PA/PR est diminué chez *trx h* ($\Delta 1,2,3,5$) par rapport à celui de WS (Figure 9C).

En conclusion, au moins un gène parmi *NTRA* et *NTRAB* serait important dans la croissance des parties aériennes et racinaires. Cet effet positif pourrait passer par l'activation d'une TRX *h* (1,2,3 ou 5) puisque les effets des mutations *ntra/ntrb* et *trx h* ($\Delta 1,2,3,5$) sont qualitativement identiques. Par contre *GSH1* ne serait important que pour la croissance racinaire.

2.2.1.2 L'architecture racinaire

La longueur moyenne de la racine primaire ne varie pas entre écotypes et les mutations testées ne modifient significativement pas ce paramètre (Figure 10A). La longueur moyenne du système racinaire secondaire varie selon le mutant : *cad2* a un système racinaire secondaire plus grand de 46% par rapport à col-0. A l'opposé, *ntra-ntrb* et *trx h* ($\Delta 1,2,3,5$) présentent respectivement une diminution de 55% et 19% de leur système racinaire secondaire (Figure 10B). Cette différence dans la taille du système racinaire secondaire s'explique presque totalement par les variations du nombre de racines latérales. *Cad2* a plus (+ 40%) et *ntra-ntrb* a moins (- 42%) de racines latérales que Col-0 (Figure 10C). Dans le cas de *trx h* ($\Delta 1,2,3,5$) la diminution du nombre de racines (- 30%) est beaucoup plus importante que la diminution globale de la taille du système racinaire. Ainsi il est possible que certaines mutations de ce quadruple mutant agissent sur la diminution du nombre de racine latérales tandis que d'autres stimulerait l'allongement des racines latérales.

Ainsi *GSH1* aurait un rôle négatif sur l'initiation des racines latérales alors qu'à l'opposé les gènes *NTRA-NTRB* pourraient activer une ou plusieurs des thiorédoxines du quadruple mutant qui pourraient à leurs tours avoir un effet positif sur l'initiation des racines latérales et donc, la taille globale du système racinaire secondaire.

2.2.1.3 La longueur des poils racinaires

Comme précédemment, il est visible que Col-0 et WS sont des écotypes se comportant différemment : WS a des poils plus longs (+12,4%) que Col-0 (Figure 11). La longueur des poils racinaires de *cad2* est plus grande de 12% que celle des poils de Col-0 par contre celle de *ntra-ntrb* est plus petite de 23%. *trhx* ($\Delta 1,2,3,5$) a une longueur moyenne des poils racinaires plus grande de 42% par rapport à celle de WS (Figure 11).

Le gène *GSH1* interviendrait dans la répression de l'allongement des poils racinaires ainsi que les TRX *h* 1,2,3 et 5. *NTRA* et *NTRB* interviendraient dans la stimulation de la croissance des poils absorbants grâce à l'activation de thiorédoxines différentes de celles qui sont mutées dans le *trhx* ($\Delta 1,2,3,5$).

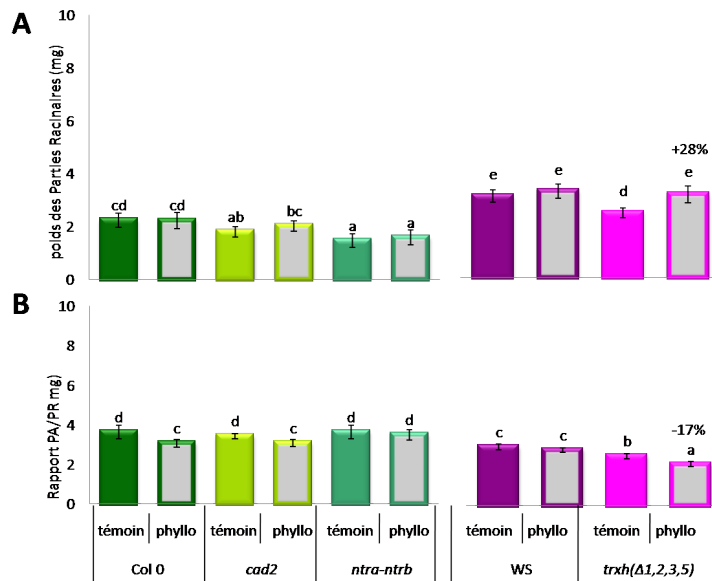


Figure 12 : Poids moyen de différentes lignées d'*Arabidopsis thaliana* inoculées par *Phyllobacterium* STM196. A) Parties Racinaires (PR) B) rapport Partie aérienne/ Partie Racinaire (PA/PR). Col 0 : écotype Columbia 0 ; cad2 : simple mutant Col 0 affecté dans le gène CAD2 ; ntra-ntrb : double mutant Col 0 affecté dans gènes NTRA et NTRB ; WS : wassilewskija ; trxh (Δ1,2,3,5) : quadruple mutant WS affecté dans les thiorédoxines h1,2,3,5. Témoin : plante non inoculée ; Phyllo : plante inoculée avec *Phyllobacterium* STM196. Les plantes d'*Arabidopsis* sont transférées sept jours après germination sur un milieu plante 10 mM KNO₃ gélosé inoculé ou non avec *Phyllobacterium* STM196 (10⁸ CFU.ml⁻¹). Le poids des parties racinaires (PR) est mesuré à 0,1 mg de précision huit jours après transfert. Le rapport Partie aérienne/ Partie Racinaire (PA/PR) permet de voir si la croissance de la plante est homogène. Les données constituent la moyenne de 4 répétitions biologiques indépendantes. Les barres d'erreur représentent les intervalles de confiance au seuil de 5%. Les groupes d'homogénéité LSD Fisher ont été réalisés sur Statistica 6.0. Les chiffres indiqués sont calculés en % d'effet en plus imputable à l'inoculation par rapport à l'effet obtenu avec le même génotype non inoculé.

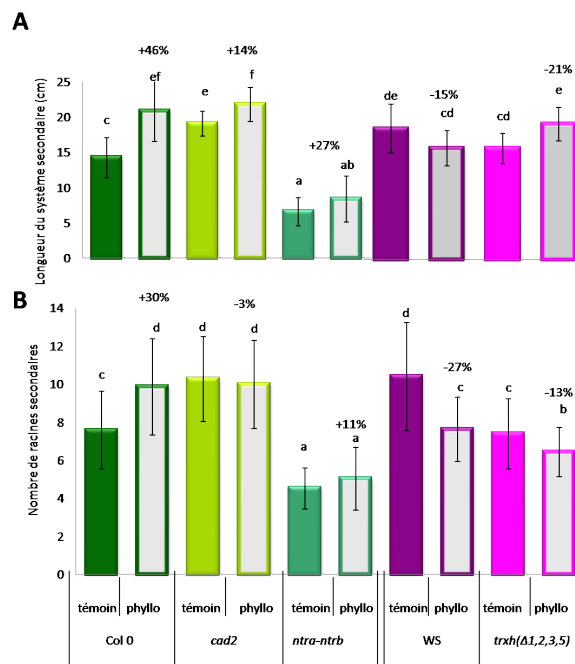


Figure 13 : Longueur moyenne de la racine principale et du système secondaire de différentes lignées d'*Arabidopsis thaliana* inoculées par *Phyllobacterium* STM196.

A) Longueur moyenne de la racine principale **B)** Longueur moyenne du système racinaire secondaire. Col 0 : écotype Columbia 0 ; cad2 : simple mutant Col 0 affecté dans le gène CAD2 ; ntra-ntrb : double mutant Col 0 affecté dans les gènes NTRA et NTRB ; WS : wassilewskija ; trxh (Δ1,2,3,5) : quadruple mutant WS affecté dans les thiorédoxines h1,2,3,5. Témoin : plante non inoculée ; Phyllo : plante inoculée avec *Phyllobacterium* STM196. Les plantes d'*Arabidopsis* sont transférées sept jours après germination sur un milieu plante 5 mM KNO₃ gélosé inoculé ou non avec *Phyllobacterium* STM196 (10⁸ CFU.ml⁻¹). Les plantes sont scannées et les images analysées avec Image J et le module d'extension NeuronJ huit jours après transfert. Les données constituent la moyenne de 2 répétitions biologiques indépendantes. Les barres d'erreur représentent les intervalles de confiance au seuil de 5%. Les groupes d'homogénéité LSD Fisher ont été réalisés sur Statistica 6.0. Les chiffres indiqués sont calculés en % d'effet en plus imputable à l'inoculation par rapport à l'effet obtenu avec le même génotype non inoculé.

2.2.2 Impact des mutations *cad2* ; *ntra-ntrb* ; *trx h* ($\Delta 1,2,3,5$) dans la réponse d'*Arabidopsis* à l'inoculation

2.2.2.1 Croissance des plantes

Dans les conditions expérimentales décrites, *Phyllobacterium* n'a aucun effet significatif sur la croissance des parties aériennes des mutants (*cad2*, *ntra-ntrb*, *trx h* ($\Delta 1,2,3,5$)) et des écotypes sauvages (Col-0 et WS).

Phyllobacterium n'a pas d'influence significative sur le poids des parties racinaires de Col-0, *cad2*, *ntra-ntrb* et WS. Par contre, l'inoculation induit une augmentation de 28% du poids des parties racinaires chez *trxh* ($\Delta 1,2,3,5$) (Figure 12A). Le quadruple mutant *trxh* ($\Delta 1,2,3,5$) présente donc une sensibilité accrue à *Phyllobacterium* en ce qui concerne la stimulation de la croissance racinaire. Cette observation se retrouve lorsque le rapport PA/PR est analysé. Il baisse de 17% chez *trx h* ($\Delta 1,2,3,5$) suite à l'inoculation alors qu'il ne varie pas chez WS (Figure 12B). D'autre part, nous constatons que *Phyllobacterium* provoque une diminution du rapport PA/PR chez Col-0 et *Cad2* qui ne se retrouve plus chez *ntra-ntrb*. En conclusion, au moins un gène de *TRXh* du quadruple mutant inhiberait le développement du système racinaire occasionné par l'inoculation.

2.2.2.2 L'architecture racinaire

Chez tous les génotypes testés, *Phyllobacterium* n'a pas d'effet significatif sur la longueur moyenne de la racinaire principale (données non montrées). Par contre, *Phyllobacterium* induit des modifications importantes de la longueur moyenne du système racinaire secondaire de : + 46% pour Col-0 et +14% pour *cad2*. *Phyllobacterium* n'a pas d'effet sur *ntra-ntrb* (Figure 13A). L'effet de *Phyllobacterium* sur ces deux mutants est plus faible que celui observé sur Col-0 : ces deux mutants sont donc hypo-sensibles à la bactérie en ce qui concerne l'allongement du système racinaire secondaire. Sur WS, *Phyllobacterium* n'induit pas d'effets significatifs alors que sur *trx h* ($\Delta 1,2,3,5$) il induit une augmentation significative de 21% (Figure 13A) de la taille du système racinaire secondaire. Le mutant *trx h* ($\Delta 1,2,3,5$) est donc hypersensible à l'inoculation par *Phyllobacterium* pour ce caractère.

L'inoculation de plantes par *Phyllobacterium* induit une augmentation significative du nombre de racines secondaires de Col-0 de 30%. Par contre, aucune différence significative n'a pu être observée chez les mutants. Ainsi, ces deux mutations semblent capables de supprimer l'effet de *Phyllobacterium* sur l'augmentation du nombre de racines latérales. Dans le cas de WS, l'inoculation par *Phyllobacterium* provoque une diminution du nombre de racines latérales de 27%. Chez le mutant *trx h* ($\Delta 1,2,3,5$), cette diminution est moindre (-13%) (Figure 13B) : les mutations dans les *TRXh* provoquent donc une levée partielle de l'inhibition de l'initiation des racines latérales par *Phyllobacterium*.

En conclusion, il est possible de constater que la modification de l'architecture racinaire par *Phyllobacterium* est extrêmement différente entre les écotypes Col-0 et WS. Il est donc plus sage d'essayer de compiler les résultats obtenus avec *ntra-ntrb* et *cad2* d'une part et *trx h* ($\Delta 1,2,3,5$) d'autre part. Chez Col-0, *Phyllobacterium* stimule la taille globale de l'appareil racinaire (46%) en ayant un effet conjoint sur l'initiation des racines latérales (30%) et sur l'allongement des racines latérales. *GSH1* serait requis pour permettre à *Phyllobacterium* de stimuler l'initiation de racines latérales et

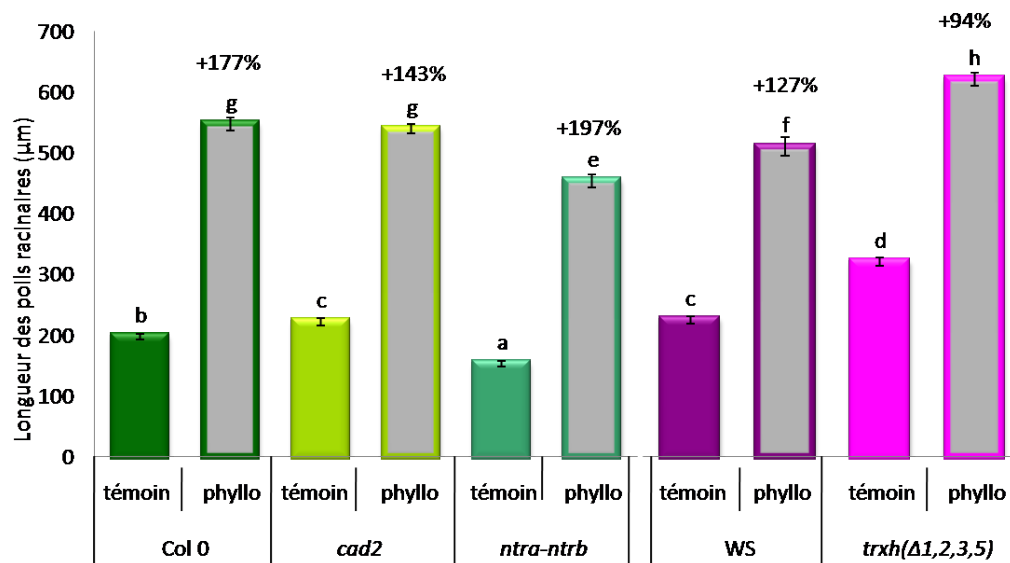


Figure 14 : Longueur moyenne des poils absorbants de la racine principale de différentes lignées d'*Arabidopsis thaliana* inoculées par *Phyllobacterium* STM196.

Col 0 : écotype Columbia 0 ; **cad2** : simple mutant Col 0 affecté dans le gène CAD2 ; **ntra-ntrb** : double mutant Col 0 affecté dans les gènes NTRA et NTRB ; **WS** : wassilewskija ; **trxh (Δ1,2,3,5)** : quadruple mutant WS affecté dans les thiorédoxines h1,2,3,5. **Témoin** : plante non inoculée ; **Phyllo** : plante inoculée avec *Phyllobacterium* STM196. Les plantules d'*Arabidopsis* sont transférées sept jours après germination sur un milieu plante 2 mM KNO₃ gélosé inoculé ou non avec *Phyllobacterium* STM196 (10⁸ CFU.ml⁻¹). La longueur des poils racinaires est mesurée huit jours après transfert. Les données constituent la moyenne de 2 répétitions biologiques indépendantes. Les barres d'erreur représentent les intervalles de confiance au seuil de 5%. Les groupes d'homogénéité LSD Fisher ont été réalisés sur Statistica 6.0 Les chiffres indiqués sont calculés en % d'effet en plus imputable à l'inoculation par rapport à l'effet obtenu avec le même génotype non inoculé..

participerait activement à l'augmentation globale du système racinaire secondaire. *NTRA* et/ou *NTRB* sont nécessaires à la fois pour promouvoir l'augmentation du nombre de racines latérales et l'augmentation globale de la taille du système racinaire secondaire par *Phyllobacterium*. Enfin globalement les gènes *TRXh* étudiés auraient un rôle important dans l'inhibition de l'initiation de racines latérales par *Phyllobacterium* sur l'écotype WS.

2.2.2.3 La longueur des poils racinaires

Phyllobacterium induit une augmentation de la taille des poils racinaires chez les cinq lignées étudiées : 177% pour Col-0, 143% pour *cad2*, 197 % pour *ntra-ntrb*, 127% pour WS et 94% pour *trx h* ($\Delta 1,2,3,5$). Des différences significatives sont observées entre les deux écotypes : WS a des poils racinaires qui s'allongent moins que ceux de Col-0 suite à une inoculation (Figure 14). Les mutations *cad2* et *trx h* ($\Delta 1,2,3,5$) sont hyposensibles à l'inoculation (Figure 14). La mutation *ntra-ntrb* provoque l'effet inverse, c'est-à-dire une hypersensibilité..

Pour conclure sur l'effet des gènes, il est intéressant de noter que *GSH1* et au moins une *TRXh* parmi les h1, h2, h3 et h5 sont impliqués dans la stimulation de l'allongement des poils par *Phyllobacterium*. A l'inverse *NTRA* et/ou *NTRB* ont globalement un effet négatif. Ainsi, *NTRA* et *NTRB* aurait un effet complexe : ils pourraient activer des *TRX* favorisant la stimulation de l'allongement des poils racinaires par *Phyllobacterium* (par exemple *TRXh1*, *TRXh2*, *TRXh3* ou *TRXh5*) et dans un même temps activer d'autres *TRX* avec des effets inverses.

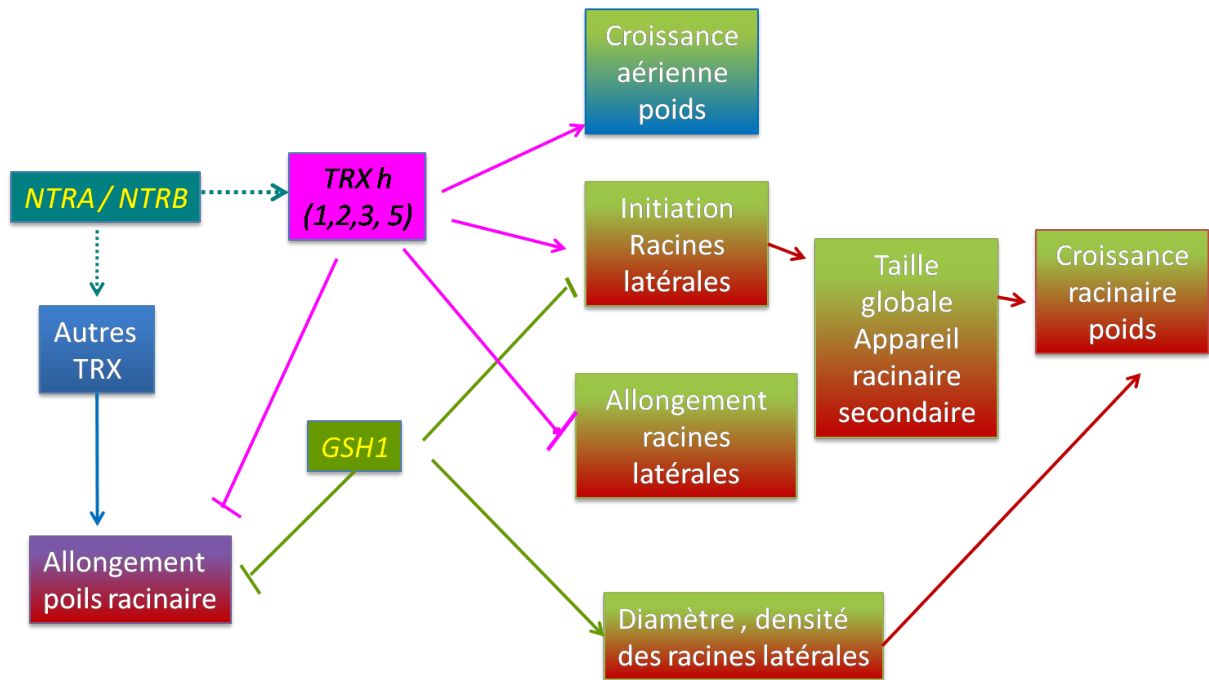


Figure 15 : Récapitulatif de l'action des gènes *NTRA*, *NTRB*, *GSH1*, *TRXH 1*, *TRXH2*, *TRXH3* et *TRXH5* sur la croissance, l'architecture racinaire et l'allongement des poils racinaires d'*Arabidopsis thaliana*.

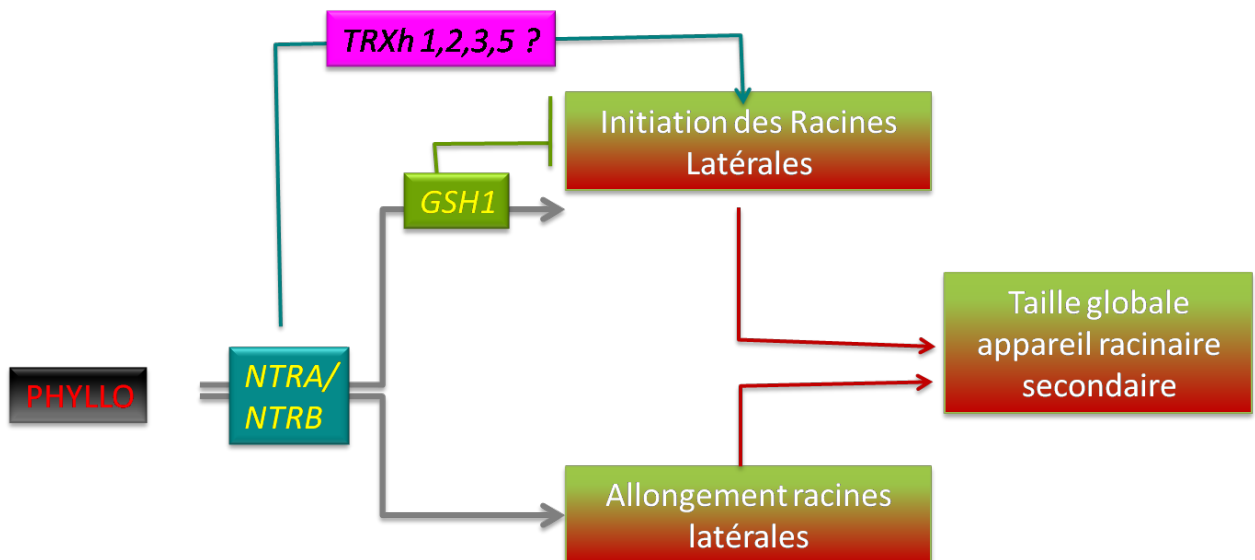


Figure 16 : Récapitulatif de l'action des gènes *NTRA*, *NTRB*, *GSH1* dans les modifications de l'architecture racinaire provoquées par une inoculation par *Phyllobacterium STM 196*.

3 Discussion

3.1 Apport de notre phénotypage à la compréhension du rôle des thiorédoxines et glutarédoxines dans les plantes

Jusqu'à présent l'étude de *cad2* n'avait pas montré d'autres phénotypes qu'un ralentissement de croissance en présence de cadmium (Cobbett et al., 1998). De même, aucune publication ne décrit un phénotype pour le double mutant *ntra-ntrb*. Enfin le quadruple mutant *trx h* ($\Delta 1,2,3,5$) n'a pas été décrit comme présentant de phénotypes vraiment marquants. Nous avons réalisés un phénotypage précis de ces mutants dans nos conditions de culture qui se distinguent par un milieu plus pauvre en azote que ceux qui sont utilisés habituellement ainsi que par une absence de sucres. Les résultats obtenus sont résumés dans la figure 15. *NTRA* ou *NTRB* stimulerait globalement la croissance des poils racinaires en activant des TRX cytoplasmiques et mitochondriales différentes de celles mutées dans *trx h* ($\Delta 1,2,3,5$). Nous avons aussi remarqué qu'au moins un des gènes de *trx h* ($\Delta 1,2,3,5$) serait impliqué dans l'inhibition de l'allongement des poils racinaires. Comme nous disposons de tous les simples mutants, il pourrait être intéressant de les phénotyper pour l'allongement des poils racinaires afin de trouver le ou les gènes impliqués.

Nous avons aussi remarqué que *GSH1* était impliqué dans la répression de l'allongement des poils racinaires (Figure 15). Il est intéressant de constater que l'application exogène de glutathion provoque un allongement des poils. Une hypothèse serait que le glutathion exogène aurait un effet opposé au glutathion endogène. Alternativement, le glutathion endogène pourrait activer des glutarédoxines ayant un effet néfaste sur l'allongement des poils racinaires.

Finalement, seul le quadruple mutant *trx h* ($\Delta 1,2,3,5$) semble avoir un effet sur la croissance des parties aériennes. Comme, pour l'allongement des poils, il serait souhaitable de phénotyper les mutants indépendamment de manière à discriminer le gène responsable de cet effet.

En ce qui concerne, la modification de l'architecture racinaire, les résultats sont peut-être encore plus intéressants. Le mutant *ntra-ntrb* présente qualitativement les même caractéristiques que *trx h* ($\Delta 1,2,3,5$). Une hypothèse pour expliquer cela est que l'effet remarqué de *NTRA-NTRB* passe par l'activation d'une TRX *h* (1,2,3 ou 5). Ces TRX auraient alors un rôle positif dans l'initiation des racines latérales et négatif dans l'allongement des racines latérales.

Le cas de *GSH1* est plus difficile car il a une influence néfaste sur le nombre de racines latérales et sur la taille globale de l'appareil racinaire secondaire. *GSH1* ne modifie pas la taille de la racine principale. Par contre, de manière inattendue il stimule le poids de l'appareil racinaire dans sa globalité (Figure 16). Pour expliquer l'implication de ce gène dans cette diminution de la taille de l'appareil racinaire et dans l'augmentation de la masse de l'appareil racinaire, nous proposons que *Phyllobacterium* stimule la densité ou le diamètre des racines.

Ainsi, il est clair que notre système de phénotypage est un outil de choix pour étudier la fonction des différentes thiorédoxines. Nous pensons qu'il serait souhaitable de phénotyper les mutants *TRXh1*, *TRXh2*, *TRXh3* et *TRXh5*.

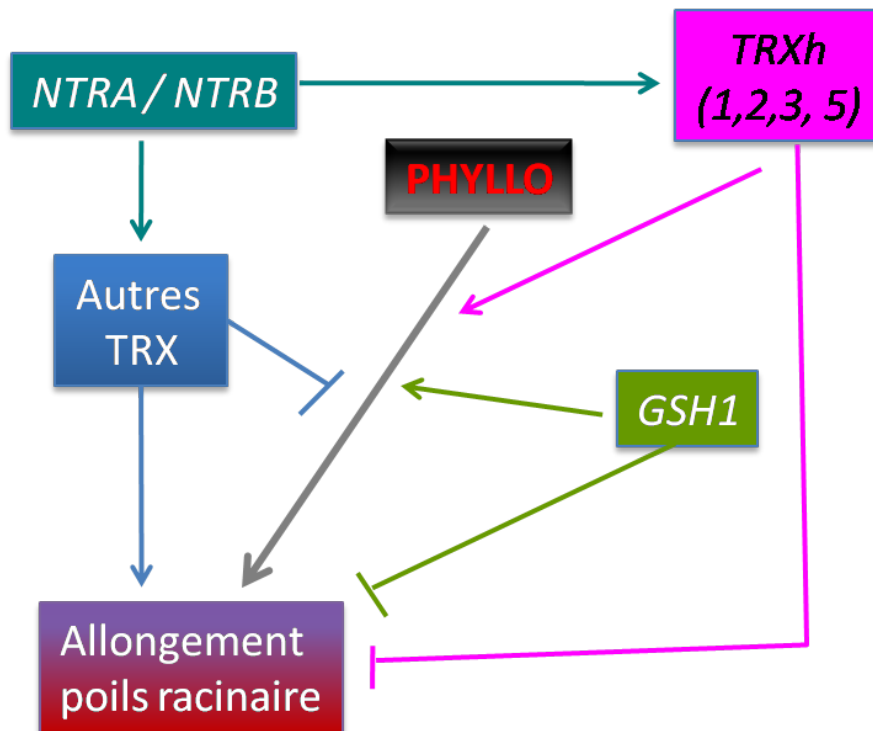


Figure 17 : Récapitulatif de l'action des gènes *NTRA*, *NTRB*, *GSH1*, *TRXH 1*, *TRXH2*, *TRXH3* et *TRXH5* sur l'allongement des poils racinaires d'*Arabidopsis thaliana* en présence ou en absence de *Phyllobacterium* STM 196.

3.2 Les voies des thiorédoxines et des glutarédoxines sont impliquées dans la réponse d'*Arabidopsis* à *Phyllobacterium*

Nous avons analysé les phénotypes de différents mutants après inoculation dans l'espoir de détecter des différences marquées avec des mutants non-inoculés. Dans le cas idéal, un mutant ne présente plus de réponse à *Phyllobacterium*. Malheureusement, dans la plupart des cas, nous n'avons pu observer que des amplifications ou des diminutions de l'effet de l'inoculation. Dans le cas de l'allongement des poils racinaires (Figure 17) nous avons observés que *GSH1* et *trx h* ($\Delta 1,2,3$ et 5) augmentent l'effet stimulateur de *Phyllobacterium*. A l'opposé, le gène *NTRA* ou *NTRB* provoque une inhibition de l'effet *Phyllobacterium* probablement par l'activation de TRX différentes de celles qui sont mutées dans *trx h* ($\Delta 1,2,3$ et 5). D'une manière générale, les gènes étudiés ont des effets inversés : lorsqu'ils ont un effet positif sur l'allongement des poils sans inoculation, ils inhibent l'allongement induit par une inoculation par *Phyllobacterium* et vice et versa. Les voies des thiorédoxines et des glutarédoxines sont donc impliqués dans la stimulation de la longueur des poils par *Phyllobacterium*.

Le résultat le plus marquant a été obtenu sur l'architecture racinaire. Les gènes *NTRA* ou *NTRB* et la voie des thiorédoxines sont requis pour que *Phyllobacterium* puisse modifier l'architecture racinaire (Figure 16). *GSH1* serait lui aussi requis pour permettre à *Phyllobacterium* de stimuler l'initiation de racines latérales. Ce résultat nous incite à poursuivre les recherches sur le rôle des voies des TRX et des GRX sur la modification de l'architecture racinaire par *Phyllobacterium*.

D'autre part, les analyses d'expressions de gènes ont révélé 3 gènes particulièrement intéressants : *GSTF2* car l'analyse des résultats des puces CATMA indique que ce gène est surexprimé suite à une inoculation quelques soient les quantités de nitrate présentes dans le milieu et les gènes *GSH1* et *NTRA* qui sont plus de 10 fois plus exprimés dans les feuilles 7 jours après inoculation. Ainsi, ce résultat montre que les deux voies de régulations (thiorédoxines et glutarédoxines) pourraient être activées par l'inoculation.

Pour compléter cette étude, il faudrait refaire des expériences permettant de tester correctement le paramètre croissance. La solution consiste probablement semer les graines sur un milieu inoculé et placer les boites en jours courts afin de ralentir la croissance et pouvoir laisser plus longtemps la plante en contact avec la bactérie. Ainsi, nous pourrions déterminer si la voie des GRX et des TRX est impliquée dans la stimulation de la croissance par *Phyllobacterium*.

Enfin deux autres mutants devraient aussi être étudiés : le mutant *ntrc* et le triple mutant *ntra/ntrb/cad2*. Ce dernier nous permettrait de révéler l'existence de relations entre les deux voies : il semblerait que certaines glutarédoxines soient en effet capables d'activer des thiorédoxines cytoplasmiques (Gelhaye *et al.*, 2003). L'étude de *ntrc*, dont la protéine est supposée permettre l'activation de certaines thiorédoxines chloroplastiques, nous permettrait de voir si les modifications observées dans le métabolisme (le chloroplaste est le siège de nombreuses voies métaboliques) par Amandine Tasselli (2007) peuvent être dues à des modifications dans l'activité de certaines TRX chloroplastiques.

4 Matériel et méthodes

4.1 Matériel biologique

4.1.1 *Arabidopsis thaliana*

Trois mutants d'*A.thaliana* ont été étudiés : *cad2* (Cobbett *et al.*, 1998), *ntra-ntrb* (Laloi *et al.*, 2001 ; Meyer *et al.*, 2005) et *trxh* ($\Delta 1,2,3,5$) (Reichheld *et al.*, 2002). *cad2* est un mutant dans le gène *GSH1* impliqué dans la biosynthèse du glutathion. *ntra-ntrb* est un double mutant dans les gènes *NTRA* et *NTRB*. Les deux premiers mutants sont dans le fond génétique Col-0 (écotype Columbia). *trxh* ($\Delta 1,2,3,5$) est un quadruple mutant dans le fond génétique WS (écotype Wassilewskija). Ils nous ont été fournis par J.P. Reichheld. Nous avons aussi testé les deux écotypes sauvages Col-0 et WS. La comparaison entre la plante sauvage et le mutant permet d'approfondir la caractérisation des mutants et la comparaison entre mutant non inoculé et mutant inoculé permettra d'étudier spécifiquement le rôle de la bactérie sur la morphologie et la physiologie de la plante.

4.1.1.1 **Conditions de culture :**

Les graines des différentes lignées sont stérilisées par un bain d'hypochlorite de sodium (NaOCl) 2,9% additionné de 10 μ l de Tween 20 pendant 15 min sous agitation constante. Les graines sont ensuite rincées quatre fois à l'eau stérile et semées à l'aide d'une micropipette dans des boîtes de Pétri carrées de 12 cm de côté contenant 50 ml de milieu de culture minéral appelé milieu plante (0,5 mM $\text{CaSO}_4(\text{H}_2\text{O})$, 0,5 mM $\text{MgCl}_2(\text{H}_2\text{O})_6$, 1 mM KH_2PO_4 , 0,05 mM Na_2FeEDTA , 2,5 mM MES, 1X Mix Oligo-éléments, H_2O milliQ ; pH 5,7 ; 10 g.l^{-1} d'agar) additionné de 2 mM KNO_3 .

Les semis sont placés à 4°C et à l'obscurité pendant 48 heures avant d'être transférés en chambre de culture en jours longs (photopériode de 16 heures ; 20 000 lux ; 21°C).

Après sept jours en chambre de culture, les plantules sont transférées sur du milieu plante inoculé ou non par une solution bactérienne d'une concentration de 10^8 cfu.ml⁻¹ (unités formant colonie par ml) de *Phyllobacterium* STM196. La quantité de KNO_3 est adaptée à chaque mesure désirée :

- ✓ 2 mM pour l'étude des poils racinaires
- ✓ 5 mM pour l'étude de l'architecture racinaire
- ✓ 10 mM pour l'étude de la croissance des plantes

4.1.1.2 **Matériel végétal pour la vérification des données CATMA**

Arabidopsis thaliana col-0 est cultivée pendant sept jours sur un milieu plante additionné de 2 mM de KNO_3 . Puis elles sont transférées sur un nouveau milieu plante additionné de 2 mM de KNO_3 inoculé ou non par une solution de *Phyllobacterium* STM196 (10^8 cfu.ml⁻¹) pendant 6 heures ; 24 heures et sept jours. Pour chaque condition de culture, les parties aériennes de 4 plantes sont plongées dans de l'azote liquide puis conservées à -80°C jusqu'à l'extraction de l'ARN. On fait de même avec les parties racinaires. Pour chaque temps de culture, deux répétitions sont réalisées.

4.1.1.3 Matériel végétal pour la cinétique d'expression

Arabidopsis thaliana col-0 est cultivée pendant 12 jours sur un milieu plante additionné de 2 mM de KNO₃. Les plantes sont directement inoculées par dépôt de 5 µl de solution de *Phyllobacterium* STM196 (10⁸ cfu.ml⁻¹) directement sur la racine. Le matériel végétal est récolté (feuilles et racines séparément) à différents temps après inoculation, soit 3 récoltes le jour de l'inoculation (temps après inoculation : 30 min, 1h, 8h), suivi d'une récolte à 24h (heure de récolte : 10h). Le matériel végétal est récolté dans des tubes eppendorf de 2ml, congelé rapidement dans l'azote liquide et est conservé à -80°C.

4.1.2 Phyllobacterium STM196 :

Phyllobacterium STM196 est cultivé sur milieu E' (2865 mM K₂HPO₄, 811 mM MgSO₄(H₂O)₇, 1711 mM NaCl, 7913 mM KNO₃, 340 mM CaCl₂(H₂O)₂, 30 mM FeCl₃(1000x), 3 g.l⁻¹ extrait de levure, 10 g.l⁻¹ Mannitol, H₂O milliQ ; pH 6,8.) gélosé (10 g.l⁻¹) à 25°C pendant 72 heures. Une colonie isolée est transférée dans 100 ml de milieu E' liquide. La bactérie est cultivée à 25°C pendant 24 à 36 heures sous agitation constante.

La culture est centrifugée pendant 5 min à 5000 RPM à 15°C (centrifuge 5804R, rotor F-34-6-38, Eppendorf, Hamburg, Allemagne). Le culot bactérien est remis en suspension dans du milieu plante additionné de 2 mM de KNO₃. Cette suspension sert à ensemercer le milieu plante gélosé (10 g.l⁻¹) à une concentration finale de 10⁸ cfu.ml⁻¹.

4.2 Méthode

4.2.1 Caractérisation phénotypique

4.2.1.1 Analyse de la croissance des plantes

Après transfert sur un milieu plante additionné de 10 mM de KNO₃, les plantes sont placées huit jours en chambre de culture en condition de jour court (photopériode de 8 heures ; 20 000 lux ; 21°C). La masse des parties aériennes et racinaires est mesurée grâce à une balance de précision (Adventurer Pro, Ohaus Corporation, Pine Brook, NJ, USA).

4.2.1.2 Analyse du nombre et de la longueur des racines latérales

Après transfert sur un milieu plante additionné de 5 mM de KNO₃, les plantes sont placées huit jours en chambre de culture en condition de jour long. Les boîtes sont scannées (scanner Epson Perfection 1250, Epson, Japon) et analysées grâce au logiciel Image J 1,33a (Wayne Rasband, USA) et le module d'extension Neuron J 1.01 (Erick Meijering, Suisse). Les longueurs des racines principales, secondaires et le nombre de racines secondaires.

4.2.1.3 Analyse de longueur des poils racinaires

Après transfert sur un milieu plante additionné de 2 mM de KNO₃, les plantes sont placées huit jours en chambre de culture en condition de jour long. Les poils sont observés grâce à une loupe binoculaire munie d'une caméra Olympus SZH10 (Olympus, Tokyo, Japon) équipée d'une caméra

| | Accession | nom | nom amorce | séquence (5'-3') |
|------------------------------|-----------|--------|--------------------------|----------------------------|
| Thiorédoxine | AT4G04610 | APR1 | APR1F | TGGATCGTGTTCATGTTGCTCCTG |
| | | | APR1R | TCTGCACCACTAAATGCAATGGCG |
| | AT1G62180 | APR2 | APR2F | CCTGGTGCCCTTCTGCCAGGCG |
| | | | APR2R | TAATAGCCCGTGGAGCTCTTTTCG |
| | AT1G45145 | h5 | TRXH5F | GCACCAGTGTTCAGAGATGGC |
| TRXH5R | | | TTGATCTCATCTTCGCAGCACCG | |
| Thiorédoxine réductase | AT2G17420 | NTRA | NTRAF | CATAGGAGGGATACGTTTAGGGCG |
| | | | NTRAR | ATCTTCATCAAGCTCAAGCTGCCC |
| | AT2G41680 | NTRC | NTRC F | ATACACTTCACCAACATGTGGCCC |
| | | | NTRC R | TGGGGTTCCTAATAATCCAGCTGC |
| Glutarédoxines | AT1G03850 | CXXS13 | CXXS13F | TTCTCTCTTTCCCAATTCICCC |
| | | | CXXS13R | GGCTTTGGTGATCCTGATGTTAACC |
| | AT1G28480 | CXXC9 | CXXC9F | AACGCGGTGATTGTGATTGGACGG |
| | | | CXXC9R | CCCTATCTAACCTCCAAACAACC |
| Glutathion transférase | AT4G02520 | GSTF2 | GSTF2F | ATGCTAAGATTAAATAAGCGGCTTC |
| | | | GSTF2R | GAGCATACACACACTCACATAAC |
| | | | GSTF2F | AAGGAACCAACCTTCTCCAGCTG |
| | AT2G02930 | GSTF3 | GSTF3R | CATAGTTGAACTTGAATACTTGTCCC |
| | | | GSTU7F | GATGAAAGTTGTGGGGAAGACCGG |
| | AT2G29420 | GSTU7 | GSTU7R | GTTCATCAGCCAAAACGCCACC |
| | | | GSTU10F | TATACAACCTGGATAGAGCGCCTGC |
| | AT1G74590 | GSTU10 | GSTU10R | AATTATGCATTGCGCCTGCTGG |
| | | | GSTU11F | TGAAGCGGTCAAGCCTGTCATGCC |
| | AT1G69930 | GSTU11 | GSTU11R | CGTGGCAGGATTGGTTATCTCTGC |
| | | | GST8R | TGGATGCTACGAGGCTAGGCTCG |
| | AT1G78380 | GSTU8 | GST8F | ATCACTGGACTCGTTTATTGGGC |
| GSH1F | | | GAGCCAGCTTTCTATCCGCTCTGG | |
| Glutathion synthase | AT4G23100 | GSH1 | GSH1R | GTACAGCAGCTCTCGAACACGGG |
| | | | VTC2F | TGGAAACACAAGTGAACCCAGCCG |
| Biosynthèse de la vitamine C | AT4G26850 | VTC2 | VTC2R | CATTTGTGATCGGACCTCCATGGG |
| | | | UBIR | TGGICTTCCGGTGGAGAGT |
| | AT1G04860 | UBI | UBIF | CACACTCCACTTGGTCTTG |

Tableau 2 : séquences des amorces utilisées pour les Q-RT-PCR des ADNc d'*Arabidopsis thaliana* inoculées ou non par *Phyllobacterium STM196* avec leur numéro d'accèsion, la famille multi-génique à laquelle le gène recherché appartient et leur nom et leur nom

digitale analogique CCD JVC TK-C1381 (JVC, Yokohama, Japon). La longueur des poils est déterminée à l'aide du logiciel Cell P[®] 2.3 (Olympus-Soft Imaging System, Tokyo, Japon).

4.2.2 RT-PCR quantitative

4.2.2.1 Extractions des ARN totaux et RT-PCR quantitative

Les échantillons végétaux sont broyés à froid grâce à un vibro-broyeur Mn 200 (Retch, Allemagne) réglé à 30 secousses par seconde pendant 30 secondes. L'ARN est extrait avec le kit SV Total RNA isolation system[™] (Promega, USA).

Les ADNc sont synthétisés à partir de un à quatre microgramme d'ARN totaux avec la Superscript[™] II Reverse Transcriptase (Invitrogen, USA) dans les conditions standard d'utilisation.

La PCR quantitative est réalisée avec SYBRGreen I (Eurogentec, Belgique) et les amorces spécifiques (Table1) sur ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystem, Foster City, USA) avec le programme d'amplification suivant : 50°C pendant 2 minutes, 95°C pendant 10 minutes suivi de 40 cycles à 1) 95°C pendant 10 secondes, et 2) 60°C pendant 1 minute. Les amorces utilisées sont répertoriées dans le tableau 2.

4.2.2.2 Analyse de l'expression des gènes par Q-PCR :

Une première étape consiste à déterminer la qualité des ADNc par Q-PCR en utilisant un gène constitutif (Ubiquitine). Cette étape permet de vérifier la relation entre le nombre de cycle (Ct) nécessaire pour que le signal fluorescent atteigne la valeur seuil et le logarithme de la concentration des ADN.

Ce n'est qu'après s'être assuré de cette première étape que l'on entreprend la mesure de l'expression des gènes et de l'ubiquitine comme gène de référence. Le niveau d'expression des gènes étudiés est déterminé par rapport à ce gène de référence.

Le niveau d'expression est calculé de la manière suivante : $2^{-(Ct_i - C_{tr})}$, avec Ct : le nombre de cycle, i : le gène d'intérêt, et r : le gène de référence. Nous obtenons ainsi le niveau d'expression de chaque gène pour chaque condition.

4.2.3 Analyse statistique

Les résultats obtenus ont été testés statistiquement avec le test de Fisher LSD au seuil de significativité P=5%, avec le logiciel Statistica 6.0 (StatSoft, Prague, République Tchèque).

Références

- Berge O, Fages J, Mulard D, Balandreau J (1990) Effects of inoculation with *Bacillus circulans* and *Azospirillum lipoferum* on crop-yield in field grown maize. *Symbiosis* **9** : 259-266.
- Cobbett, C. S., M. J. May, R. Howden and B. Rolls (1998) The glutathione-deficient, cadmium-sensitive mutant, *cad2-1*, of *Arabidopsis thaliana* is deficient in gamma-glutamylcysteine synthetase. *Plant Journal*. **16**, 73-78.
- Compant, S., B. Duffy, J. Nowak, C. Clement and E. A. Barka (2005) Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: Principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and Environmental Microbiology*. **71**, 4951-4959.
- Douay (2007), Effet des excretions de *Phyllobacterium* STM196 sur *Arabidopsis*. Rapport de licence 3^{ème} année. Université Montpellier II LSTM.18.
- Geigenberger, P., A. Kolbe and A. Tiessen (2005) Redox regulation of carbon storage and partitioning in response to light and sugars. *Journal of Experimental Botany*. **56**, 1469-1479.
- Gelhaye, E., N. Rouhier and J.P. Jacquot (2003) Evidence for a subgroup of thioredoxin h that requires GSH/Grx for its reduction. *FEBS letter* **555**,: 443-448
- Gelhaye, E., N. Rouhier, N. Navrot and J. P. Jacquot (2005) The plant thioredoxin system. *Cellular and Molecular Life Sciences*. **62**, 24-35.
- Huggett, J., K. Dheda, S. Bustin and A. Zumla (2005) Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes and Immunity*. **6**, 279-284.
- JUMAS-BILAK, E. S. Michaud-Charachon, G. Bourg, M. Ramuz, A. Allardet-Servant. (1998) Unconventional Genomic Organization in the Alpha Subgroup of Proteobacteria. *Journal of Bacteriology*, **180**, 2749-2755.
- Laloi, C., D. Mestres-Ortega, Y. Marco, Y. Meyer and J. P. Reichheld (2004) The *Arabidopsis* cytosolic thioredoxin h5 gene induction by oxidative stress and its W-box-mediated response to pathogen elicitor. *Plant Physiology*. **134**, 1006-1016.
- Laloi, C., N. Rayapuram, Y. Chartier, J. M. Grienberger, G. Bonnard and Y. Meyer (2001) Identification and characterization of a mitochondrial thioredoxin system in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **98**, 14144-14149.
- Larcher, (2002) Stimulation de la croissance du colza par *Phyllobacterium* sp: Mode d'action et impact de la compétition bactérienne. Thèse de Doctorat, Université Montpellier II. 241.
- Larcher, M., B. Muller, S. Mantelin, S. Rapior and J. C. Cleyet-Marel (2003) Early modifications of *Brassica napus* root system architecture induced by a plant growth-promoting *Phyllobacterium* strain. *New Phytologist*. **160**, 119-125.
- Mantelin, S., G. Desbrosses, M. Larcher, T. J. Tranbarger, J. C. Cleyet-Marel and B. Touraine (2006) Nitrate-dependent control of root architecture and N nutrition are altered by a plant growth-promoting *Phyllobacterium* sp. *Planta*. **223**, 591-603.
- Mantelin, S. and B. Touraine (2004) Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake. *Journal of Experimental Botany*. **55**, 27-34.
- Meyer, Y., J. P. Reichheld and F. Vignols (2005) Thioredoxins in *Arabidopsis* and other plants. *Photosynthesis Research*. **86**, 419-433.
- Meyer, Y., L. Verdoucq and F. Vignols (1999) Plant thioredoxins and glutaredoxins: identity and putative roles. *Trends in Plant Science*. **4**, 388-394.
- Moreno, E. (1998) Genome evolution within the alpha Proteobacteria: why do some bacteria not possess plasmids and others exhibit more than one different chromosome? *FEMS Microbiol Rev*. **22**, 255-75.
- Parisy, V., B. Poinssot, L. Owsianowski, A. Buchala, J. Glazebrook and F. Mauch (2007) Identification of PAD2 as a gamma-glutamylcysteine synthetase highlights the importance of glutathione in disease resistance of *Arabidopsis*. *Plant Journal*. **49**, 159-172.
- Reichheld, J. P., D. Mestres-Ortega, C. Laloi and Y. Meyer (2002) The multigenic family of thioredoxin h in *Arabidopsis thaliana*: specific expression and stress response. *Plant Physiology and Biochemistry*. **40**, 685-690.
- Rouhier, N. and J. P. Jacquot (2005) The plant multigenic family of thiol peroxidases. *Free Radical Biology and Medicine*. **38**, 1413-1421.
- Sanchez-Fernandez *et al.*, 1997 : R. Sanchez-Fernandez, M. Fricker, L.B. Corben, N.S. White, N. Sheard, C.J. Leaver, M. Van Montagu, D. Inze and M.J. May , Cell proliferation and hair tip growth in the *Arabidopsis* root are under mechanistically different forms of redox control. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94** (1997), pp. 2745-2750.

Tasselli, (2006) Etude de l'implication du tréhalose dans l'interaction symbiotique entre *Phyllobacterium brassicacearum* et *Arabidopsis thaliana*. Rapport de Master 1^{ère} année, Université Montpellier II, 15.

Tasselli (2007) Role of trehalose for symbiotic interaction of *Phyllobacterium brassicacearum* and *Arabidopsis thaliana*. Rapport de Master 2^{ème} année, Université Montpellier II, 22.

Résumé

Lors de l'interaction avec la PGPR *Phyllobacterium brassicacearum* STM196, *Arabidopsis thaliana* subit des modifications importantes tant métaboliques, que développementales. Des analyses transcriptomiques (CATMA) ont mis en évidence une variation d'expression, sept jours après inoculation dans les feuilles, d'au moins une quinzaine de gènes impliqués dans le maintien du statut rédox. La surexpression de 9 d'entre eux et en particulier *GSH1*, *NTRA* et *TRXh5* a été confirmée par RT-PCR quantitative. Afin de savoir si ces gènes sont des marqueurs ou des effecteurs de cette interaction, une approche de génétique inverse a été entreprise sur 3 mutants : *Cad2* (muté dans *GSH1*), *ntra-ntrb* et *trx h* ($\Delta 1,2,3,5$).

Pour chacun d'entre eux, une analyse phénotype, comprenant des mesures de croissances, d'architecture racinaire et d'allongement des poils, a été réalisée avec ou sans inoculation par *Phyllobacterium*. L'analyse des mutants non-inoculés a permis de révéler des phénotypes nouveaux : le phénotypage que nous avons mis au point est donc un excellent outil pour continuer la caractérisation de mutants affectés dans le système rédox. L'analyse des mutants inoculés a permis de montrer le rôle crucial de *GSH1* et de *NTRA* ou *NTRB* dans la modification de l'architecture racinaire. Pris tous ensembles ces résultats montrent clairement que les voies des thiorédoxines et des glutarédoxines sont importantes dans la réponse d'*Arabidopsis* à *Phyllobacterium*.

Mots clefs :

Arabidopsis thaliana ; glutarédoxine ; *Phyllobacterium* STM 196 ; Statut rédox ; thiorédoxine