



HAL
open science

Exsudation racinaire, interaction avec le microbiote et nutrition minérale chez les blés sauvages et modernes

Jean-Benoît Peltier

► **To cite this version:**

Jean-Benoît Peltier. Exsudation racinaire, interaction avec le microbiote et nutrition minérale chez les blés sauvages et modernes. *Vegetal Biology*. Université Montpellier, 2021. tel-04732650

HAL Id: tel-04732650

<https://hal.inrae.fr/tel-04732650v1>

Submitted on 11 Oct 2024

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.

UNIVERSITE DE MONTPELLIER
ECOLE DOCTORALE GAIA

Discipline : Biologie Intégrative, Diversité et Amélioration des Plantes



Mémoire présenté pour l'obtention de
L'Habilitation à Diriger des Recherches

Jean-Benoît PELTIER

Chargé de Recherche INRAE

Equipe: Transport ionique chez les céréales et adaptation à
l'environnement

Laboratoire de Biochimie & Physiologie Moléculaire des Plantes
Univ Montpellier, INRAE, CNRS, Montpellier SupAgro,
Montpellier, France

Table des matières

AVANT PROPOS	5
Chapitre I Résumé du cursus scientifique	7
1. Doctorat.....	7
2. Post-doctorat.....	7
3. Chercheur à l'INRAE: travail conduit dans le Laboratoire de Protéomique fonctionnelle.....	8
4. Travail conduit dans l'UMR BPMP	10
Chapitre II Travaux en post-doctorat et expérience en biochimie.....	11
1. Structure et fonction de la protéase Clp	11
1.1. Introduction.....	11
1.2. Organisation fonctionnelle générale du complexe Clp	13
1.3. Assemblage et stoechiométrie au sein du complexe Clp.....	16
1.4. Conséquences visibles de la perte des fonctions Clp pour le développement, la croissance et la reproduction	19
1.5. Sélection des substrats Clp, règle de l'extrémité N et dégron	21
1.6. Conclusion	24
2. Structure et fonction des plastoglobules	29
2.1. Introduction.....	29
2.2. Protéome et fonctions des plastoglobules.....	30
2.3. Rôle des fibrillines dans la structuration des plastoglobules	32
2.4. Les plastoglobules dans les autres types de plastes.	33
Chapitre III Expression de transporteurs HKT de riz et de blé en vue de leur caractérisation structurale	39
1.- Contexte et situation du sujet.....	39
2. Résultats	40
2.1. Les transporteurs OsHKT2;2 et TmHKT1;4 sont exprimés efficacement in vitro dans le système acellulaire de germe de blé.....	40
2.2. Expression en présence de détergents	41
2.3. Expression en présence de lipides.....	42
2.4. Les transporteurs HKT produits in vitro sont fonctionnels dans un système lipidique artificiel (BLM)	43
3. Conclusion et Perspectives.....	45
Chapitre IV Initiation de la thématique <i>Microbiote et fonctions racinaires</i> : premiers résultats	46
1. Introduction: analyse du contexte et mise en place de la stratégie de recherche	46
2. Résultats	47

2.1. Isolement et caractérisation physiologique et moléculaire de rhizobactéries associées au blé dur ou à ses ancêtres dans des sols libanais	47
2.2. Développement d'une méthodologie de phénotypage des zones pilifères et de l'architecture racinaire.....	50
2.3. Mise au point d'un protocole de récolte des exsudats racinaires de plantules de blé cultivées en hydroponie dans des conditions axéniques	53
3. Conclusion	54
Chapitre V: Projet de recherche Exsudation racinaire, interaction avec le microbiote et nutrition minérale chez les blés sauvages et modernes	56
1. Introduction bibliographique	56
2. Projet	60
2.1. Sélection des cultivars de blé et des souches microbiennes.....	60
2.2. Disponibilité des ions nutritifs, microbiote et développement racinaire	61
2.3. Communication chimique entre racines et micro-organismes: récolte et analyse des exsudats.....	62
2.4. Vers l'analyse des mécanismes de signalisation et communication.....	64
2.5. Conclusion et perspectives.....	64
Références Bibliographiques.....	65
Liste des publications indexées	82
<i>Curriculum vitae</i>	85
Stages effectués.....	86
Collaborations.....	87
Nationales	87
Internationales.....	87
Contrats de recherche obtenus	88
Etudiants encadrés	89
Etudiants en these	89
Etudiants en Master 2	89
Autres Etudiants	89
Principales publications.....	90
Brevet	91
Lettre de motivation.....	92
Tirés à part.....	93

AVANT PROPOS

J'ai suivi un cursus universitaire classique, avec un DEUG B (obtenu à Angers), suivi d'une License puis d'une Maîtrise de Biochimie et Génétique (à Orsay, Paris XI), d'un DEA et d'une thèse (à Montpellier). J'ai ensuite effectué un post-doctorat pendant 7,5 années, dans une équipe dirigée par Klaas Jan van Wijk, d'abord en Suède puis aux Etats-Unis, avant d'être recruté à l'INRA dans le *Laboratoire de Protéomique Fonctionnelle* (LPF) à Montpellier. Après la fermeture du LPF, j'ai rejoint l'UMR Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes (BPMP) où je travaille actuellement. Le projet que j'ai développé en arrivant à BPMP a pour objectif majeur de déterminer la structure des transporteurs membranaires de Na⁺ et/ou K⁺ appartenant à la famille HKT (pour "High Affinity K⁺ transport"). Ces transporteurs jouent un rôle réellement fondamental dans la tolérance des plantes à la salinité. ***La biochimie des protéines et des structures protéiques constitue le dénominateur commun de l'ensemble de mes activités de recherche, doctorant, post-doctorant et chercheur INRA.***

L'UMR BPMP s'intéresse essentiellement à la nutrition hydrominérale des plantes, au sens large, en relation avec l'adaptation des plantes à l'environnement. Un objectif majeur est la caractérisation et l'analyse de la régulation des systèmes de transport membranaires responsables du prélèvement, à partir du sol, et de la distribution dans la plante des ions nutritifs et de l'eau. Un autre front de science a été ouvert assez récemment dans l'UMR, s'intéressant au développement du système racinaire en tant que processus participant à l'adaptation de la plante aux caractéristiques hydrominérales du sol. Une partie de mon travail, qui a pris progressivement de plus en plus d'importance depuis mon arrivée dans l'UMR BPMP, a eu pour objectif d'élargir ce front de science de façon à prendre en compte l'effet du microbiote rhizosphérique bactérien sur le développement et les fonctions du système racinaire. J'ai choisi de développer cette thématique chez les céréales, en utilisant le blé (dur) comme plante modèle. J'ai travaillé (en particulier en assurant le co-encadrement d'un doctorant puis d'une doctorante) à développer une méthodologie de phénotypage du développement racinaire et des zones pilifères, parce que les poils absorbants jouent un rôle majeur dans les interactions entre le système racinaire et son microbiote, et que l'élongation et la densité des poils absorbants, ainsi que le développement et l'architecture du système racinaire, peuvent être fortement stimulés par des bactéries rhizosphériques. Directement en aval de ce travail, j'ai souhaité initier un programme de recherche sur les mécanismes biochimiques impliqués dans les interactions entre racines et bactéries rhizosphériques, en ciblant dans un premier temps le travail sur l'analyse des composés biochimiques exsudés dans la rhizosphère par les racines. J'encadre un doctorant sur cette thématique. Le projet que je présente dans le cadre de ma candidature à l'*Habilitation à Diriger des Recherches* se situe dans le prolongement de ce travail. De façon plus précise, je souhaite m'intéresser à l'exsudation racinaire chez le blé, en tant que processus de sélection et d'alimentation du microbiote rhizosphérique, aux bénéfices que la plante peut retirer de ces interactions concernant sa nutrition hydrominérale dans différentes conditions de disponibilité des éléments nutritifs, et à l'impact sur les propriétés d'exsudation racinaire qu'ont eu la domestication de la plante puis les programmes d'amélioration sur des sols artificialisés par une fertilisation massive.

* *

*

Je présente rapidement ci-dessous mon parcours scientifique, depuis mon doctorat à mes activités actuelles au sein de l'UMR BPMP (**Chapitre I**).

Je présenterai ensuite:

- le travail conduit en tant que post-doctorant, qui constituera une illustration de l'expérience dont je dispose dans le domaine de la biochimie végétale (**Chapitre II**).
- le travail réalisé depuis mon arrivée dans l'UMR BPMP concernant la production et purification de transporteurs HKT en vue d'analyser leur structure après cristallisation (**Chapitre III**) puis le travail réalisé dans le cadre de l'initiation de la thématique "*Fonctions racinaires et microbiote*" et les premiers résultats obtenus (**Chapitre IV**).

A l'issue de ces sections 3 et 4, je décrirai le projet de recherche que je propose de conduire dans les années à venir, dans le cadre de ma candidature à l'*Habilitation à Diriger des Recherches* (**Chapitre V**).

* * *

*

Chapitre I

Résumé du cursus scientifique

1. Doctorat

Mon travail de doctorat a porté sur les réponses à l'auxine de la H⁺-ATPase de la membrane plasmique de cellules de tabac. J'ai montré qu'un pré-traitement à l'auxine de ces cellules en culture permettait d'isoler une sous-fraction de plasmalemme ayant une sensibilité à l'auxine fortement augmentée (Peltier et Rossignol, 1996) évoquant en perspective la clusterisation potentielle de récepteurs auxiniques à la surface des cellules comme évoquée par Dieckmann et al., 1995. J'ai aussi participé à la création d'un premier répertoire des protéines plasmalemmeiques, anticipant les approches de protéomiques développées par la suite (Rouquié et al., 1997).

2. Post-doctorat

Je suis dans un premier temps parti en post-doc en Suède dans le laboratoire de Klaas Jan van Wijk à l'université de Stockholm pendant 2 ans et demi (1998-2000). Le laboratoire étudiait l'insertion de protéines chloroplastiques dans la membrane thylacoïdienne (Nilsson et al., 1999) mais l'arrivée de la protéomique ouvrait la possibilité d'étudier des compartiments, des structures subcellulaires ou des complexes protéiques encore largement méconnus, comme le lumen des thylacoïdes ou les plastoglobules, dans la perspective de comprendre le rôle de ces compartiments, structures ou complexes en identifiant leurs constituants protéiques, et de préciser l'adressage des protéines codées par le noyau à ce compartiment en étudiant les séquences N-ter de ces protéines.

Dès mon arrivée, bénéficiant en protéomique de la collaboration avec le groupe de Peter Roepstorff au Danemark, j'ai initié ces approches de protéomique descriptive générale sur le lumen mettant en évidence une grande diversité de fonction dans ce compartiment et un nombre insoupçonné de paralogues pour certaines protéines dont le rôle restait à comprendre. L'identification des protéines luménales et donc de leur pré-séquences a permis de fournir un jeu de données utilisé par le groupe de notre collaborateur Gunnar von Heijne pour affiner la prédiction des protéines adressées à ce compartiment à partir de 2 prédicteurs TargetP et SignalP (Peltier et al., 2002). A la suite de cette étape, les protéines formant souvent des multimères, nous nous sommes focalisés sur les complexes protéiques à la fois membranaires et stromaux. Parmi ces complexes, celui de la protéase à sérine Clp a retenu mon attention de par sa complexité encore mal connue, sa structure rappelant celle du protéasome et par son rôle majeur dans le maintien, la régulation et le recyclage des protéines plastidiales (Peltier et al., 2001 ; Peltier et al., 2004a (travail détaillé dans le Chapitre II, § 1 de ce rapport). Fin 2000, KJ van Wijk a obtenu une position à l'université de Cornell aux Etats-Unis et m'a proposé de le suivre. Les thématiques sur les membranes thylacoïdiennes et les complexes stromaux ont été poursuivies (Peltier et al., 2004b ; Friso et al., 2004 ; Peltier et al., 2006). De plus, une structure protéolipidique, le plastoglobule, qui dérive des membranes thylacoïdiennes et dont la fonction et la composition protéique restaient évasives, a été étudiée. Ce travail a révélé que les plastoglobules jouent des rôles importants dans différentes fonctions, entre autres dans le métabolisme des pré-nols, le

recyclage des lipides des thylacoïdes, la synthèse de jasmonate et la séquestration des caroténoïdes dans les chloroplastes (Ytterberg et al., 2006) (Cf. Chapitre II, § 2).

3. Chercheur à l'INRAE: travail conduit dans le Laboratoire de Protéomique fonctionnelle

Fin 2005, j'ai été recruté à l'INRAE dans le laboratoire de protéomique fonctionnelle dirigé par Michel Rossignol à Montpellier. Ma thématique de recherche était le rôle des modifications post-traductionnelles dans la réponse d'*Arabidopsis thaliana* à l'excès de fer. Elle s'inscrivait dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe de Jean-François Briat dans l'UMR BPMP, sur la régulation du transport et du stockage du fer, les rôles de ce métal *in planta* et sa toxicité à forte concentration.

Je me suis focalisé sur 2 modifications post-traductionnelles, la nitrosylation et l'ubiquitination/SUMOylation. En effet, l'excès de fer provoque à la fois une production soudaine et transitoire d'oxyde nitrique et la dégradation *via* le protéasome d'un répresseur du gène AtFer1 codant une ferritine, protéine qui, en complexe (tétra eicosamère (24 ssu)), séquestre le fer (4300 atomes) (Arnaud et al., 2006). Les ferritines sont présentes dans les chloroplastes et les mitochondries (Vigani et al., 2013; Connorton et al., 2017).

L'oxyde nitrique a une durée de vie biologique très courte (5-15 s) parce qu'il est rapidement neutralisé de façon enzymatique (par la GSNO reductase ou la thioredoxine) ou non-enzymatique (par réaction avec l'ascorbate, par trans-nitrosylation ou sous l'effet d'un rayonnement UV). Il modifie les thiols des cystéines (S-nitrosylation) et le groupe hydroxyphényl des tyrosines (nitration des tyrosines). La S-nitrosylation est reconnue comme une modification post-traductionnelle importante impliquée dans la croissance, le développement des plantes et la résistance aux facteurs biotiques et abiotiques (Brouquisse, 2019). De nombreuses techniques ont été développées pour étudier la S-nitrosylation et nous avons utilisé celle du "*Biotin-Switch*" couplée au marquage ICAT (Isotope-Coded Affinity-Tag) afin de sélectionner et quantifier les peptides nitrosylés (Peltier et al., 2014 ; Fares et al., 2014). Nous avons collaboré au sein de l'ANR PIANO avec différentes équipes intéressées elles-aussi par l'identification et la quantification des nitrosothiols (Puyaubert et al., 2014). J'ai encadré sur cette thématique 2 étudiants Charlotte Falk (L3P) et Sébastien Rondeau (M2R) et co-encadré le doctorant Abasse Fares.

Pour l'étude de l'ubiquitination/SUMOylation, nous avons décidé de faire surproduire chez *Arabidopsis*. (à l'aide du promoteur 35S) des étiquettes Ub et SUMO "taguées" (par une séquence de 9His, précédée par un site de clivage par la protéase P3C. Les gènes Ub étant en multicopies y compris au sein d'un même locus et parfois dans la même phase de lecture qu'une protéine ribosomique, le gène codant l'ubiquitine taguée a été synthétisé chimiquement. Des plantes d'*Arabidopsis* sur-exprimant les formes Ub et SUMO taguées ont été obtenues. Nous avons vérifié que les formes taguées étaient retenues sur les colonnes Ni-NTA et pouvaient être identifiées par spectrométrie de masse ESI-MS/MS. Différents stress abiotiques ont été appliqués (stress "*excès de Fer*", stress lumineux, stress hydrique) sur les plantes. L'arrivée tardive des résultats avant la fermeture du LPF couplée à une perte des données brutes des analyses sur les baies de stockage dans les mois qui ont suivi la fermeture n'a malheureusement pas permis de valoriser ce travail de production et d'analyse des plantes transgéniques (qui avait été essentiellement effectué par Sandrine Chay, alors technicienne au LPF).

Le LPF assurait à la fois des missions de recherche et une activité de plateforme de protéomique. Dans le cadre de cette activité de plateforme, il accueillait des projets externes auxquels j'ai participé. Dans le cadre du financement européen ERA-PG "*Protein-Storage*", un projet dit de "*molecular farming*" visant à évaluer les conditions de surproduction de protéines d'intérêt par ingénierie de plantes, nous avons exploité la particularité d'une protéine de stockage du caryopse de maïs, la γ -zein, qui possède un domaine Nter (appelé Zera) riche en proline et capable de former un corps protéique dans le réticulum endoplasmique une fois fusionné avec une protéine d'intérêt. La protéine fluorescente standard DsRed a été utilisée dans un premier temps pour transformer de manière transitoire des cellules de feuilles de tabac en attendant les constructions stables chez *Arabidopsis*. Le but de l'étude était de vérifier l'innocuité pour la plante de surproduire la protéine de fusion et d'en vérifier sa pureté. La protéine de fusion Zera-DsRed a effectivement été surproduite et les corps protéiques pouvaient atteindre des tailles supérieures à la taille des chloroplastes en étant visibles en microscopie optique classique. Nous avons montré que ces corps protéiques étaient formés à 85% de la protéine de fusion, et contenaient aussi environ 200 autres protéines co-purifiées. Il est probable que certaines de ces protéines s'étaient retrouvées piégées au cours de leur transit lors de la formation du corps protéique, et que d'autres se retrouvaient dans le corps protéique à cause du stress induit par la surexpression et l'agrégation, dépassant les capacités de contrôle qualité de la plante (ERQC) (Joseph et al., 2012). La transformation stable de la construction dans *Arabidopsis* n'a pas permis d'atteindre le niveau de production de la transformation transitoire, les plus fortes surproductions impactant fortement la croissance de la plante. Une autre collaboration fructueuse a été initiée avec le groupe de Gérard Cuny, spécialement avec Anne Geiger et Philippe Holzmüller. Ce groupe étudie la trypanosomiase humaine ou maladie du sommeil, parasitose à transmission vectorielle (glossine ou mouche tsé-tsé), présente dans 36 pays d'Afrique subsaharienne et considérée comme mortelle en absence de traitement médical. La maladie est due à un protozoaire, *Trypanosoma brucei gambiense*. Une espèce proche, *T. brucei brucei*, infecte le bétail, et cette trypanosomiase animale est appelée « Nagana ». Une autre espèce, *Trypanosoma cruzi*, est responsable de la maladie de Chagas transmise par une punaise hématophage en Amérique du sud. Le trypanosome passe tout son cycle chez l'hôte en tant que parasite extracellulaire. Pour duper le système immunitaire, il est entièrement recouvert de 5×10^6 dimères d'une protéine glycosylée, la VSG (*Variant Surface Glycoprotein*), qui présente un spectre de variants antigéniques exceptionnel. En effet, le parasite possède un répertoire d'environ 2000 gènes potentiels de VSG exprimés de façon exclusive. Cette couverture glycosylée hypervariable empêche aussi les défenses immunitaires de l'hôte d'avoir accès aux autres protéines membranaires nécessairement invariables. Les protéines sécrétées par le parasite inhibent la maturation des cellules dendritiques et leur aptitude à induire une réponse lymphocytaire. L'étude de ce sécrétome a été initiée par le groupe de G. Cuny pour mieux comprendre les fonctions des protéines sécrétées. Plus de 400 protéines ont été identifiées dont les rôles majeurs étaient la structuration des protéines (chaperones), la dégradation des protéines et le métabolisme des nucléotides. De nombreuses protéines ne possédaient pas de séquences de transit et ne devaient donc pas suivre les voies classiques de sécrétion. De petites vésicules ressemblant à des exosomes (de 50 à 100 nm) ont été mises en évidence avec un rôle potentiel dans l'échange de molécules entre parasites ou dans la manipulation du système immunitaire (Geiger et al., 2010 ; Atyame Nten et al., 2010 ; Geiger et al., 2011).

4. Travail conduit dans l'UMR BPMP

Le LPF a fermé en 2012. J'ai intégré l'équipe *Canaux Ioniques* dirigée par Hervé Sentenac en 2013, puis l'équipe *Transport ionique chez les céréales et adaptation à l'environnement* (TICER, direction Anne-Aliénor Véry) issue de l'équipe *Canaux Ioniques*, pour développer une thématique concernant les relations structure-fonction des transporteurs HKT, une famille de transporteurs d'ions impliquée dans la tolérance des plantes à la salinité. En parallèle, j'ai progressivement développé une seconde thématique, centrée sur les échanges nutritionnels, le dialogue plante-microbiote et l'impact du microbiote sur les fonctions racinaires. J'ai initié cette thématique en co-encadrant un doctorant, Thanyakorn Rongsawat (soutenance de la Thèse en décembre 2019; Dir. Thèse: Hervé Sentenac), et je poursuis ce travail en co-encadrant actuellement 2 doctorants, Houssein Zhour (Dir. Thèse: Hervé Sentenac) et Ikram Madani (Dir. Thèse: Anne-Aliénor Véry). Mon projet de recherche, présenté avec cette candidature à l'HDR, se situe dans le cadre général de cette thématique et est construit sur la base des résultats que nous avons obtenus avec Thanyakorn, Houssein, Ikram, Hervé et Anne-Aliénor, au cours de ces cinq dernières années.

* *

*

Je décris maintenant le travail conduit au cours de mon post-doctorat (Chapitre II), illustrant l'expérience que j'ai acquise en biochimie végétale, puis je détaillerai l'état d'avancement du projet concernant la cristallisation des transporteurs HKT (Chapitre III), avant de présenter les résultats obtenus concernant la thématique "*Microbiote et fonctions racinaires*" (Chapitre IV), et le projet que je propose aujourd'hui dans ce cadre (Chapitre V).

Chapitre II

Travaux en post-doctorat et expérience en biochimie

L'essentiel de mon travail en post doctorat a porté sur la structure et fonction de la protéase CLP (§ 1 ci-dessous) et des plastoglobules (§ 2). Je me suis efforcé de présenter le travail et les résultats obtenus dans le cadre des connaissances actuelles dans ces domaines.

1. Structure et fonction de la protéase CLP

1.1. Introduction

Les plastes sont des organites uniques provenant probablement d'une ancienne endosymbiose avec une cyanobactérie. Ils peuvent modifier leur structure et leur fonction en réponse aux stimulus développementaux et de nombreux types de plastes ont été décrits (Pinard & Mizrachi, 2018). Les chloroplastes sont un type de plaste et sont le site de divers processus métaboliques dont la photosynthèse (voir Figure II.1). Les proplastes sont totipotents et se trouvent dans les cellules méristématiques. Ils se différencient en de nombreux types de plastes, tels que les chloroplastes dans les feuilles et autres organes verts de plantes, les étioplastes dans les semis gardés au noir, les chromoplastes dans les pétales et les fruits mûrs, les amyloplastes dans les racines et tubercules, les élaïoplastes dans les grains de pollen, et les gérontoplastes dans feuilles sénescences. La plupart d'entre eux sont interconvertibles (Jarvis et Lopez-Juez, 2013). Le chloroplaste sert de site à la photosynthèse et est donc indispensable pour la croissance et le développement des plantes. Environ 4 000 protéines présentes dans les chloroplastes sont codées par le noyau. Cependant, jusqu'à présent, environ 2000 protéines non redondantes ont été identifiées dans le chloroplaste, appartenant à trois compartiments: stroma (~344 protéines), thylakoïdes (~400) et membranes de l'enveloppe (~400) (Wang et al., 2016) ; les autres sont des protéines ribosomiques et des protéines des nucléoïdes. Seules 120 à 130 protéines sont codées par le génome chloroplastique, et la plupart sont des composantes de la machinerie d'expression génique de l'organelle et de son appareil photosynthétique (Kmiec et al., 2014).

Pour une activité photosynthétique optimale, le protéome chloroplastique doit être correctement façonné et entretenu grâce à des mécanismes régulés de protéolyse et de contrôle de la qualité des protéines. Approximativement 616 gènes de protéases sont codés par le génome d'*Arabidopsis* (Kmiec et al., 2016). Jusqu'à présent, environ une vingtaine de protéases chloroplastiques comprenant plus de 50 composants ont été caractérisées. Beaucoup de protéases chloroplastiques sont d'origine bactérienne, et trois d'entre elles sont dépendantes de l'ATP (phénotype à filament long [Lon], filamentation sensible à la température H [FtsH] et protéase caséinolytique [Clp]), mais ont subi des diversifications fonctionnelles durant l'évolution (Teixeira et Glaser, 2013; Kmiec et al., 2014; Adam, 2015; van Wijk, 2015; Nishimura et al., 2016).

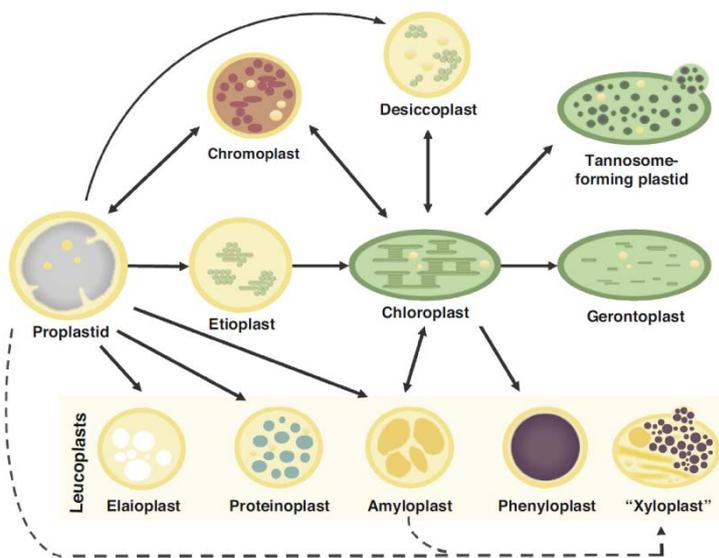


Figure II.1 : Les différents types de plastides décrits à ce jour et dérivant directement ou indirectement de la structure présente dans les méristèmes à savoir les proplastides (Pinard & Mizrahi, 2018). En dehors des plastides les plus connus, les elaioplastes présents souvent dans les graines et dans les cellules du tapetum stockent des lipides dans les plastoglobules (Solymosi et al., 2012); les proteinoplastes, aussi appelés aleuoplastes, stockent des protéines dans différents tissus au cours du développement ; les dessicoplastes ou xéroplastes présents chez les plantes dites de la résurrection comme *Selaginella lepidophylla* ou *Xerophyta humilis* passent par un stade proche des étioplastides avant de reverdir en chloroplastes fonctionnels (Solymosi et al., 2013), les phenyloplastes ont été décrits dans les gousses de vanille ou s'accumulent du 4-O-(3-méthoxybenzaldehyde) β -D-glucoside, un glucoside phénolique (Brillouet et al., 2014) ; les xyloplastides présents dans les tissus vasculaires secondaires sont le siège de la synthèse de précurseurs importants dans la production de monolignol (Pinard & Mizrahi, 2018); les plastides générateurs de tannosomes sont présents chez les trachéophytes et accumulent des tannins encapsulés, constituant des structures appelées tannosomes, qui voyagent des plastides à la vacuole (Brillouet et al., 2013).

Les chloroplastes ont des protéases à sérine, des métalloprotéases et des protéases à aspartyl, dont les deux premières sont les principaux constituants. Sur la base des rôles physiologiques, les protéases chloroplastiques peuvent être classées en deux catégories fonctionnelles: (1) la biogenèse des protéines chloroplastiques et (2) le remodelage / maintien du protéome chloroplastique. Les protéases restantes (3), non impliquées dans ces deux fonctions, n'ont pas de fonction identifiée pour le moment. Les protéines photosynthétiques codées par le noyau sont synthétisées sous forme de préprotéines dans le cytosol et sont ensuite "transloquées" dans le stroma à travers les complexes dits translocons au sein des membranes d'enveloppe externe et interne des chloroplastes (TOC / TIC) (Jarvis et Lopez-Juez, 2013). La peptidase stromale de clivage des pré-séquences (SPP) clive les signaux N-terminaux d'importation dans le chloroplaste, à savoir les peptides de transit de ces préprotéines importées (Teixeira et Glaser, 2013). Les peptidases de fragmentation des pré-séquences (PreP1 et PreP2) et l'oligopeptidase organellaire (OOP) dégradent ensuite les fragments peptidiques clivés (Kmieć et al., 2014). Les protéines thylacoïdiennes sont transférées vers leurs destinations finales via la voie SEC (sécrétoire), SRP (particule de reconnaissance de signal), TAT (translocation à double-arginine) ou par

des voies spontanées (Jarvis et Lopez-Juez, 2013). Leur signal de transfert thylacoïdien (TTS) est clivé par la peptidase1 pour signal plastidique de type I (Plsp1; anciennement connue sous le nom de peptidase thylacoïdienne de traitement [TPP]) (Teixeira et Glaser, 2013). Les protéines nouvellement synthétisées codées par les chloroplastes sont soumises à une excision de la méthionine N-terminale (NME) par les MAP (aminopeptidases à méthionine) et les PDF (déformylases de peptide) (Giglione et Meinnel, 2001). La sous-unité D1 du centre de réaction du photosystème II (PSII) subit un traitement C-terminal par la peptidase de traitement C-terminal (CtpA) (Teixeira et Glaser, 2013). Des voies de protéolyse supplémentaires semblent fonctionner dans les chloroplastes. Les protéases rhomboïdes sont considérées comme participant à la protéolyse intramembranaire régulée (RIP) dans l'enveloppe intérieure du chloroplaste (Adam, 2013, 2015). Le RIP est une voie conservée par laquelle les protéines régulatrices intégrées à la membrane sont libérées protéolytiquement de la membrane pour induire la transduction d'un signal (Chen et Zhang, 2010). Trois protéines de la famille des proteases site-2 (S2P) chloroplastiques, une thylacoïdienne, EGY1/2 (déficient en gravitropisme dépendant de l'éthylène et jaune-vert 1/2), et une de l'enveloppe, AraSP (Arabidopsis S2P), semblent également être impliquées dans la RIP (voir Tableau II.1).

Trois protéases de type procaryote, FtsH, Deg et Clp (la cible principale du travail que j'ai effectué dans ce domaine de recherche), jouent un rôle clé dans le recyclage et le maintien des protéines chloroplastiques. L'exemple le plus connu est le contrôle de la qualité de la sous-unité D1 photo-endommagée dans le cycle de réparation du PSII (Nath et al., 2013). Ce processus implique les actions concertées des protéases thylacoïdiennes FtsH et Deg. Des expériences génétiques et biochimiques récentes ont révélé la contribution de modifications post-traductionnelles dans ce processus de réparation (Kato et Sakamoto, 2014). Enfin, la protéase CND41 dégradant la rubisco est un exemple de contrôle protéolytique de l'enzyme métabolique âge-dépendant pendant la transition du chloroplaste au gérontoplaste (van Wijk, 2015) (voir Tableau II.1).

1.2. Organisation fonctionnelle générale du complexe Clp

Clp est le complexe multihétéromérique de dégradation des protéines stromale de type sérine dépendant de l'ATP. Le système Clp a des unités fonctionnelles distinctes: un complexe hexamérique de chaperones AAA + (ATPase associé à diverses activités cellulaires) pour la reconnaissance, le dépliage et la translocation du substrat, et un noyau protéolytique tétradécamérique avec des triades sérine-histidine-aspartate pour la dégradation. Les chaperones Clp et les architectures du noyau les plus primitifs se trouvent dans les protéobactéries (par exemple, *Escherichia coli*). Le système chloroplastique Clp a acquis deux protéines accessoires pour l'assemblage, la stabilisation et l'activation du cœur protéolytique, et un adaptateur binaire pour la régulation de la reconnaissance et de la présentation du substrat.

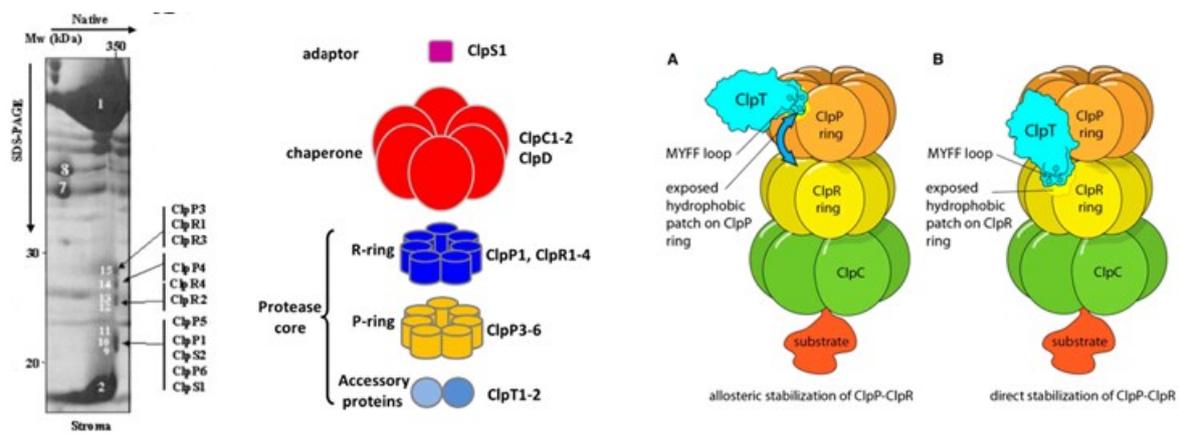


Figure II.2 : Organisation du complexe Clp dans les plastides. Clp est formé de la juxtaposition d'un anneau de chaperones sur un double anneau protéolytique (CP). Le CP est la forme la plus stable du complexe et peut-être purifié biochimiquement sur gel natif BN-PAGE, avec une masse moléculaire proche de 350 kDa (photo de gauche). Un premier anneau hexamérique de chaperones permet avec l'adaptateur ClpS1 de présenter et insérer les substrats dans la chambre catalytique (core protéolytique) formée de deux anneaux heptamériques reliés par des protéines accessoires ClpT1-T2. Un modèle d'interaction possible entre ClpT et le core est proposé où ClpT stabilise directement les 2 anneaux heptamériques (modèle B à droite) ou de façon allostérique (modèle A à gauche) après changement de conformation d'une des sous-unités (d'après Peltier et al., 2004a ; Nishimura et vanWijk, 2015 et Olinares et al., 2011).

Les chaperones ClpC1, C2 et D existent principalement en tant qu'homohexamères individuels (Nishimura et van Wijk, 2015). Chaque composant possède un domaine N-terminal (domaine N) liant l'adaptateur, des modules doubles d'hydrolyse ATP qui déplient et transloquent le substrat dans la chambre protéolytique, des motifs IGF et R pour l'association chaperone-noyau, et un motif uvrB / C de fonction indéterminée. Le motif uvrB / C manque dans ClpD et les prototypes bactériens (Nishimura et van Wijk, 2015) (Figure II.2). Toutes les composantes du complexe Clp (core CP et chaperones) sont codées par le noyau et adressées au plaste grâce à une pré-séquence appelée peptide de transit. Seule la sous-unité ClpP1 est codée par le génome chloroplastique et il est intéressant de noter que même dans les plastides résiduels des plantes parasites où de nombreuses protéines codées par le génome chloroplastique ont disparu, ClpP1 est maintenue montrant à la fois le rôle non substituable de cette sous-unité dans le fonctionnement et/ou l'assemblage du complexe et le rôle plus globalement indispensable du complexe Clp dans les plastides.

Une structure haute résolution a été obtenue par RMN et cristallographie aux rayons X pour les composants Clp de bactéries non photosynthétiques, y compris pour le noyau Clp, les chaperones et les domaines d'interaction entre ClpS et les chaperones (Kress et al., 2009). Jusqu'à présent, aucune structure à haute résolution n'a été déterminée pour les composants Clp dans les organismes photosynthétiques; toutefois il est très probable que de nombreux aspects structuraux soient conservés. Basé sur les données structurales d'*E. coli*, nous avons généré un modèle d'homologie pour le core Clp d'*Arabidopsis* et le complexe des chaperones (Peltier et al., 2004a). L'information structurale pour les complexes Clp de

base chez les bactéries a montré que le pore d'entrée flexible mesure $\sim 10-17 \text{ \AA}$ et est trop étroit pour l'entrée des protéines natives dans la chambre protéolytique (Wang et al., 1997). Les résidus catalytiques de la protéase font face à la cavité centrale; cette séquestration de l'activité protéolytique évite la dégradation non spécifique de protéines. Chez les bactéries, il a été fermement établi que les substrats sont dégradés en fragments peptidiques plus petits de 5 à 10 acides aminés de longueur à l'intérieur de la cavité centrale (Striebel et al, 2009) et sont ensuite éjectés par des pores latéraux étroits et dynamiques. La modélisation par homologie de séquences avait déjà suggéré de tels pores dans le core Clp chloroplastique avant ces données chez les Clp bactériens (Peltier et al., 2004a). Chez les bactéries, il a été démontré que seul le noyau de protéase présente une activité de dégradation lente des petits peptides (moins de 6 acides aminés de long) mais il nécessite la composante chaperone pour la protéolyse de peptides ou de protéines plus longs. L'hydrolyse d'ATP est toujours nécessaire pour la dégradation des protéines mais pas des peptides (Woo et al., 1989). La protéase Clp présente plusieurs similitudes organisationnelles avec le protéasome 26S (Wickner et al., 1999) (Figure II.3).

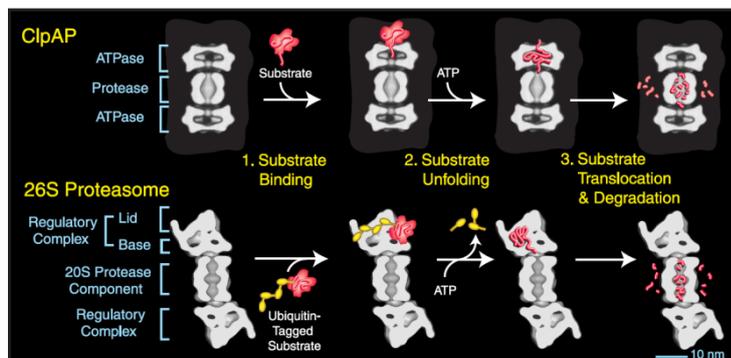


Figure II.3 : Comparaison de l'organisation des 2 protéases majeures du cytoplasme/noyau (protéasome) et des plastes (Clp). Les protéasomes sont présents chez les eucaryotes, les archées et chez certaines bactéries. La symétrie double du core protéolytique (CP) est très conservée avec sa structure en tonneau/barrique composée de 4 anneaux empilés. Le canal central permet aux substrats étroits de pénétrer les anneaux les plus externes formés de 7 sous-unités α . Les anneaux les plus internes forment une chambre là encore étroite abritant les sites protéolytiques actifs et sont composés de 7 sous-unités β . Les sous-unités α comportent une extension en N-term très conservée et absente chez les sous-unités β . Ces extensions N-ter forment une barrière contrôlant le passage des substrats au travers du canal formé par l'ensemble des sous-unités. Les archées et les bactéries ont généralement un seul type de sous-unités α et β , chacune présente donc en 14 copies dans chaque CP. Il existe alors 14 sites actifs dans la chambre centrale alors que chez les eucaryotes, les 14 sous-unités α et β sont toutes différentes, constituant des paralogues. L'extension Nter des sous-unités α eucaryotiques est responsable de la fermeture de l'anneau formé par les α qui est sous le contrôle d'activateurs pour son ouverture. Seulement 3 des 7 sous-unités β eucaryotiques comportent un site actif opérationnel entraînant seulement la présence de 6 sites actifs par complexe. Le proteasome est une protease à thréonine, ce résidu étant situé à l'extrémité Nterm de la sous-unité β et fait partie de la triade conservée Thr-Lys-Asp impliquée dans tous les processus catalytiques. Ces sous-unités β sont activées après un processus autocatalytique de leur propeptide en Nter. Chez les eucaryotes, l'assemblage du complexe CP est dépendant de l'anneau α dont la formation est assistée par 4 chaperones Pba/PAC 1-4 et de UMP1/POMP une chaperone responsable de l'incorporation des sous-unités β et de l'assemblage du demi-mer. Chez les eucaryotes, les sous-unités α semblent s'auto-assembler et certaines sont même

capables de former des homoheptamères cependant rapidement dé-assemblés en présence d'autres sous-unités α . La présence des chaperones d'assemblage PAC1-2 puis PAC3-4 semblent jouer un rôle dans l'assemblage du CP mais la chronologie séquentielle exacte d'incorporation des différentes sous-unités α n'est pas connue. Chez la levure comme chez l'homme, seule la sous-unité $\alpha 3$ est non essentielle et peut-être remplacée par $\alpha 4$ donnant alors un protéasome « $\alpha 4$ - $\alpha 4$ ». Concernant les sous-unités β , elle sont ajoutées séquentiellement à un anneau α préformé et $\beta 2$ est incorporée en premier, suivie de $\beta 3$, $\beta 4$, $\beta 5$, $\beta 6$, $\beta 1$ puis en dernier $\beta 7$ (Hirano et al., 2008). Le N-Ter et C-ter de différentes sous-unités β jouent le rôle de chaperones intramoléculaires. En particulier, le C-ter de $\beta 2$, anormalement long dicte la direction et la spécificité de l'assemblage des autres sous-unités β . Le propeptide N-ter de $\beta 5$ aide avec la chaperone Ump1 au clivage des propeptides et à l'assemblage des 2 moitiés de CP avec le C-ter de $\beta 7$. (Li et al., 2016). Chez les mammifères, différents CP ont été décrits où le protéasome 20S constitutif a été remplacé par des formes alternatives dans des tissus particuliers avec des paralogues de certaines sous-unités induites. L'immuno-protéasome est le variant le plus étudié. Trois sous-unités β sont substituées dans ce CP. $\beta 1i$, $\beta 2i$ et $\beta 5i$ remplacent leurs équivalents. Ces sous-unités β alternatives sont environ 60% identiques aux sous-unités β équivalentes classiques. L'immuno-protéasome altère la population de peptides générés pour la présentation des antigènes par le CMH de classe I. De plus, les voies d'assemblage des protéasomes alternatifs diffèrent aussi des CP constitutifs. $\beta 1i$ et $\beta 2i$ sont par exemple incorporées avant toutes les autres sous-unités β (Bai et al., 2014). Certains immunoprotéasomes peuvent présenter un mélange de sous-unités β classiques et alternatives. Par ailleurs certains protéasomes peuvent présenter des substitutions de sous-unités α (ex $\alpha 4$ vs $\alpha 3$) dans le cas de stress oxydatifs (Padmanabhan et al., 2016). D'autres exemples comme le spermatoprotéasome contient une sous-unités α alternative ($\alpha 4s$) synthétisée exclusivement dans les cellules germinales mâles après leur différenciation en spermatozoïdes (Uechi et al., 2014). Le protéasome testiculaire contient une sous-unités $\alpha 6T$ essentielle pour la fertilité chez les drosophiles (Zhong et al., 2007). Chez Clp, le CP est composé de 2 anneaux heptamériques contre 4 chez le protéasome. L'un de ces anneaux est composé de sous-unités entièrement actives (ClpP) et l'autre de sous-unités majoritairement inactives (ClpR) (voir partie ci-dessous). En effet, dans l'anneau R, 3 des 7 sous-unités sont actives (ClpP1) rappelant, de fait, les anneaux de sous-unités β dans le protéasome eucaryote qui correspondent par contre aux anneaux protéolytiquement actifs.

1.3. Assemblage et stoechiométrie au sein du complexe Clp

La composition et l'organisation du core protéolytique (CP) de la protéase Clp natif des plastes végétaux ont été étudiées assez en détail pour les chloroplastes d'*Arabidopsis thaliana*. Les mitochondries des eucaryotes possèdent elles aussi un complexe Clp dont la structure est proche du Clp bactérien. Une seule sous-unité (Clp P2) forme les 2 anneaux heptamériques du core protéolytique et ClpX est la chaperone associée permettant le débobinage actif et l'avancée des substrats dans la chambre du CP. La taille du complexe CP dans les mitochondries de la pomme de terre est légèrement inférieure à celle du complexe présent dans les plastes (Peltier et al., 2004a). Le noyau Clp a également été étudié en détail dans les algues vertes *Chlamydomonas*. Ces neuf protéines ClpPR différentes forment également des complexes ClpPR dans les plastes non photosynthétiques des racines et dans les leucoplastes dans les pétales de *Brassica rapa* et *Brassica oleracea* respectivement (Peltier et al., 2004a). Ainsi, il semble que Clp soit présent dans tous les types de plastes végétaux comme enzyme macromoléculaire avec des niveaux d'accumulation totaux influencés par le développement et l'organe. Grâce à l'utilisation du marquage d'affinité *in vivo* et de la purification du complexe ClpPRT complet, utilisant l'étiquetage ClpR4 et ClpP3-StrepII suivi d'une quantification absolue (QConCat) par

spectrométrie de masse, il a été déterminé que la stœchiométrie pour l'anneau P est ClpP3: P4: P5: P6 = 1: 2: 3: 1, alors que le rapport pour l'anneau R est ClpP1: R1: R2: R3: R4 = 3: 1: 1: 1: 1 (Olinares et al., 2011) (Figure II.4).

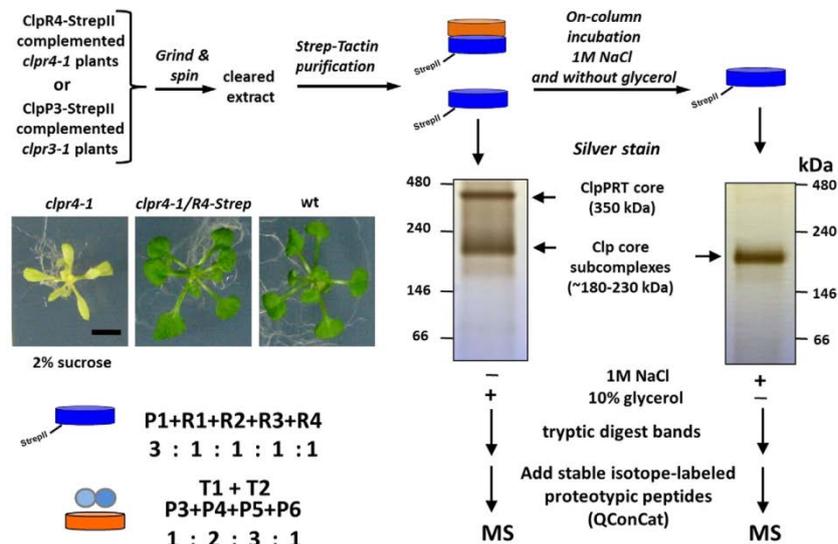


Figure II.4 : Détermination de la stœchiométrie des sous-unités (ssu) du core catalytique du complexe Clp. Deux ssu (ClpR4 et P3 ont été "taguées" (Strep-tag) et après purification 2 complexes sont visibles sur gels natifs, un correspondant au complexe catalytique entier, l'autre à l'anneau contenant la ssu. Le core peut être entièrement déstabilisé par incubation dans NaCl 1 M sans glycérol. La stœchiométrie des 2 anneaux a été déterminée par analyse MS/MS en utilisant des peptides concaténés marqués (^{13}C -K, ^{13}C -R) QConCat (29 peptides + contrôle) (d'après Olinares et al., 2011).

Ainsi l'anneau P contient sept sites catalytiques, et le cycle R ne contient que trois sites catalytiques. L'anneau R dans les plastides a un rapport ClpP: ClpR de 3: 4, ce qui n'est pas sans rappeler des rapports de sous-unités actifs / inactifs du noyau cyanobactérien ClpP3 / R et le protéasome eucaryote 20S (Olinares et al., 2011). Un pareil rapport 3: 4 actif: inactif peut refléter une limitation structurelle / fonctionnelle de la stœchiométrie de ces mécanismes protéolytiques. On ne sait pas ce qui arriverait à l'activité centrale de ClpPR dans les plastides si le nombre de sites actifs dans le cycle P était réduit. La comparaison de séquences primaires montre que les sous-unités ClpP partagent des identités de séquence entre 24 et 48%, alors que les protéines ClpR ont 28 à 38% d'identités entre elles (Kim et al., 2009), suggérant des divergences fonctionnelles même au sein des sous-familles ClpP et ClpR. Cependant, quelles sous-unités ClpP et ClpR interagissent entre elles dans chaque anneau est inconnu et une homogénéisation extensive n'a pas suggéré une orientation préférentielle au sein des anneaux ClpPR (Peltier et al., 2004a). Il a été proposé que les protéines ClpT soient essentielles pour faciliter l'association entre le cycle P et le cycle R (Sjögren & Clarke, 2011), en partie parce qu'il n'y a pas de doubles mutants pour ClpT1 et ClpT2. En revanche, Kim et al. 2015) ont obtenu des mutants doubles viables chez *Arabidopsis*. La raison pour laquelle aucun double mutant n'a été récupéré est probable que ClpT1 et ClpT2 sont situés étroitement ensemble sur le même chromosome entraînant des taux de ségrégation non mendéliens dans la descendance de ces croisements. Il a été suggéré que ClpT1 s'attache au cycle P pour former un complexe stable, qui se lie ensuite à

ClpT2. Par la suite ce complexe ClpP-T1, T2 s'associe alors avec l'anneau R pour former le noyau de protéase tétradécamérique. L'ajout de protéines recombinantes ClpT1,2 au stroma de type sauvage a augmenté la quantité de ClpPR sur les gels natifs, ce qui suggère que la disponibilité des ClpT est le facteur limitant pour la formation du complexe ClpPR. Il a également été émis l'hypothèse que l'assemblage dirigé par ClpT1,2 permet la régulation de l'action protéolytique de ClpPR en réponse au besoin de protéolyse intraplastidienne. Dans ce modèle, la plupart des anneaux ClpP et ClpR résideraient en tant qu'anneaux individuels dans le stroma, et ils s'assembleraient à l'aide de ClpT1,2 en cas de besoin accru (Clarke, 2012). Cependant, ce modèle est hautement spéculatif. Il a été récemment rapporté que ClpT1 recombinant peut interagir avec ClpC2 recombinant *in vitro* (Colombo et al., 2014) mais cette interaction n'a pas été confirmée (van Wijk, communication personnelle). Les sous-unités ClpP catalytiquement actives (ClpP3 à ClpP6) et les ClpR (ClpR1 à ClpR4) ont une extension C-term étendue (jusqu'à 52 aa de longueur) qui ne sont pas protéolytiquement enlevées lors de l'assemblage du core. Ces extensions sont prédites comme se repliant au sommet des anneaux, et affectant ainsi potentiellement l'interaction avec les chaperones (Peltier et al., 2004a). Plusieurs sous-unités ClpPRT ont des masses observées plus petites que celles prédites après l'élimination des cTP, ce qui pourrait résulter d'un traitement N-terminal supplémentaire des sous-unités Clp, suite au clivage des cTP, et pourrait faire partie d'un mécanisme pour l'assemblage de noyau ClpPR. Chez *E. coli*, l'extrémité N-terminale de ClpP est autocatalytiquement clivée mais il n'est pas clair comment cela se rapporte à l'auto-processus d'assemblage. Une courte séquence d'insertion (9–10 aa) (nommée insertion L1) est trouvée dans ClpR1, ClpR3 et ClpR4, mais pas dans les sous-unités ClpR2 et ClpP, et il a été proposé qu'elle influence l'entrée du substrat dans la cavité catalytique sur la base de l'homologie de séquence avec ClpP d'*E. coli* (Peltier et al., 2004a).

La reconnaissance et la délivrance du substrat peuvent être modulées par ClpS1, protéine conservée évolutivement qui interagit spécifiquement dans les plastes avec ClpF (Nishimura et al., 2013, 2015). Ensemble, ClpS1 et ClpF constituent le système d'adaptateur binaire (Nishimura et al., 2015). ClpS est nécessaire et suffisant pour la reconnaissance et la délivrance du substrat dans les bactéries. L'existence d'un adaptateur binaire spécifique aux plastes peut indiquer un mécanisme de régulation complexe qui affine le paysage du protéome plastidique (Nishimura et al., 2015). ClpS se compose de deux domaines fonctionnels: une extrémité N non structurée pour le transfert du substrat vers le pore de la chaperone et un domaine C-terminal pour la liaison du substrat avec la chaperone (Dougan et al., 2002; Zeth et al., 2002; Erbse et al., 2006; Rivera-Rivera et al., 2014). Par ailleurs, l'autre protéine adaptatrice ClpF participe à la reconnaissance et à la délivrance du substrat à la chaperone de manière interdépendante de ClpS1 (Nishimura et al., 2015). Elle possède une région N-terminale caractéristique impliquée dans la liaison ClpS1-substrat-ClpC, un motif uvrB / C également requis pour l'association avec ClpC et un domaine de type YccV non caractérisé fonctionnellement. Cette protéine est spécifique des plastes mais son motif uvrB / C et son domaine de type YccV se retrouvent dans des protéines de maintenance / réplication du génome bactérien ancien (c'est-à-dire UvrB / C et YccV) qui ne sont plus présentes chez les eucaryotes. Ainsi, la structure protéique en mosaïque de ClpF semble avoir été générée par la restructuration du génome pendant l'endosymbiose (c'est peut être un exemple de recyclage du génome contribuant à la génèse de nouveaux composants cellulaires et de systèmes biologiques).

Le noyau tétradécamérique est composé de deux cycles heptamériques à savoir le cycle P, comprenant les sous-unités ClpP3-P6, et le cycle R, composé des protéines ClpP1

et ClpR1-R4 (les ClpR n'ont pas les triades catalytiques) avec 2 protéines accessoires ClpT1 / 2 spécifiques des plantes (Peltier et al., 2004a). Les préférences de liaison entre sous-unités peuvent expliquer le seul arrangement / position de sous-unités dans le complexe central Clp (Dong et al., 2013). ClpT1 monomère se lie au cycle P, formant un complexe de cycle P / T1 stable, qui interagit avec le monomère ClpT2 pour former un cycle P / T1 / T2 (Sjögren et Clarke, 2011; Clarke, 2012). Ce mécanisme permet l'amarrage des anneaux en R et la stabilisation du complexe de base assemblé pour la protéolyse (Peltier et al., 2004a; Sjögren et Clarke, 2011; Clarke, 2012; Kim et al., 2015). ClpT1 / 2 ressemble au domaine N des chaperones ClpC / D à la fois en séquence et en structure (Peltier et al., 2004a; Kim et al., 2015). ClpT semble être principalement présent sous forme de monomère (Colombo et al., 2014). Les chaperones Clp peuvent s'accrocher avec l'anneau R mais pas l'anneau P (Sjögren et Clarke, 2011; Nishimura et van Wijk, 2015). On ne sait pas comment l'amarrage du noyau des chaperones Clp est régulé. Fait intéressant, ClpT interagit avec les chaperones ainsi qu'avec le noyau Clp P/R (Colombo et al., 2014). Plusieurs protéines cibles de Clp dépendantes *in vivo* du contexte ont été identifiées. Elles comprennent une ATPase de type P transportant le cuivre (PAA2 / HMA8), une enzyme de la voie des isoprénoides (désoxyxylulose 5-phosphate synthase) et des enzymes de la voie métabolique du tétrapyrrole (chlorophyllide a oxygénase et glutamyl-ARN réductase) (Nakagawara et al., 2007; Nishimura et al., 2013; Tapken et al., 2015; Apitz et al., 2016; Pulido et al., 2016). La protéase Clp est localisée aussi dans l'enveloppe par interaction avec une protéine d'interaction avec l'enveloppe intérieure Tic110 et participe probablement au contrôle de la qualité de la translocation des protéines à travers l'enveloppe intérieure (Sjögren et al., 2014; Flores-Pérez et al., 2016; Huang et al., 2016). Les conséquences physiologiques de l'absence de Clp sont résumées dans Nishimura et van Wijk (2015). La suppression conditionnelle de la protéase Clp chloroplastique algale remodèle le paysage du transcriptome nucléaire, éventuellement par la transmission du signal chloroplaste-à-noyau, induisant le déploiement d'une réponse autophagique et protéique par le chloroplaste (Ramundo et al., 2014). L'existence d'un mécanisme similaire dans les chloroplastes des phanérogames attend confirmation.

1.4. Conséquences visibles de la perte des fonctions Clp pour le développement, la croissance et la reproduction

Chez les eubactéries, Clp est dispensable dans des conditions de croissance normales, tandis que le complexe cyanobactérien ClpP3 / R, mais pas le complexe ClpP1/P2 est essentiel à la viabilité cellulaire (Clarke et al., 1998). Des études de génétique inverse pour la plupart des sous-unités ClpPR d'*Arabidopsis* codées par le noyau, et pour les trois chaperones Clp et ClpS1 (pour revue Nishimura et al., 2015) et ClpP1 codées par le plaste dans le tabac (Kuroda et al., 2003), ont démontré l'implication du système Clp dans l'embryogenèse, la croissance des plantes ou des cellules, la biogenèse du plaste et protéostasie plastidienne. Les doubles et triples mutants Clp chez *Arabidopsis* ont clarifié les redondances de protéines ainsi que les fonctions clé de Clp. Dans le cas des sous-unités ClpPR, les phénotypes les plus forts sont observés pour les protéines Clp à 2 ou 3 copies par complexe (ClpP1, ClpP4 et ClpP5). La perte de ClpP4 ou ClpP5 entraîne l'arrêt du développement embryonnaire au stade globulaire; par conséquent, les graines sont très petites, ratatinées, et ne peuvent pas germer, même si des sucres sont ajoutés au milieu. Dans les espèces où une inactivation ciblée des gènes des plastes est possible (tabac et *C. reinhardtii*), les mutants nuls ClpP1 n'ont pas pu être récupérés, indiquant ClpP1 elle aussi

est essentielle pour la viabilité (Shikanai et al., 2001). Les allèles nuls pour ClpR2, ClpR4 et ClpP3 (chacun est en monocopie par complexe) ont chacun une embryogenèse retardée, des embryons blancs et des graines plus petites que les plantes de type sauvage (Rudella et al., 2006 ; Kim et al., 2013). Des graines de ces allèles nuls peuvent germer dans des conditions autotrophes, mais le développement des semis reste arrêté au stade cotylédon. Ce n'est que lorsque des sucres sont ajoutés au milieu que ces mutants développent de vraies feuilles. En cas de mutants nuls ClpR2 et ClpR4, ces plantes cultivées de façon hétérotrophe ne forment pas de graines viables. Par contre, dans le cas des mutants ClpP3 nul, les plantes finissent par verdier, fleurissent et finalement (après environ 6 mois) produisent des semences viables. Aucun mutant nul pour ClpP6 n'est disponible mais un phénotype similaire à celui de ClpP3 est attendu. Les lignées "antisens" ClpP6 présentent un phénotype vert pâle atténué pendant la maturation des feuilles (Sjögren et al., 2006). Les mutants ClpR1 perte de fonction sont très différents des autres mutants ClpPR et ont des phénotypes relativement faibles, présentant un aspect virescent mais une fertilité normale (Kim et al., 2009). Ce phénotype modéré est dû à une substitution fonctionnelle partielle par ClpR3. Aucun mutant perte de fonction pour ClpR3 est disponible et les allèles de perte de fonction pourraient avoir des phénotypes comme l'un des mutants ClpR1,2,4. Enfin, les doubles mutants pour les gènes ClpPR (*clpr1xclpr2-1*; *clpp3-1xclpr2-1*) présentent une forte synergie des phénotypes, y compris ceux impliquant ClpR1, malgré ses caractéristiques relativement faibles mais toujours facilement visibles (Kim et al., 2009). Ces observations montrent que la plupart, sinon la totalité des sous-unités de noyau Clp du plastide ont des contributions structurelles et/ou fonctionnelles distinctes. Des mutants uniques pour chacun des ClpT1 et -T2 sont d'apparence normale, mais le double mutant montre un phénotype visible (Kim et al., 2015). L'allèle nul ClpC1 montre un phénotype vert pâle à tous les stades de développement (Sjögren et al., 2004), alors que les allèles nuls ClpC2 et ClpD n'ont pas de phénotype visible (Park & Rodermel, 2004). Ce phénotype vert pâle persiste même chez les feuilles plus âgées, contrastant nettement avec les phénotypes foliaires dont le développement est affecté chez les mutants ClpPR viables; les raisons de cette différence d'impact sur le développement ne sont pas claires. La perte complète des deux protéines ClpC entraîne la létalité embryonnaire, mais la surexpression de ClpC2 complémente le phénotype de délétion ClpC1 (Kovacheva et al., 2007). De plus, étant donné l'identité élevée de leur séquence, ces observations indiquent que les protéines ClpC partagent des fonctions essentielles. Les phénotypes visibles distincts entre les deux ClpC1,2 chez les mutants perte de fonction peuvent être largement attribués à leurs niveaux d'accumulation. De manière cohérente, les niveaux de ClpC2 sont augmentés dans le mutant ClpC1 perte de fonction (Sjögren et al., 2014). L'expression du gène ClpD est sous le contrôle d'un activateur de transcription homéodomaine à doigt de zinc qui est induit par la sécheresse, une salinité élevée et l'acide abscissique. Lors de la déshydratation en particulier, cet activateur de transcription se lie à la région du promoteur ClpD qui contient un élément cis inductible (Tran et al., 2007). La protéine ClpD s'accumule non seulement lors de la sénescence des feuilles mais aussi dans les feuilles plus jeunes. L'implication et la fonction ClpD dans l'homéostasie du protéome plastidique nécessitent des investigations plus approfondies. Le mutant perte de fonction pour ClpS1 (*clps1*) n'a pas de phénotype de croissance visible évident, et ne montre pas de phénotypes d'interaction génétique avec ClpR2, ClpC1,2 ni ClpD, mais sa teneur en chlorophylle est légèrement diminuée (Nishimura et al., 2013). Cependant, ce mutant *clps1* est plus sensible que le type sauvage au chloramphénicol, inhibiteur de la traduction/élongation dans les chloroplastes, mais pas au cycloheximide inhibiteur de la

traduction cytosolique, suggérant un lien fonctionnel possible entre traduction plastidique (allongement) et protéolyse dirigée par ClpS1.

1.5. Sélection des substrats Clp, règle de l'extrémité N et dégron

La reconnaissance et la délivrance sélectives du substrat à la protéase sont cruciales pour assurer des niveaux optimaux de protéines fonctionnelles, éliminer les dysfonctionnements protéiques, tout en évitant la protéolyse indésirable. Une protéine marquée pour être dégradée doit contenir un signal de dégradation, appelé un dégron. Les dégrons peuvent être générés par des modifications post-traductionnelles du substrat, y compris i) l'addition enzymatique d'un acide aminé par une transférase, ii) l'élimination protéolytique d'un ou plusieurs acides aminés de l'extrémité N ou C exposant ainsi un dégron, iii) une (des) modification(s) chimique(s) spécifique(s) de résidus d'acides aminés spécifiques (par exemple, acétylation, phosphorylation ou oxydation). Alternativement, les changements conformationnels de la protéine peuvent entraîner l'exposition d'un dégron qui était autrement intrinsèquement enfoui dans la structure. De tels changements conformationnels peuvent inclure un changement d'association / dissociation de protéines, peptides, métabolites ou cofacteurs en interaction (Dougan et al., 2012) (Figure II.5). Chacun de ces mécanismes est pertinent pour la reconnaissance et la délivrance du substrat Clp chez les bactéries non photosynthétiques et peut-être aussi chez les photosynthétiques eucaryotes. Les dégrons Clp sont le mieux étudiés chez *E. coli*, en particulier les substrats contenant le signal de dégradation N-terminal, appelé N-dégron. La dégradation des substrats N-dégron suit la règle « fin-en-N » qui se rapporte à la régulation de la demi-vie *in vivo* d'une protéine basée sur l'identité de son résidu N-terminal. Cette voie a été découverte à l'origine chez les eucaryotes dans le système protéasome médié par l'ubiquitine et est hautement conservée dans de nombreux organismes (Varshavsky et al., 2011, 2019). En raison de l'absence du système ubiquitine-protéasome standard, les bactéries utilisent comme règle la voie « fin-en-N » qui, à la place du système ubiquitine-protéasome standard, nécessite la machinerie Clp pour la dégradation. Les résidus bactériens modifiés sur leur N-terminal sont classés en deux groupes, à savoir résidus de déstabilisation primaires et secondaires. Les résidus modifiés secondaires sont des acides aminés basiques (Arg et Lys), Met et acides aminés acides (Asp et Glu), chacun d'eux sert de signal pour la modification post-traductionnelle d'un résidu primaire déstabilisable (Leu ou Phe) sur l'extrémité N-terminale de la protéine cible par la transférase à leucyl / phénylalaninyl-ARNt (LFTR) pour les acides aminés basiques et la méthionine ou par la transférase à leucyl-ARNt (BPT) pour les résidus acides. Alternativement, les résidus primaires déstabilisables peuvent être générés par clivage interne par des protéases, comme cela a été suggéré par l'analyse MS des substrats de ClpS piégés (Humbard et al., 2013). Les résidus primaires déstabilisables (Leu, Phe, Tyr et Trp) sont directement reconnus par la protéine adaptatrice bactérienne, ClpS, qui délivre ensuite des substrats N-dégron à la chaperone ClpA pour la protéolyse. Notamment, ClpS pourrait médier une translocation directionnelle des substrats N-dégron du N- au C-terminus pour faciliter l'accès du substrat au pore de la chaperone, où un motif hydrophobe dans une région N-terminale non structurée plutôt que le N-terminus lui-même du substrat sert de site de reconnaissance aux chaperones. Un modèle de délivrance par étapes de substrats suivant la règle « fin-en-N » a été proposé (Roman-Hernandez et al., 2011). Une récente étude biochimique suggère que ClpA tire sur l'extension N-terminale non structurée de ClpS pour déclencher la délivrance du substrat (Rivera-Rivera et al., 2014). ClpS1 est présent à la fois en tant que monomère et en tant que multimère de poids moléculaire de ~ 600 kDa,

similaire aux chaperones ClpC hexamériques. De manière cohérente, les interactions physiques entre ClpS1 et ClpC1 / 2 ont été observées, suggérant que le système de délivrance du substrat bactérien ClpS-ClpA est conservé dans les chloroplastes (Nishimura et al., 2013). L'accumulation de ClpS1 dans les feuilles est contrôlée de façon spatio-temporelle, les niveaux les plus élevés sont enregistrés pendant l'expansion des feuilles, puis déclinent rapidement lors de la sénescence. Cela suggère que les fonctions de protéolyse dirigées par ClpS1 sont importantes en particulier au début du développement des chloroplastes. Basé sur la comparaison des séquences primaires, les résidus de liaison au N-dégron et la spécificité des substrats du ClpS bactérien sont généralement conservés mais pas identiques dans ClpS1, et donc le mécanisme de reconnaissance canonique du substrat pour le N-dégron ne semble pas être parfaitement conservé dans les chloroplastes. En outre les homologues végétaux des aminotransférases LFTR et BPT d'*E. coli* n'ont (jusqu'à présent) pas été retrouvés dans les chloroplastes (Appel et al., 2010). Enfin, grâce à la transformation systématique des chloroplastes de tabac, l'effet (dé) stabilisant de chacun des 20 acides aminés en avant-dernière position (immédiatement en aval de la formyl-méthionine) a été analysé (Appel et al., 2010). Sur la base de ces expériences, il a été proposé que le déterminant majeur de la stabilité protéique des protéines codées par les chloroplastes réside dans la région N-terminale. Il a été suggéré que les résidus Cys et His sont des signaux de déstabilisation N-terminaux dans les chloroplastes (Appel et al., 2010).

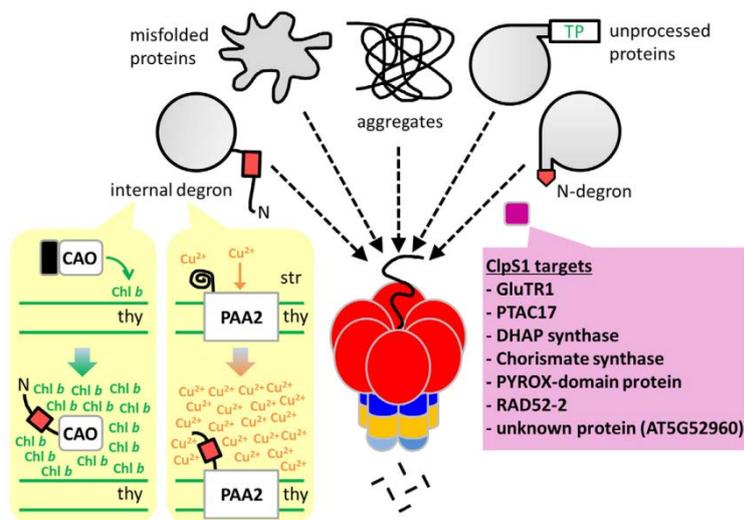


Figure II.5 : Voies potentielles de dégradation de substrats impliquant une dégradation par Clp dans les plastes. Les substrats ayant un dégron interne comme la chlorophyllide a oxygénase (CAO) ou l'ATPase PAA2 exposent leur dégron enfoui grâce à des stimulus cellulaires (chlorophylle b et Cu⁺⁺ respectivement) (d'après Nashimura et van Wijk 2015).

Cependant, le rôle du système Clp dans ce contexte n'a pas été testé et il n'est pas clair si la même règle de stabilité s'applique aux protéines codées par le noyau et le plaste. Les résultats préliminaires utilisant ce que l'on appelle la dégradomique suggèrent que des règles différentes s'appliquent. Le premier substrat décrit pour le système bactérien Clp est sa propre sous-unité chaperone, ClpA. ClpA est dégradé par ClpAP en l'absence de substrats ou en présence d'un excès de ClpA par rapport à ClpP. Cette autodégradation a été proposée comme un mécanisme de régulation du niveau *in vivo* de ClpA. Elle est

régulée négativement par ClpS (Dougan et al., 2002). Comment ClpS inhibe l'autodégradation de ClpA reste incompris, mais il est montré que les 9 derniers résidus situés dans l'extrémité C flexible du second domaine AAA de ClpA sert de signal (Dougan et al., 2002). Il est peu probable que la ClpC cyanobactérienne soit régulée par l'autodégradation, car un excès de chaperone n'est pas dégradé dans des expériences de ClpC et ClpP3R purifiés (Andersson et al., 2009). L'existence de l'autodégradation de ClpC dans les chloroplastes n'est pas connue. Cependant, étant donné que les protéines ClpC sont stables dans le mutant dépourvu de ClpS1, il est peu probable que l'autodégradation de ClpC soit soumise à une régulation négative par ClpS1. Les protéines ClpC sont régulées à la baisse chez les mutants Clp dépourvus de ClpP3 ou ClpR4 mais sont régulés à la hausse chez les mutants centraux avec un phénotype beaucoup plus faible (ClpR1 ou le mutant ClpR2 qui fuit) (Zybailov et al., 2009). Il semble donc qu'il y ait un mécanisme régulant les niveaux de ClpC en réponse à la quantité de ClpPR. Lorsque les ribosomes ne parviennent pas à terminer la synthèse des protéines correctement, ils stagnent sur l'ARNm avec une chaîne polypeptidique naissante incomplète qui pourrait être toxique en cas de libération. Chez les bactéries ces chaînes naissantes bloquées sont marquées à leurs extrémités C par un peptide résiduel nommé SsrA ou tmRNA (pour Small Stable RNA ou Transfert Messenger RNA). Ces polypeptides marqués SsrA sont générés par trans-translation (Keiler et al., 1996). ClpA reconnaît les protéines marquées SsrA pour la dégradation, qui est inhibée de manière compétitive par la liaison de ClpS au domaine N de ClpA (Dougan et al., 2002). ClpXP est le principal accepteur des substrats marqués SsrA dans les bactéries, et des homologues sont présents dans les mitochondries des plantes, mais pas dans les chloroplastes. Les séquences SsrA sont présentes dans le génome des plastes de quelques algues rouges et vertes (Gueneau et al., 2004) mais ne se trouvent ni dans le génome des plastes ni dans les mitochondries des plantes supérieures. Ainsi, certaines espèces d'algues, mais pas les plantes terrestres, pourraient avoir conservé un système de marquage SsrA dans leurs plastes. On ne sait pas comment les plastes éliminent les chaînes naissantes bloquées et si Clp est impliqué. La ClpC cyanobactérienne peut maintenir des protéines dans un état déplié pour empêcher l'agrégation, et peut également se lier aux agrégats pour modifier le repliement, ces deux activités impliquant des réactions dépendantes de l'ATP. Cette capacité intrinsèque de désagrégation de ClpC contraste avec ClpA qui nécessite ClpS pour la reconnaissance et la désagrégation (Wickner et al., 1994). Le ClpS1 cyanobactérien peut interagir avec ClpC mais n'a aucun effet signalé sur l'activité chaperone (Andersson et al., 2006). Les chaperones plastidiques, comme décrit ci-dessus, montrent également la capacité de désagréger / replier les protéines. L'effet de ClpS1 sur cette activité n'a pas été testé. De plus, la capacité de liaison des chaperones Clp à une protéine contenant un cTP suggère que le système Clp pourrait reconnaître les protéines non processées (ayant encore leur cTP). Il est proposé que la protéase Clp des plastes régule le niveau d'accumulation de chlorophyllide a oxygénase (CAO) puisque la perte de ClpC1 provoque une suraccumulation de CAO (Nakagawara et al., 2007). CAO influence la taille de l'antenne des photosystèmes par le contrôle de la synthèse de la chlorophylle b (Tanaka et al., 2001). La stabilité de la CAO est régie par une rétroaction négative impliquant la chlorophylle b, et son domaine N-terminal (appelé domaine A) est nécessaire pour cette régulation (Yamasato et al., 2005). L'analyse de la suppression progressive du domaine A a permis d'identifier une séquence de 10 résidus (97- QDLLTIMILH-106) comme déterminant *in vivo* de la stabilité de la CAO (Sakuraba et al., 2009). Étonnamment, la prédiction *in silico* suggère qu'il y aurait 1 343 séquences similaires à ce dégron. Parmi ces signaux de dégradation potentiels, une séquence (9-GRLLAVHIMH-18) dans la région N-terminale de

CP47, une sous-unité du PSII de liaison à la chlorophylle codée par le plaste, a également été expérimentalement montrée comme pouvant servir de dégron. Comment ces deux dégrons sont reconnus par les chaperones Clp ou d'autres systèmes de protéase mérite une étude plus approfondie.

1.6. Conclusion

L'identification des dégrons pour la dégradation par Clp sera essentielle pour réellement comprendre le rôle du système Clp plastidien et pour connaître comment et dans quelle mesure les autres protéases plastidiennes forment un réseau fonctionnel avec Clp. De nombreuses pistes restent aussi à explorer : pourquoi le noyau de la protéase ClpPR dans les plastes n'est pas mono-oligomérique comme dans les mitochondries et la plupart des procaryotes non photosynthétiques, et pourquoi la plupart des protéines ClpR (dépourvues de résidus catalytiques) sont essentielles pour le fonctionnement du noyau Clp comme dans le protéasome. La présence dans l'anneau R catalytiquement inactif de la seule sous-unité codée par le génome chloroplastique Clp P1 qui, elle, est active, est intrigante. Cet anneau dit « R » n'est d'ailleurs pas si inactif puisque 3 des 7 positions de l'anneau (Olinares et al., 2011) seraient occupées par ClpP1 qui est catalytiquement actif. Cette observation génère de nombreuses questions. (i) Clp P1 sert-elle d'accroche entre ClpT et l'anneau des Clp P? (ii) Clp P1 est-elle la sous-unité nécessaire à la formation de l'anneau R? (iii) ClpT empêche-t-elle la fixation de l'anneau de chaperone du côté de l'anneau catalytique ? (iv) Si l'anneau catalytique n'est jamais surmonté de chaperones, les résidus de la protéolyse (RP) diffusent-ils par le pore ? (v) Quel est le rôle des pores latéraux présents à la jonction entre les 2 anneaux du CP dans la diffusion des RP? De plus, la séquence d'incorporation des sous-unités dans le complexe n'est pas connue et la cristallisation du complexe aiderait à comprendre les relations entre les sous-unités. D'autre part, la diversification des sous-unités du noyau ClpPR n'est pas comprise, et la présence des protéines ClpT uniques, qui représente une adaptation spécifique des plastes, reste encore assez énigmatique. Le piégeage de substrats avec des sous-unités inductibles comme chez *E. coli* (Humbard et al., 2013) et les reconstitutions *in vitro* des activités Clp pourront sans doute permettre de mieux comprendre le fonctionnement de cette protéase essentielle.

Contribution personnelle dans cette thématique. Dans l'équipe de Klaas Jan van Wijk, lors de l'analyse systématique des protéines des différents compartiments du chloroplaste au cours des années 1998-2005, lumen, thylacoïdes et stroma, j'ai isolé un complexe jusqu'alors relativement mystérieux, le complexe Clp. Pour déterminer si des complexes différents existaient dans les différents tissus (hypothèse favorisée à l'époque) et étaient à l'origine des multiples sous-unités trouvées sur gel natif BN-PAGE, j'ai isolé le complexe de différentes brassicacées proches d'*Arabidopsis* pour maximiser les chances d'identifier les protéines. A partir de pétales de chou, de racines de navet et après isolement de complexe sur IEF natif, nous avons pu déterminer qu'un seul et même complexe était présent dans les différents tissus de la plante et comportait donc l'ensemble des paralogues présents dans le génome. Par analyse d'image, nous avons estimé l'abondance relative des sous-unités dans le complexe. Par la suite, des expériences de marquage réalisées après mon départ ont révélé que les estimations initiales que j'avais obtenues étaient exactes pour les 2/3 des sous-unités. J'ai aussi isolé un complexe Clp plus simple (composé de 14 sous-unités identiques (ClpP2) dans les mitochondries de la pomme de terre. Grâce à une collaboration

avec un centre de mathématique, en se basant sur la structure du complexe bactérien, nous avons pu déterminer la structure des Clp plastidiques et comprendre le positionnement des différentes hélices dans les sous-unités actives et inactives. Issue de cette modélisation structurale, la description des pores latéraux à la jonction des deux anneaux heptamériques nous a permis de proposer une voie possible de diffusion des produits de dégradation, hypothèse reprise plusieurs années plus tard par les bactériologistes. Les études menées par la suite au laboratoire se sont concentrées sur ce complexe.

Tableau II.1: Protéases présentes dans les plastes. Les protéases ont été classées en familles et en clans suivant la nomenclature de MEROPS (<https://www.ebi.ac.uk/merops/>). La localisation intracellulaire est aussi indiquée : E, enveloppe; S, stroma; T, membrane thylacoïdienne; (s) et (l), côté stromal et luminal de la membrane thylacoïdienne, respectivement. (d'après Nishimura et al., 2017)

Functional category	MEROPS clan	MEROPS family	Name	Gene	Location	Characteristic features	References		
Chloroplast protein biogenesis	MA	M3	OOP	At5g65620	S	Oligopeptide peptidase, dual targeting to mitochondria	Krniec et al., 2013		
			ME	M16		SPP	At5g42390	Stromal processing peptidase	Zhong et al., 2003 ; Trosch and Jarvis, 2011
						PreP1	At3g19170	Presequence peptidase, dual targeting to mitochondria	Bhushan et al., 2003 , 2005 ; Moberg et al., 2003 ; Nilsson Cederholm et al., 2009
						PreP2	At1g49630		
			alpha- MPP2	At3g16480		–	Mitochondrial processing peptidase, dual targeting to mitochondria	Baudisch and Klösgen, 2012	
	MG	M24	MAP1B	At1g13270	S	Met aminopeptidase	Giglione et al., 2000		
			MAP1C	At3g25740		Met aminopeptidase, dual targeting to mitochondria			
			MAP1D	At4g37040					
	MM	M50	EGY1	At5g35220	T	Intramembrane protease	Chen et al., 2005		
			EGY2	At5g05740			Chen et al., 2012		
			AraSP	At2g32480	E	Intramembrane protease, PDZ domain	Bolter et al., 2006		
	SF	S26	Plsp1	At3g24590	E/T (l)	Thylakoid-processing peptidase	Inoue et al., 2005		
			Plsp2A	At1g06870	–	–	Hsu et al., 2011		
			Plsp2B	At2g30440	–	–			
	SK	S41	CtpA	At4g17740	T (l)	Carboxyl-terminal processing, PDZ domain	Che et al., 2013		
ST	S54	RBL8	At1g25290	E	Intramembrane protease	Knopf et al., 2012 ; Thompson et al., 2012			
		RBL9	At5g25752		Intramembrane protease	Knopf et al., 2012			
Proteome remodeling and maintenance	SK	S14	Clp complex						
			ClpP1	AtCg00670	S/T (s)	Protease core (R ring), plastid-encoded	Shikanai et al., 2001		
			ClpP3	At1g66670		Protease core (P ring)	Kim et al., 2013		
			ClpP4	At5g45390			Zheng et al., 2006		
			ClpP5	At1g02560			Kim et al., 2009		
			ClpP6	At1g11750			Sjögren et al., 2006		
			ClpR1	At1g49970			Protease core (R ring), no catalytic triad	Koussevitzky et al., 2007 ; Kim et al., 2009	
			ClpR2	At1g12410		Kim et al., 2009			
			ClpR3	At1g09130		–			

			ClpR4	At4g17040			Kim et al., 2009
			ClpT1	At4g25370	–	Accessory protein, core complex assembly, and stabilization	Sjögren and Clarke, 2011; Kim et al., 2015
			ClpT2	At4g12060	–		
			ClpC1	At5g50920	S/T (s)	Chaperone complex, ATP-dependent	Park et al., 2004; Sjögren et al., 2004, Kovacheva et al., 2007
			ClpC2	At3g48870	S/T (s)		
			ClpD	At5g51070	–		Nishimura et al., 2013
			ClpS	At1g68660	–	Adaptor protein, substrate recognition, and delivery	Nishimura et al., 2013
			ClpF	At2g03390	–	ClpS interacting protein, substrate recognition, and delivery	Nishimura et al., 2015

Functional category	MEROPS clan	MEROPS family	Name	Gene	Location	Characteristic features	References		
Proteome remodeling and maintenance	MA	M41	Thylakoid FtsH complex						
			FtsH1	At1g50250	T (s)	ATP-dependent, membrane-integral, heterocomplex (type A, FtsH1, 5; type B, FtsH2, 8)	Sakamoto et al., 2003		
			FtsH2	At2g30950			Chen et al., 2000; Takechi et al., 2000		
			FtsH5	At5g42270			Sakamoto et al., 2002		
			FtsH8	At1g06430			Sakamoto et al., 2003		
			Other FtsH proteases						
			FtsH6	At5g15250	–	ATP-dependent, membrane-integral	Wagner et al., 2011		
			FtsH7	At3g47060	E	ATP-dependent, membrane-integral, heterocomplex?	Wagner et al., 2011, 2012		
			FtsH9	At5g58870					
			FtsH11	At5g53170	E	ATP-dependent, membrane-integral, dual	Chen et al., 2006; Wagner et al., 2011		
			FtsH12	At1g79560		ATP-dependent, membrane-integral	Wagner et al., 2012		
			PA	S1	Deg1	At3g27925	T (I)	Membrane-associated, a PDZ domain, proteolytically active at acidic pH	Kapri-Pardes et al., 2007; Sun et al., 2010b; Zienkiewicz et al., 2012
	Deg2	At2g47940			T (s)	Membrane-associated, two PDZ domains,	Huesgen et al., 2006; Lucifski et al., 2011		
	Deg5	At4g18370			T (I)	Membrane-associated	Sun et al., 2007		
	Deg7	At3g03380			T (s)	Membrane-associated, four PDZ domains, One of two	Sun et al., 2010a		
	Deg8	At5g39830			T (I)	Membrane-associated, a PDZ domain	Sun et al., 2007		

	SK	S49	SppA	At1g73990	T (s)	Membrane-integral	Lensch et al., 2001; Wetzel et al., 2009
Unidentified function	AA	A1	NANA	At3g12700	–	Protease activity with the optimal pH6	Paparelli et al., 2012
	M	M79	SCO4	At5g60750	T	–	Albrecht-Borth et al., 2013
	MA	M41	VR3	At1g56180	T (s)	Atypical M41 protease lacking ATPase domain	Qi et al., 2016
	SJ	S16	Lon1	At5g26860	–	ATP dependent, dual targeting to mitochondria	Daras et al., 2014
			Lon4	At3g05790	T (s)	ATP dependent, dual targeting to mitochondria, membrane associated	Ostersetzer et al., 2007

2. Structure et fonction des plastoglobules

2.1. Introduction

Les plastoglobules (PG) sont des particules lipoprotéiques présentes dans différents plastes (chloro, chromo, élaïoplastes) chez toutes les tracheophytes y compris les mousses et les algues. Ils ont été décrits en microscopie électronique en transmission (TEM) comme des granules osmiophiles (Wolken & Palade, 1952 ; Leyon 1954; Figure II.6). Ils sont délimités par une monocouche de lipides. Les PG contiennent un protéome et un métabolome spécialisés (van Wijk & Kessler, 2017). Leur taille et leur forme varient en fonction des stress abiotiques perçus (ex stress lumineux, carence en azote...) ou des transitions développementales. Leur diamètre est cependant typiquement compris entre 30 et 500 nm (jusqu'à 4000 nm) (Figure II.6). Ces structures sont extrêmement dynamiques. Elles émergent à la marge des membranes thylacoïdiennes comme des « bulles lipidiques » restant en contact étroit avec les thylacoïdes mais leur fusion entre elles est rare.

Les PG chloroplastiques contiennent constitutivement une trentaine de protéines auxquelles viennent s'ajouter des protéines additionnelles recrutées dans des conditions spécifiques (Ytterberg et al., 2006 ; Vidi et al., 2006). Les PG chloroplastiques sont impliqués dans le métabolisme des prényls, lipides issus de la voie du mévalonate avec comme précurseurs l'IPP (isopentényl pyrophosphate) et le DMAPP (diméthylallyl pyrophosphate) comme les tocophérols, plastoquinone et phylloquinone (Kim et al., 2013). Les PG interviennent aussi dans la régulation redox et photosynthétique, la biogénèse des plastes, la sénescence incluant le recyclage des phytols, la remobilisation des lipides des thylacoïdes et le métabolisme du jasmonate (Bréhélin et al., 2007 ; Bréhélin & Nacir, 2013 ; Lundquist et al., 2012). La structure des PG chromoplastiques est souvent tubulaire ou fibrillaire comme chez le poivron mais est globulaire chez la tomate. Ces PG séquestrent la majorité des caroténoïdes chloroplastiques et sont enrichis, de fait, d'enzymes impliqués dans la biogénèse des caroténoïdes (Pozueta-Romero et al., 1997 ; Ytterberg et al., 2006 ; Kilamby et al., 2013 ; Zeng et al., 2015 ; Gomez-Gomez et al., 2017).

Les lipides des PG chloroplastiques sont essentiellement des prénylquinones (plastoquinones 9 PQ-9) et des triacylglycérols (TAG) et ne contiennent pas de chlorophylle (Bailey et al., 1963). Par contraste, les PG de plastes non photosynthétiques comme les chromoplastes de pétales oranges ou rouges contiennent des xanthophylles et des esters de caroténoïdes (Hansmann & Sitte, 1982 ; Gao et al., 2015). En résumé, les PG sont un microcompartiment lipidique pour la synthèse, le stockage et la redistribution de certains isoprenoïdes (terpénoïdes) et de lipides neutres dans les plastes et jouent un rôle dans l'homéostasie du statut redox des lipides.

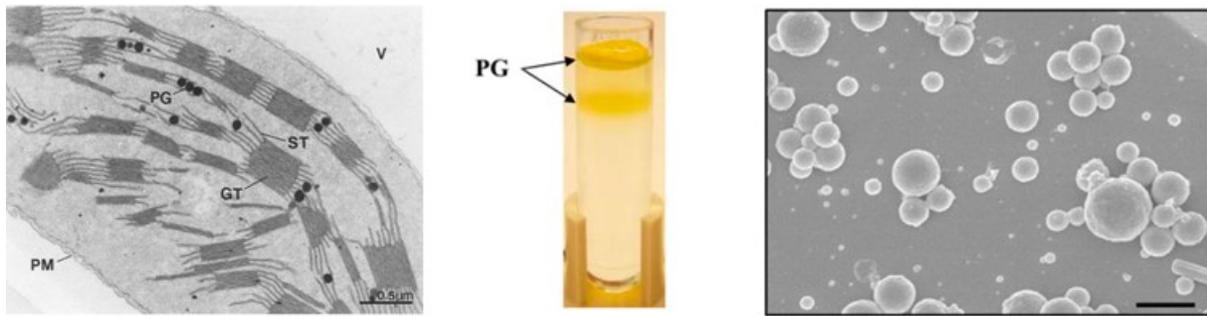


Figure II.6 : Localisation et caractéristiques physiques des plastoglobules (PG). Les PG sont visibles comme des grains denses en microscopie électronique en transmission (photo de gauche). Composés d'une monocouche lipidique, ils sont facilement purifiables par coussin de densité (photo au centre). Ils se présentent comme des sphères comprises entre 30 et 500 nm (photo de droite) (d'après Allen et al., 1988 ; Ytterberg et al., 2006 ; van Wijk & Kessler 2017)

2.2. Protéome et fonctions des plastoglobules

Dès 1988, une bande majeure sur gel SDS-PAGE a été isolée à partir de chloroplastes de poivron (*C. annuum*) se révélant des années plus tard comme une fibrilline (FBN), appelée aussi PAP (PG associated protein) ou encore plastoglobuline (PGL) (Hadjeb et al., 1988). Les fibrillines (FBN) structurent les PGs (Figure II.7).

En 2006, dans la première approche systématique d'identification du protéome des PG, nous avons identifié 24 protéines (en rouge et en jaune dans le tableau II.2) (Ytterberg et al., 2006), en même temps que le groupe de F. Kessler (en rouge et en vert dans le tableau II.2) (Vidi et al., 2006), sur la trentaine que contiennent les PG sans compter une dizaine de protéines supplémentaires recrutées dans des conditions particulières et impliquées dans la dégradation des chlorophylles et le métabolisme du jasmonate (Van Wijk & Kessler, 2017). Les protéines des PG n'ont pas de domaines transmembranaires connus ou prédits ce qui est consistant avec leur adhésion à une monocouche lipidique, à laquelle ils s'associent probablement par contact avec des régions hydrophobes restreintes ou indirectement par contact avec d'autres protéines associées à cette membrane. Les fonctions identifiées dans les PG sont majoritairement liées au métabolisme des isoprénoides et à la remobilisation des lipides et des acides gras thylacoïdiens.

Les protéines les plus abondantes des PG font partie de la famille des fibrillines (FBN) et des ABC1K (activité kinase du complexe *cyt bc₁* mitochondrial), représentant respectivement 53% et 19% de la masse protéique des PG. Arabidopsis contient 14 fibrillines dont 7 font partie du core des PG (FBN 1a, 1b, 2, 4, 7a, 7b et 8). Les autres FBN sont majoritairement localisés dans les thylacoïdes (FBN 3a, 3b, 6, 9 et FBN-like), et FBN 5 est localisée dans le stroma (Singh & McNellis, 2011 ; Laizet et al., 2004). Chez Arabidopsis, 17 gènes codent pour des ABC1K, dont 6 ABC1K se trouvent dans les PG (ABC1K 1, 3, 5, 6, 7 et 9) tandis que ABC1K 2, 4 et 8 sont présentes ailleurs dans le chloroplaste et que ABC1K 10-14 sont mitochondriales. Les homologues d'ABC1K chez les bactéries ou dans les mitochondries phosphorylent des composants de la voie de biosynthèse de l'ubiquinone, régulant ainsi la synthèse de ce co-enzyme. L'étude de mutants « perte de fonction » chez ABC1K 1 et 3 montrent que ces protéines affectent les lipides prénylés dans les PG et lors des réponses aux stress abiotiques (Martinis et al., 2014 ; Lohscheider et al., 2016). Une autre protéine des PG est la synthétase de tocophérol (VTE1 vitamine E déficient 1), enzyme clé dans la

biosynthèse du tocophérol et du plastochromanol 8 (PC8) (Vidi et al., 2006). Deux synthétases d'esters de phytol (PES 1 et 2) présentes dans les PG sont impliquées dans la formation mais aussi le clivage des queues phytol des chlorophylles et des acides gras libres des galactolipides. Les PG contiennent aussi une troisième PES-like (AT5G41120) de fonction inconnue. La NADP(H) déshydrogénase C1 (NDC1) réduit la plastoquinone-9 (PQ-9) oxydé en PQ-9-H₂ dans les PG et joue un rôle essentiel en tant que réductase dans la biosynthèse de la phylloQ (Figure II.7). La protéase M48 présente en faible abondance dans les PG est un membre de la famille des métallopeptidases à zinc. Elle agit comme un régulateur positif de la sénescence, peut-être en dégradant l'enzyme 4 clivant les caroténoïdes (CCD4) (Bhuiyan et al., 2016). D'autres protéines du core des PG, telles que les méthyltransférases, les réductases et la protéine 3 liant un hème (HBP3) contenant le domaine SOUL (initialement nommé car le transcrit de la protéine était présent en grande quantité dans la glande pinéale, organe que Descartes prenait pour le siège de l'âme (Zylka et al., 1999)), ont divers domaines fonctionnels prédits, mais leurs fonctions n'ont pas été déterminées (Zbierzak et al., 2009 ; Ahrazem et al., 2016).

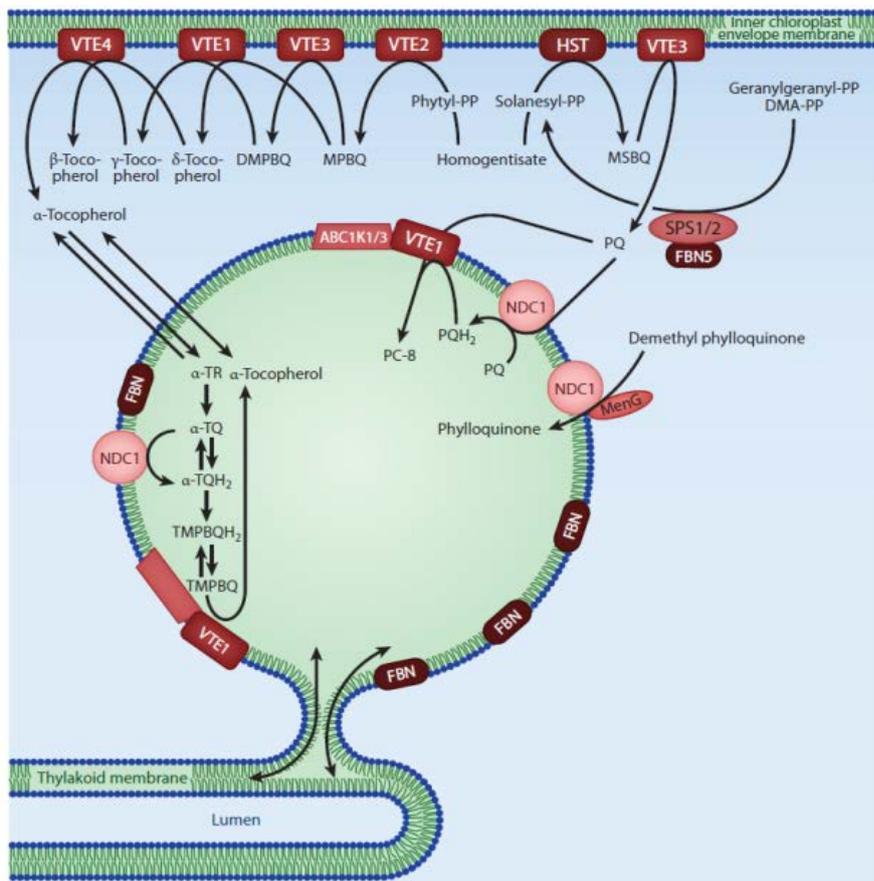


Figure II.7 : Fonctions majeures identifiées dans les plastoglobules (PG) des chloroplastes. Générés à partir des lipides externes des thylacoïdes et formés donc d'une monocouche lipidique, les PG sont structurés par les fibrillines (FBN). Les PG sont impliqués dans le métabolisme/stockage des lipides en particulier des prényls. VTE1 (Déficient 1 en vitamine E) est une cyclase du tocophérol qui préfère les substrats réduits pour la biosynthèse du tocophérol et du plastochromanol ainsi que pour le recyclage du tocophérol. NDC1 (NADP (H) déshydrogénase C1) fournit les substrats réduits PQH₂ (plastoquinol-9) et TMPBQ (triméthylphytylbenzoquinone) pour la biosynthèse du PC-8

(plastochromanol-8) et le recyclage du tocophérol, respectivement. NDC1 catalyse également la réduction de la diméthyl phyloquinone avant la méthylation par MenG (diméthylménaquinone méthyltransférase). ABC1K1 (Activité kinase du complexe cyt bc1) favorise une production accrue de tocophérol sous une lumière élevée, et ABC1K3 est nécessaire pour l'accumulation normale de PC-8 et le recyclage du tocophérol. Ces kinases peuvent agir directement sur l'activité de VTE1, éventuellement par phosphorylation. L'homologue FBN5 se produit dans le stroma et est nécessaire à l'activité de SPS1 et -2 (Synthase de solanésyl diphosphate). Abréviations supplémentaires: DMA-PP, pyrophosphate de diméthylallyle; DMPBQ, 2,3-diméthyl-5-phytylquinol; HST, Prényltransférase d'homogentisate; MPBQ, 2-méthyl-6-phytylquinol; MSBQ, 2-méthyl-6-solanyl-1,4-benzoquinol; PP, pyrophosphate; PQ, plastoquinone-9; TMPBQH2, triméthylphytylbenzoquinol; α -TQ, α -tocophérolquinone; α -TQH2, α -tocophérolquinol; α -TR, radical α -tocophéroxyle; VTE2, phytyltransférase d'homogentisate (Déficient 2 en vitamine E); VTE3, Méthyltransferase de tocopherol (Déficient 3 en vitamine E); VTE4, Méthyltransferase de γ -tocophérol (Déficient 4 en vitamine E) (d'après van Wijk & Kessler 2017).

2.3. Rôle des fibrillines dans la structuration des plastoglobules

La famille FBN des plantes et des algues peut être regroupée en 12 clades (Singh & McNellis 2011). La plupart des génomes cyanobactériens ont seulement une ou deux protéines FBN, qui sont les plus étroitement liées à FBN1 et -2. L'origine des protéines FBN végétales et algales n'est pas entièrement claire, mais il a été suggéré qu'elles dérivent des progéniteurs symbiotiques des plastes, à savoir des cyanobactéries (Cunningham et al., 2010, Laizet et al., 2004). Le génome d'*Arabidopsis* code 14 protéines FBN (Laizet et al., 2004, Lundquist et al., 2012, Singh & McNellis 2011). Les PG d'*Arabidopsis* contiennent 7 protéines FBN (FBN1a,-1b, -2, -4, -7a, -7b et -8), le reste des FBN se trouvant dans le stroma (FBN5) (Kim et al., 2015) ou les membranes plastidiques, très probablement les thylakoïdes (Lundquist et al., 2012). Le ciblage des FBN sur les PG ne semble pas impliquer une séquence spécifique au sein de ces protéines. Il repose plutôt sur la structure complète des FBN (Vidi et al., 2007). La FBN11 est le membre le plus éloigné de la famille FBN car il possède un domaine kinase et une masse moléculaire beaucoup plus élevée (76 kDa) par comparaison avec les autres membres de la famille FBN (25–45 kDa). La famille FBN végétale est diversifiée mais présente une conservation de séquence dans les régions N et C terminales, y compris une signature semblable à la lipocaline. Les lipocalines sont caractérisées par une structure compacte, stable, à huit feuillets antiparallèles en barillet β renfermant un site de liaison de ligand interne qui interagit avec une variété de petites molécules hydrophobes, y compris les stéroïdes, les bilines, les rétinoïdes et les lipides (Charron et al., 2005, Schiefner & Skerra 2015). La FBN5 d'*Arabidopsis*, stromale, est essentielle pour la biosynthèse de PQ-9 car elle se lie à SPS1 et -2, qui synthétisent la fraction solanésyle de PQ-9 (Kim et al., 2015). Les PG isolés des feuilles de pomme (*Malus domestica*) chez le mutant *fbn4* ne contient que ~10% des niveaux de PQ-9 de type sauvage, alors que les niveaux globaux de PQ-9 dans les feuilles et les chloroplastes sont inchangés (Singh et al., 2012, Singh et al., 2010), suggérant que le FBN4 et son motif de lipocaline fonctionnent dans la liaison et le transport de PQ-9. Trois lipocalines chloroplastiques supplémentaires (ou protéines de type lipocaline) en dehors de la famille FBN ont également été caractérisées: l'enzyme du cycle de la xanthophylle ZEAXANTHIN EPOXIDASE (ZEP); l'enzyme luminale VIOLAXANTHINE DEEPOXIDASE (VDE) (Arnoux et al., 2009, Bugos et al., 1998, Hallin et al., 2016); et l'enzyme thylakoïdienne CHLOROPLAST LIPOCALIN (CHL) (AT3G47860), qui est nécessaire pour la protection des lipides thylakoïdiens contre les molécules ROS mais n'a pas d'interactants moléculaires connus (Boca et al., 2014, Levesque-Tremblay et al., 2009). A l'exception du CHL, ces protéines

contenant de la lipocaline semblent toutes interagir avec les lipides isoprényliques (xanthophylle ou PQ-9); il est donc tentant de supposer que les autres membres de la famille FBN interagissent également avec les molécules dérivées des isoprénoïdes. Des expériences de reconstitution in vitro avec la FBN1a recombinante de poivron rouge mise en présence de caroténoïdes, de lipides polaires et de diesters de xanthophylle (les composants les plus abondants des fibrilles caroténoïdes) ont efficacement formé des PG fibrillaires, ce qui a permis de conclure que (certaines) FBN fonctionnent comme des protéines structurales des PG (Deruere et al., 1994). La surexpression d'un homologue de FBN1a chez le tabac a entraîné une hypertrophie et une multiplication des PG, ce qui a également été pris comme preuve d'un rôle structurel (Rey et al., 2000, Shanmugabalaji et al., 2013). La surexpression de l'homologue du poivron FBN1a dans le fruit de la tomate a entraîné une perte retardée de thylakoïdes dans les chromoplastes différenciés, conduisant à la formation transitoire de plastes présentant une zone chromoplastique typique adjacente à une zone chloroplastique protégée avec des thylakoïdes préservés (Simkin et al., 2007); cependant, les conséquences de ces résultats concernant la fonction de FBN1a restent à définir. Les études d'expression basées sur l'ARNm de la famille FBN et des mutants de perte de fonction pour FBN1a, -1b, -2 et -4 chez *Arabidopsis* et d'autres espèces ont suggéré l'implication (directe ou indirecte) de ces FBN dans les réponses aux stress biotiques (Langenkämper et al., 2001, Leitner-Dagan et al., 2006, Singh et al., 2010), sécheresse (Eymery & Rey 1999, Kim et al., 2001, Langenkämper et al., 2001, Pruvot et al., 1996), faible température (Laizet et al., 2004) et excès de lumière (Yang et al., 2006). La surexpression de FBN1a chez le tabac a entraîné une résistance accrue au stress à haute intensité lumineuse (Rey et al., 2000). La FBN1a est impliquée dans la protection médiée par l'acide abscissique contre la photoinhibition (Yang et al., 2006). De plus, FBN1a, ainsi que FBN-1b et -2, conditionne(nt) la production de jasmonate pendant le stress photooxydant induit à basse température (Youssef et al., 2010). La lignée fib1-2 RNAi, qui a des niveaux réduits de FBN1a, -1b et -2, présente un phénotype de stress ressemblant à celui du mutant aos déficient en jasmonate (Youssef et al., 2010). Une interprétation de ces données est que FBN1a, -1b et -2 aident à recruter des enzymes biosynthétiques de jasmonate dans les PG.

2.4. Les plastoglobules dans les autres types de plastes.

L'analyse du protéome des PG isolés des chromoplastes de poivrons rouges mûrs a identifié la désaturase de ξ -carotène (ZDS), la cyclase β du lycopène (LYC- β) et deux hydroxylases β de carotènes β (CrtR- β s) fonctionnant en série dans la biosynthèse bicyclique de caroténoïdes, ainsi que neuf homologues de protéines identifiées dans les PG de chloroplastes (dont FBN1a, -1b, -2 et -4; PES1; ABC1K9 et VTE1) (Ytterberg et al., 2006). Cela suggère que les PG dans les chromoplastes ont des fonctions enzymatiques spécifiques dans la biosynthèse des caroténoïdes, en plus de leur fonction bien connue de stockage et de séquestration des caroténoïdes. Par contre, de nombreuses protéines identifiées dans les PG de chloroplastes d'*Arabidopsis* ne sont pas retrouvées dans les chromoplastes ce qui suggère que ces protéines sont impliquées dans des processus qui ne sont plus nécessaires dans les chromoplastes (e.g. : dégradation des chlorophylles et transport d'électrons). Enfin, l'analyse des membranes à faible densité d'étioplastes de riz a révélé principalement de la protochlorophyllide réductase, qui est abondante dans les corps prolamellaires, mais également la présence de la fibrilline FBN10, localisée dans les PG et intégrée dans les corps prolamellaires ou associée aux membranes pré-thylacoïdiennes (Ytterberg et al., 2006). La similarité entre les PG d'algues (*Chlamydomonas* et *Dunaliella*) et

les PG de plantes supérieures est frappante (tableau II.2) et suggère des fonctions hautement conservées (Lohscheider et al., 2016) (Figure II.8).

En résumé, les plastoglobules (PG) sont des particules lipoprotéiques présentes dans les plastes photosynthétiques ou non chez toutes les plantes depuis les algues, les mousses et les tracheophytes. Ils servent de microcompartiments avec des fonctions intégrées dans le métabolisme des plastes, les transitions de développement et l'adaptation environnementale. Les PG jouent un rôle clé dans i) la détoxification du phytol libéré lors de la dégradation de la chlorophylle (par estérification) ii) le démantèlement contrôlé de la bicouche lipidique des thylakoïdes par l'accumulation d'acides gras et de triacylglycérol et iii) la production de jasmonate. Les PG dans les chloroplastes participent au stockage, à la synthèse et au recyclage transitoires de la plastoquinone-9, de la phylloquinone, du tocophérol et du plastochromanol-8, y compris l'échange avec la membrane thylakoïdienne. Les fibrillines (FBN), et les kinases du complexe bc1 (ABC1K) sont les protéines les plus abondantes dans les PG des chloroplastes. Sur la base de la présence d'une signature semblable à celle de la lipocaline dans les FBN et des informations expérimentales disponibles, les FBN contribueraient à la liaison et l'échange d'intermédiaires lipidiques prényliques. Des études de phosphoprotéomique spécifiquement conçues pour étudier le protéome des PG et ses ABC1K sont nécessaires pour comprendre les réseaux de phosphorylation dans les PG. Les fonctions principales des PG dans les chromoplastes sont la synthèse et le stockage des caroténoïdes et des esters de caroténoïdes. Enfin, il existe un potentiel de découverte dans les PG de protéines supplémentaires de faible abondance dans des plastes spécialisés et / ou des états de développement ou des conditions de stress spécifiques.

Si les fonctions des PG semblent assez bien comprises actuellement dans les chloroplastes et chromoplastes, même si certaines protéines n'ont pas encore de fonction connue, il serait particulièrement intéressant de connaître les protéines associées aux PG dans le cas de plastes spécialisés comme les elaioplastes, les phenyloplastes ou les plastes formant des tannosomes (Brillouet et al., 2013-2014). Les PG sont en effet très probablement impliqués dans la spécialisation des ces plastes et leur protéome/métabolome devrait subir des modifications majeures étendant de fait les fonctions des PG.

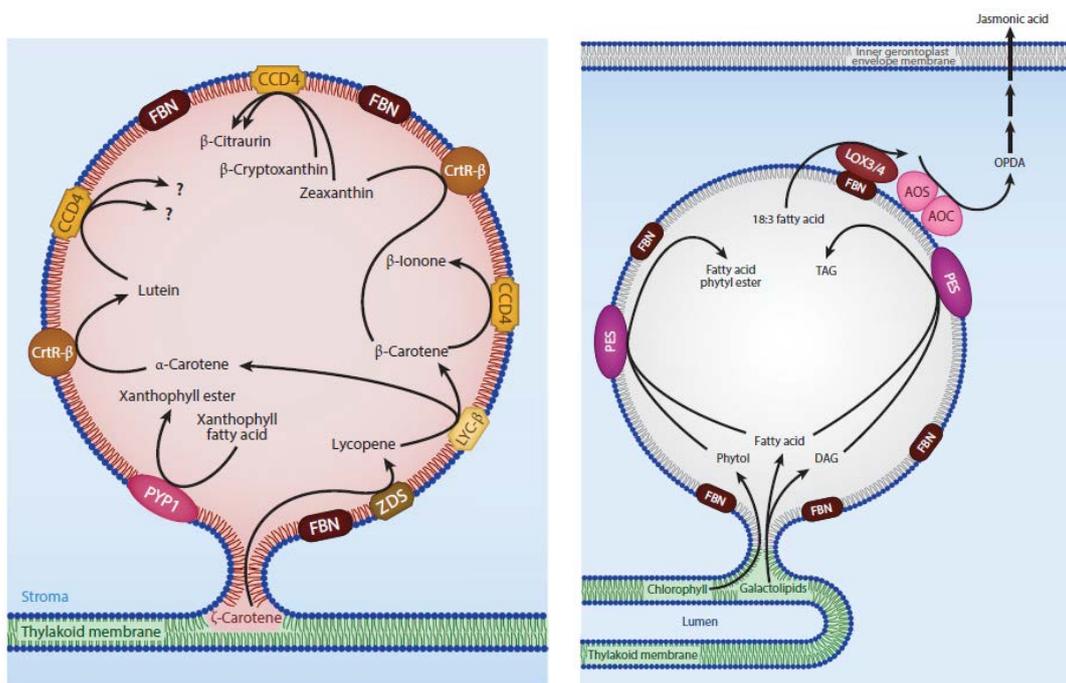


Figure II.8 : Fonctions majeures identifiées dans les plastoglobules des chromoplastes (panneau de gauche) et des gérontoplastes (panneau de droite). Les PG dans les chromoplastes sont spécialisés dans le métabolisme des caroténoïdes. La β -hydroxylase du β -carotène (CrtR- β), la lycopène β -cyclase (LYC- β) et la désaturase du ζ -carotène (ZDS) sont recrutées pour la biosynthèse et l'accumulation des caroténoïdes dans les PG. La dioxygénase 4 clivant les caroténoïdes (CCD4) contribue à la pigmentation des chromoplastes des fruits et à l'émission de composés volatils. Pétale jaune pâle 1 (PYP1), un homologue de la PES (Synthase d'esters de phytol), participe à synthèse des esters de caroténoïdes dans les chromoplastes des pétales de tomate. Les PG des gérontoplastes participent au désassemblage des thylacoïdes, à l'hydrolyse des galactolipides et catabolisme de la chlorophylle pendant la sénescence. Le phytol libre est libéré de la chlorophylle. PES1 et -2 combinent le phytol et les acides gras libres dérivés de l'hydrolyse des galactolipides en esters phytyliques d'acides gras. PES1 et -2 synthétisent également du triacylglycérol (TAG) à partir d'acides gras libres et de diacylglycérol (DAG). Au cours de la sénescence, les PG des gérontoplastes recrutent des enzymes de la voie du jasmonate (LOX3 (Lipoxygénase 3) et -4, AOC (cyclase d'oxyde d'allène) et AOS (Synthase d'oxyde d'allène)), contribuant au désassemblage des thylacoïdes et à la production de jasmonate. Abréviations: OPDA, acide 12-oxo-phytodiénoïque (d'après van Wijk & Kessler 2017).

Contribution personnelle dans cette thématique : Dans l'équipe de Klaas Jan van Wijk, j'ai isolé et purifié les plastoglobules dans l'ensemble des conditions développementales et environnementales que nous avons explorées. Jimmy Ytterberg a marqué et séquencé les protéines isolées. J'ai ensuite analysé les résultats de protéomique des plastoglobules et participé à la rédaction de l'article présentant l'ensemble de nos résultats. Cet article (Ytterberg *et al.*, 2006) et celui publié quasiment simultanément par Vidi *et al.* (2006) sont les 2 premiers papiers de protéomique systématique montrant la complexité et les fonctions assez inattendues des plastoglobules. Le laboratoire a continué à travailler sur ce sujet après mon départ et jusqu'à ce jour.

Tableau II.2: Protéome des plastoglobules des chloroplastes, chromoplastes et gérontoplastes chez les phanérogames et les algues. Les accessions surlignées en rouge ont été identifiées indépendamment à la fois par Ytterberg et al. (2006) et Vidi et al. (2006). Celles surlignées en jaune ont été identifiées spécifiquement par Ytterberg et al. (2006) et celles en vert spécifiquement par Vidi et al. (2006). Les protéines identifiées dans les chromoplastes sont indiquées par un surlignage en violet et celles chez les algues par un surlignage en bleu. Enfin, certaines protéines ne sont trouvées que dans des conditions particulières (stress).

Identifiant génique	Nom de la protéine (précédent nom ou orthologues)	Localisation dans <i>Arabidopsis</i> ^a	Abundance relative dans les PG ^b chloroplastique	Fonction connue ou suspectée ^c	Phosphorylation
AT4G31390	ABC1K1 (PGR6)	Core des PG chloroplastiques (+Algae)	6	Kinase	
AT1G79600	ABC1K3 (ACD01)	Core des PG chloroplastiques (+Algae)	/	Kinase	
AT1G71810	ABC1K5	Core des PG chloroplastiques	18	Kinase	
AT3G24190	ABC1K6 (EYE3)	Core des PG chloroplastiques (+Algae)	24	Kinase	
AT3G07700	ABC1K7 (SIA1)	Core des PG chloroplastiques (+Algae)	27	Kinase sénescence	
AT5G05200	ABC1K9	Core des PG chloroplastiques (+Algae) + Chromo	5	Kinase	
AT4G19120	CCD4	Core des PG chloroplastiques	9	Clivage des caroténoïdes, sénescence	
AT1G54570	PES1 (DGAT3, PYP1)	Core des PG chloroplastiques + Chromo	11	Acétyltransférase/esterase, sénescence	
AT3G26840	PES2 (DGAT4)	Core des PG chloroplastiques	23	Acétyltransférase/esterase, sénescence	
AT5G41120	Estérase 1 (ELT4)	Core des PG chloroplastiques	30	Inconnue	
AT4G04020	FBN1a (PGL35)	Core des PG chloroplastiques (+Algae) + Chromo	1	Structural, stress, transport de petites molécules	oui
AT4G22240	FBN1b (PGL33)	Core des PG chloroplastiques (+Algae) + Chromo	3	Structural, stress, transport de petites molécules	Oui
AT2G35390	FBN2 (PGL40)	Core des PG chloroplastiques (+Algae) + Chromo	4	Structural, stress, transport de petites molécules	Oui
AT3G23400	FBN4 (PGL30.4)	Core des PG	2	Structural, stress, transport de petites	Oui

		chloroplastiques (+Algae) + Chromo		molécules	
AT3G58010	FBN7a	Core des PG chloroplastiques (+Algae)	8	Structural, stress, transport de petites molécules	
AT2G42130	FBN7b	Core des PG chloroplastiques (+Algae)	13	Structural, stress, transport de petites molécules	Oui
AT2G46910	FBN8	Core des PG chloroplastiques (+Algae)	17	Structural, stress, transport de petites molécules	
AT1G32220	Flavin reductase related 1	Core des PG chloroplastiques (+Algae) + Chromo	14	Inconnue	Oui
AT2G34460	Flavin reductase related 2	Core des PG chloroplastiques (+Algae)	21	Inconnue	Oui
AT3G27110	M48 protease	Core des PG chloroplastiques (+Algae)	29	Peptidase, sénescence	
AT1G06690	NAD(P)-aldo/ keto-reductase	Core des PG chloroplastiques (+Algae) + Chromo	20	Inconnue	Oui
AT5G08740	NDC1	Core des PG chloroplastiques (+Algae)	12	Quinone réductase, biosynthèse des phyloquinones	
AT3G10130	SOUL domain-containing HBP3	Core des PG chloroplastiques (+Algae)	16	Inconnue	
AT1G78140	UbiE methyltransferase-related 1	Core des PG chloroplastiques (+Algae)	19	Potentielle méthyltransferase (comme VTE3)	
AT2G41040	UbiE methyltransferase-related 2	Core des PG chloroplastiques (+Algae)	22	Potentielle méthyltransferase (comme VTE3)	
AT4G13200	Inconnue 1	Core des PG chloroplastiques + Chromo	15	Inconnue	Oui
AT3G43540	Inconnue 2 (DUF1350)	Core des PG chloroplastiques (+Algae)	26	Inconnue	
AT1G73750	Inconnue SAG	Core des PG chloroplastiques	28	Inconnue, fonctions associées à la sénescence	
AT4G32770	VTE1	Core des PG chloroplastiques (+Algae) + Chromo	10	Métabolisme des tocophérols	Dans les peptides de transit ?
AT1G28150	Inconnue	Chloroplast (+Algae)		Inconnue	
AT1G52590	Inconnue	Chloroplast (+Algae)		Oxidoreductase	

AT3G25760	AOC1	Recrutée dans les PG chloroplastiques		Biosynthèse du jasmonate	
AT3G25770	AOC2	Recrutée dans les PG chloroplastiques		Biosynthèse du jasmonate	
AT5G22658	AOS	Recrutée dans les PG chloroplastiques		Biosynthèse du jasmonate	Oui
AT3G45140	LOX2	Recrutée dans les PG chloroplastiques		Biosynthèse du jasmonate	?
AT1G17420	LOX3	Recrutée dans les PG chloroplastiques		Biosynthèse du jasmonate	
AT1G72520	LOX4	Recrutée dans les PG chloroplastiques		Biosynthèse du jasmonate	
AT5G13800	PPH	PG chloroplastiques sénescents		Dégradation des chlorophylles, sénescence	
AT3G04870	ZDS	PG chromoplastiques + Chromo		Biosynthèse des caroténoïdes	
AT3G10230	LYC-β	PG chromoplastiques (+Algae) + Chromo		Biosynthèse des caroténoïdes	
AT4G25700/ AT5G52570	CrtR-β	PG chromoplastiques (a un DTM) + Chromo		Biosynthèse des caroténoïdes	

Chapitre III

Expression de transporteurs HKT de riz et de blé en vue de leur caractérisation structurale

1.- Contexte et situation du sujet

L'accumulation de sels dans les sols est l'un des facteurs limitatifs les plus importants de la production agricole. On estime qu'environ 25 à 30% des terres irriguées sont affectées par la salinité (Shahid et al., 2018). Or, une grande majorité des plantes cultivées pour l'alimentation comme le riz ou le blé sont très sensibles à la présence de sel (Munns and Tester, 2008 ; Zörb et al., 2019). Deux phases sont classiquement distinguées dans les conséquences sur la plante d'un traitement salin (Munns and Tester, 2008, Isayenkov and Maathuis, 2019). La première phase, dite "osmotique", traduit l'abaissement du potentiel osmotique par le sel dans l'environnement des racines. L'impact sur le potentiel hydrique de la plante provoque rapidement une inhibition de la croissance des jeunes feuilles. La seconde phase, dite "ionique" est plus lente. Elle résulte de la toxicité des ions Na^+ et Cl^- qui envahissent progressivement les tissus de la plante. Cette toxicité affecte particulièrement les tissus photosynthétiques foliaires, et peut conduire à la sénescence des feuilles et de la plante.

Le maintien d'un rapport K^+/Na^+ élevé dans le cytoplasme des cellules foliaires constitue une stratégie majeure des plantes glycophytes pour lutter contre le stress salin et dépend en grande partie de l'activité *in planta* de transporteurs de Na^+ et de K^+ (Hauser and Horie, 2010). En particulier, les transporteurs HKT (High affinity K^+ transporters), dont certains transportent K^+ et Na^+ et d'autres sont spécifiques de Na^+ , jouent un rôle important dans la tolérance des plantes au stress salin et correspondent à des QTLs majeurs, utilisés par les programmes d'amélioration de la résistance à la salinité (Ren et al., 2005; Mian et al., 2011; Hamamoto et al., 2015, Ismail and Horie, 2017). Les transporteurs HKT, qui sont particulièrement bien représentés chez les monocotylédones (ex : 7 membres chez le riz et un seul chez *Arabidopsis*; Véry *et al.*, 2014), sont étudiés depuis plusieurs années sur le plan fonctionnel et physiologique dans notre équipe. Malgré l'importance de ces transporteurs dans les mécanismes de tolérance au sel, les déterminants structuraux impliqués dans leur activité de transport (et plus particulièrement dans la spécificité ionique Na^+/K^+) sont mal connus. En effet, aucun HKT de plante n'a été cristallisé jusqu'à présent. Les structures actuellement proposées dans la littérature reposent sur des extrapolations à partir de données cristallographiques d'homologues bactériens et se révèlent insuffisamment informatives (Waters *et al.*, 2013; Su *et al.*, 2015 ; Xu et al., 2018; Riedelsberger et al., 2019; Somasundaram et al., 2020).

Dans ce projet, nous cherchons à identifier les domaines structuraux impliqués dans le transport des ions chez les HKTs de céréales dans le but de mieux comprendre les bases moléculaires de la sélectivité ionique de ces transporteurs. La stratégie adoptée consiste à produire en grande quantité et à purifier les protéines HKTs, à vérifier leur fonctionnalité, puis à les cristalliser afin d'en obtenir des structures 3D et d'identifier les domaines impliqués dans la sélectivité ionique.

J'ai initié ce projet à mon arrivée dans l'UMR. J'ai ensuite été rejoint par mon collègue Jean-Christophe Boyer (CR INRA) pour développer ensemble le projet. Nous avons encadré

ensemble plusieurs étudiants (en BTS, L3, M1) La partie « cristallisation » est réalisée en collaboration avec Sébastien Granier, spécialiste reconnu de la biologie structurale des protéines membranaires travaillant à l'Institut de Génomique Fonctionnelle de Montpellier (https://www.igf.cnrs.fr/granier/?page_id=60&lang=fr).

Nous avons choisi de nous intéresser à deux HKTs de céréales. Le premier, TmHKT1;4-A2, est un transporteur HKT de la famille du blé (petit épeautre, *Triticum monococcum*) sélectif de Na⁺, impliqué dans le dessalage de la sève xylémienne en condition de stress salin. Il constitue le gène responsable du QTL *Nax1* de tolérance au sel (Huang et al., 2006). Le second, OsHKT2;2, est un HKT de riz (*Oryza sativa*) capable de transporter Na⁺ et K⁺ (Horie et al., 2001). OsHKT2;2 pourrait contribuer à favoriser l'absorption racinaire de K⁺ en condition saline (Oomen et al., 2012).

Les systèmes d'expression *in vitro* (Zemella et al., 2015) offrent aujourd'hui une approche attractive pour produire des protéines membranaires fonctionnelles (Junge et al., 2011 ; Shadiac et al., 2013) et les cristalliser (Wada et al., 2011 ; Boland et al., 2014). Nous avons choisi d'exprimer OsHKT2;2 et TmHKT1;4-A2 *in vitro* dans le système acellulaire d'extrait de germe de blé (WGS pour wheat germ system), parce qu'il s'agit aujourd'hui du système d'expression *in vitro* le plus performant pour exprimer des protéines eucaryotes (Harbers, 2014) et qu'il constitue un système "eucaryote homologue" pour exprimer des HKTs de céréales (ne nécessitant pas d'optimisation de codons en particulier).

2. Résultats

2.1. Les transporteurs OsHKT2;2 et TmHKT1;4 sont exprimés efficacement *in vitro* dans le système acellulaire de germe de blé

Nous avons utilisé le système WEPRO commercialisé par CellFree Sciences (CFS), basé sur la technologie ENDEXT développée par le Prof. Y. Endo (Takai *et al.*, 2010). Le vecteur d'expression pEU-E01 comprend le promoteur de transcription *SP6* et des séquences enhanceurs destinées à favoriser la traduction dans le WGS. Nous avons d'abord modifié ce vecteur en incorporant des séquences additionnelles destinées à faciliter la purification des protéines exprimées (tags TwinStreptag en C-ter et queue His en N-ter) ainsi que deux sites pour la protéase TEV pour éliminer ces séquences de part et d'autre de la séquence protéique des HKT après purification sur colonne d'affinité anti-tag.

Comme attendu pour une protéine très hydrophobe (8 segments transmembranaires prédits), et en l'absence d'additifs (détergents, lipides), OsHKT2;2 est détectée dans la fraction insoluble des produits de traduction. Si OsHKT2;2 est facilement détectable par western blot, une bande spécifique de cette protéine n'est pas discernable par coloration au bleu de Coomassie des protéines totales sur un extrait de traduction, indiquant que son niveau d'expression est relativement peu élevé. Une série de tests visant à optimiser le contexte d'initiation de la traduction (CIT) autour de l'ATG initiateur d'*OsHKT2;2* n'a cependant pas permis d'élever significativement la quantité de protéine OsHKT2;2 produite *in vitro*. Par contre, la protéine TmHKT1;4 est facilement détectable dans les protéines totales par SDS-PAGE et apparaît même comme une des protéines majoritaires du mélange traductionnel (Figure III.1, pistes T).

2.2. Expression en présence de détergents

La purification sous forme fonctionnelle d'une protéine membranaire nécessite sa solubilisation dans un environnement hydrophobe favorable, en général dans des micelles de détergent ou des liposomes. Des traductions ont donc été réalisées en présence de 0,05 ou 0,1% de détergents non ioniques (DDM : nDodecyl- β -D-maltopyranoside ; NG-310 : lauryl maltose neopentyl glycol ; C12E8 : octaethylene glycol monododecyl ether ; Cymal-5 : 5-cyclohexyl-1-pentyl- β -D-maltoside) qui sont connus pour être compatibles avec les protocoles de cristallisation de protéines membranaires et ont été utilisés avec le WGS (ex : Fogeron *et al.*, 2015, 2017. L'analyse comparée (en western blot pour OsHKT2;2; par SDS-PAGE pour TmHKT1;4) des protéines totales et du surnageant (et/ou du culot) permet d'évaluer l'effet de la présence du détergent sur l'efficacité de la traduction et sur le niveau de solubilisation de la protéine (ex. : Figure III.1A pour TmHKT1;4 exprimé en présence du détergent Brij58). Les tableaux B et C de la Figure III.1A résument les résultats obtenus. Pour OsHKT2;2, les meilleurs résultats ont été observés avec les combinaisons de détergents C12E8/Tween80 et C12E8/Brij58 alors que pour TmHKT1;4, le Brij58 seul est le plus efficace (pas d'inhibition sur la traduction, solubilisation > 90%, Figure III.1A).

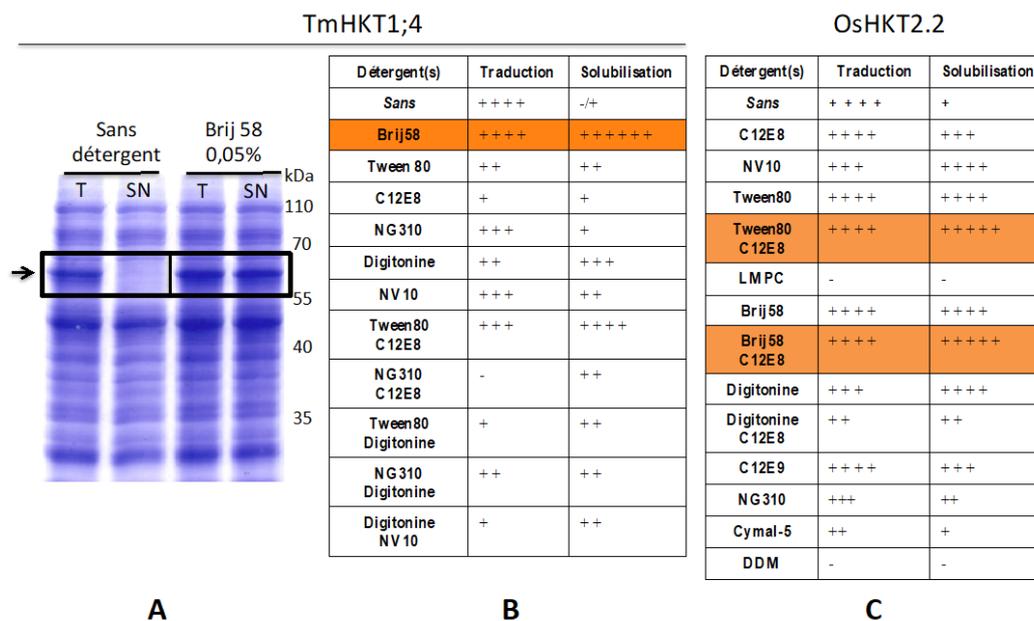


Figure III.1: Sélection des détergents solubilisant les transporteurs HKTs tagués exprimés en WGS. A : SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie après traduction et centrifugation des protéines totales (T) et du surnageant (SN). Un dixième de chaque traduction (contenant 0,5 μ l d'extrait WG) a été déposé par piste. La flèche indique la position de TmHKT1;4. **B** et **C** : tableaux récapitulatifs de l'effet des détergents sur la traduction et la solubilisation des protéines TmHKT1;4 (B) et OsHKT2;2 (C). Les détergents (ou mélanges de détergents) ont été testés à plusieurs concentrations.

Des premiers essais de purification par chromatographie d'affinité utilisant des billes magnétiques couplées à de la streptactine (anti-streptag) ou à des anticorps anti-His ont été engagées mais ont donné des résultats décevants à la fois quantitativement (co-purification d'autres protéines du WG) et qualitativement. L'approche « protéoliposomes » s'étant

révélée plus prometteuse (cf. ci-dessous), nous n'avons pas poursuivi pour l'instant l'optimisation de l'approche « détergents ».

2.3. Expression en présence de lipides

Le niveau d'expression de TmHKT1;4 étant beaucoup plus élevé que celui d'OsHKT2;2, nous avons décidé de concentrer nos efforts d'optimisation sur cet HKT.

Contrairement à l'approche « détergents », l'insertion des HKTs dans des liposomes offre la possibilité de vérifier la fonctionnalité de ces protéines (étape importante avant leur cristallisation) en réalisant des mesures électrophysiologiques sur protéoliposomes (PLs) par une approche de type « BLM (Black Lipid Membrane) » (cf. mesures fonctionnelles ci-dessous). De plus, la purification des PLs, de par leur faible densité, peut s'effectuer par centrifugation sur coussins discontinus de densité (coussins de flottaison). Ceci permet de séparer les PLs de toutes les protéines solubles de l'extrait WG mais aussi des éventuels agrégats des HKTs produits dans le WGS. Les HKTs peuvent donc être exprimés et purifiés en version native (sans tags), éliminant ainsi toute interférence potentielle de séquences exogènes sur la structure de la protéine lors de la caractérisation fonctionnelle ou des études structurales en perspective (après cristallisation). De nouvelles constructions permettant l'expression des protéines HKTs dépourvues de séquences exogènes ont donc été obtenues. Parmi les lipides (asolectine, DOPC, DHPC, DMPC) que nous avons extrudés (homogénéisation de la taille des liposomes) puis testés en traduction *in vitro*, le DMPC (1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine) a donné les meilleurs résultats. En effet, le DMPC n'induit aucune inhibition de la traduction.

L'ultracentrifugation des protéines totales de la traduction a été réalisée sur un coussin de densité discontinu d'iodixanol (quatre coussins : 30%, 25%, 20%, 5%). Après ultracentrifugation, les PLs se retrouvent à l'interface 20%/5% (Figure III.2A). La couche supérieure visible dans la fraction 5% pourrait correspondre aux liposomes vides (aucune protéine n'étant détectée dans cette fraction). Nous avons vérifié par ailleurs que (i) la présence de TmHKT1;4 dans la fraction « PL » dépend de la présence de liposomes dans le mélange traductionnel, et (ii) l'essentiel de la protéine TmHKT1;4 présente dans les protéines totales peut être récupérée à l'interface 20%-5% du coussin de flottaison.

L'analyse de la fraction PLs par SDS-PAGE (Figure III.2B) montre que la protéine TmHKT1;4 constitue la protéine majoritaire des PLs, contrairement à OsHKT2;2 (Figure III.2D). En terme quantitatif et sur la base de ce type d'analyses, nous avons estimé qu'un seul kit CFS (contenant 1 ml d'extrait WG) permettrait de produire environ 1 mg de TmHKT1;4 purifié, une quantité compatible avec la cristallisation de la protéine. Le niveau de purification de TmHKT1;4 déjà obtenu a été considéré par S. Granier, notre collègue cristallographe, comme suffisant pour envisager sa cristallisation par LCP (Lipidic Cubic Phase; Caffrey, 2015). Un premier essai de cristallisation de TmHKT1;4 a été mené à l'IGF mais n'a pas été concluant (pas de cristaux détectés).

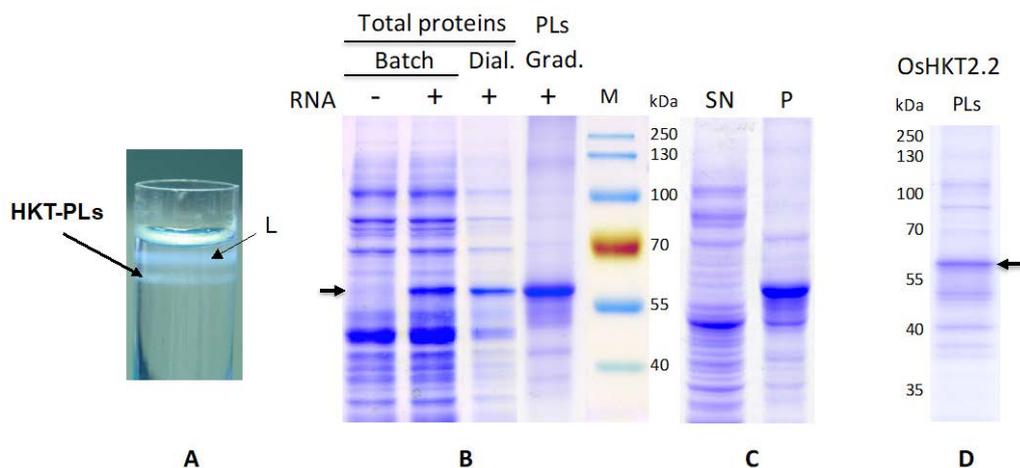


Figure III.2 : Expression en présence de lipides et purification de TmHKT1;4 (A, B, C) et d'OsHKT2;2 (D) en version native. **A** : Position des protéoliposomes de HKT (HKT-PLs) et probablement de liposomes vides (L), après ultracentrifugation des protéines totales du mélange traductionnel (WGS) sur coussin de flottaison d'iodixanol. **B** : Analyse des protéines totales après expression de TmHKT1;4 en batch (mélange réactionnel de 220 μ l contenant 5 μ l de WG) ou en dialyse («Dial.»; mélange réactionnel de 500 μ l contenant 38 μ l de WG, séparé d'un « feeding buffer » (14 ml) par une membrane perméable de cut-off de 10 kDa). Un témoin négatif sans ARN de TmHKT1;4 est présenté (1^{ère} piste, mode batch, RNA-). PLs Grad : fraction contenant les protéoliposomes de TmHKT1;4 prélevée après ultracentrifugation (12000 rpm, 20 min) du mélange de traduction réalisée en mode dialyse (voir A). **C** : Surnageant (SN) et culot (P) d'une centrifugation (12000 rpm, 20 min) des protéines totales du mélange de traduction, réalisée en mode batch. **D** : fraction HKT-PL prélevée après ultracentrifugation du mélange traductionnel d'OsHKT2;2. Proportion du volume initial déposé par type d'échantillon : batch (protéine totales, SN et P) : 1/10^e ; dialyse : 1/80^e ; fraction PL : 1/12^e.

En LCP, la monooléine (MO), est la matrice lipidique dans laquelle la protéine est insérée. L'absence de cristaux dans cette première tentative a pu résulter de la trop faible concentration d'HKT dans le mélange DMPC/MO ou de la trop grande proportion de DMPC dans le mélange qui pourrait empêcher la formation de la phase la plus favorable à la cristallisation (phase dite « éponge » ou « sponge phase »). Nous avons donc cherché à enrichir les PLs en MO, voire à remplacer le DMPC par la MO. Les liposomes purs de MO n'ont pas pu être obtenus. Des liposomes mixtes DMPC:MO ont par contre pu être obtenus à un rapport 1:5 et nous avons montré que TmHKT1;4 était aussi efficacement exprimé dans le WGS en présence de ces liposomes mixtes qu'en présence de liposomes de DMPC seul.

Nous réalisons actuellement les dernières optimisations concernant le rapport HKT/lipides avant de lancer un deuxième essai de cristallisation sur des PLs mixtes (DMPC/MO) de TmHKT1;4.

2.4. Les transporteurs HKT produits in vitro sont fonctionnels dans un système lipidique artificiel (BLM)

Une BLM (Black Lipid Membrane) est une membrane lipidique artificielle formée sur un micro-orifice séparant expérimentalement deux compartiments de composition ionique

identique ou différente (Figure III.3A). Une fois le transporteur inséré dans la BLM, des mesures électrophysiologiques peuvent être réalisées grâce aux électrodes placées de part et d'autre de la membrane. Les courants mesurés consécutifs à l'application d'une série de voltages permettent de préciser les caractéristiques fonctionnelles du transporteur. L'avantage de ce système est que si un seul type de transporteur est inséré dans la BLM et s'il est fonctionnel, il est possible d'avoir accès aux conductances unitaires de ce transporteur. Or, ces caractéristiques électrophysiologiques intrinsèques aux transporteurs sont en général difficiles à obtenir par d'autres méthodes (patch excisé sur ovocytes de xénope par exemple) et n'ont pas été décrites à ce jour dans la littérature.

Des analyses fonctionnelles sur les fractions PL des deux HKTs ont donc été réalisées en BLM, en utilisant l'Orbit Mini un appareil commercialisé par Nanion (<https://www.nanion.de/en/products/orbit-mini.html>, Figure III.3A). Ce système expérimental a l'avantage d'être sensible (faible bruit de fond, détection de courants de l'ordre de quelques pA), très compact, et permet de réaliser des mesures sur 4 BLMs simultanément.

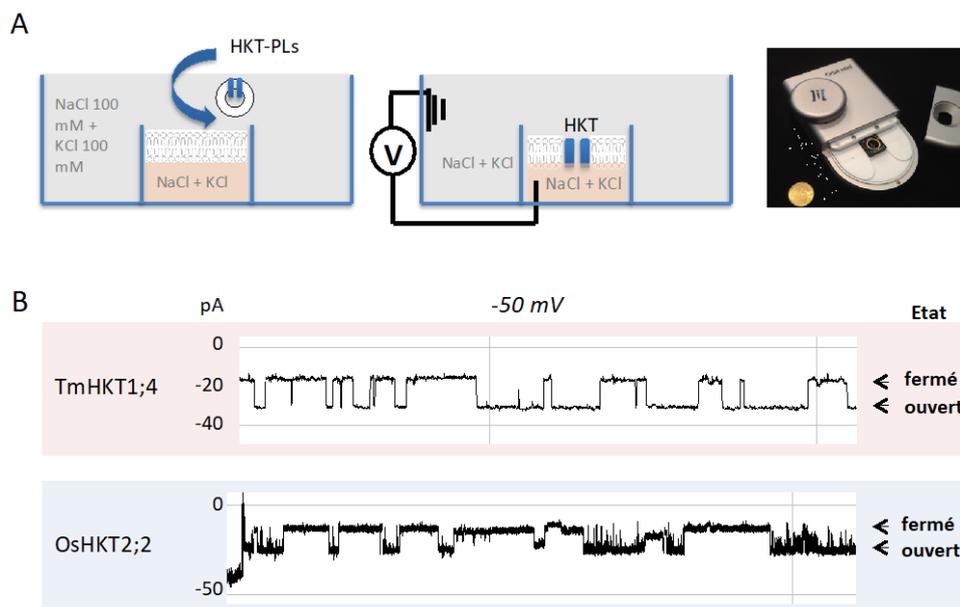


Figure III.3: Les HKTs exprimés *in vitro* sont fonctionnels dans le système BLM. **A :** Principe expérimental des BLMs (voir texte) et image de l'Orbit Mini[®] (Nanion) utilisé pour les analyses en BLMs. Une bicouche artificielle de DPhPC (diphytanoyl phosphatidylcholine) est obtenue pour chacun des petits compartiments (sur des orifices de 50 µm de diamètre). Les PLs de HKT purifiés sur gradient de densité sont ensuite fusionnés avec cette membrane en présence d'une force ionique locale élevée (KCl 3 M). **B :** Exemples de signaux obtenus illustrant les variations de courants générés après application d'un voltage (ici -50 mV) sur les BLM fusionnées avec des PLs de TmHKT1;4 et OsHKT2;2. La solution ionique de part et d'autre de la BLM contient un mélange de KCl et de NaCl (concentration de chacun de ces sels: 100 mM). Les différents niveaux de courants reflètent différents niveaux d'ouverture des transporteurs HKT.

Les enregistrements, dont un exemple est illustré dans la Figure III.3B, montrent que l'application d'un voltage sur les BLMs contenant OsHKT2;2 ou TmHKT1;4 purifiés sur coussin de flottaison, génère des courants de l'ordre de quelques pA. Ces courants, non

déTECTABLES en l'absence d'addition (et fusion à la BLM) de PLs de HKT, révèlent des événements d'ouvertures/fermetures de type canal. De manière intéressante, différents niveaux d'ouverture peuvent être observés pour OsHKT2;2, qui pourraient révéler l'activité de multimères d'HKT ou des processus de coopérativité entre différentes molécules de ce transporteur. Globalement, nos données BLM indiquent que les deux transporteurs HKTs produits *in vitro* et insérés dans des proteoliposomes sont fonctionnels.

3. Conclusion et Perspectives

Nous avons pu montrer que le système d'expression acellulaire d'extrait de germe de blé permet un niveau de production élevé des transporteurs membranaires de céréales étudiés. La fonctionnalité des transporteurs ainsi produits a été vérifiée par électrophysiologie dans des membranes artificielles (BLM). Une valorisation des résultats d'expression et d'analyse fonctionnelle des HKT étudiés est envisagée très prochainement.

Les optimisations de différents paramètres clés depuis la production des HKTs *in vitro* jusqu'à l'insertion dans des protéoliposomes mixtes DMPC:MO vont nous permettre de tester à nouveau la possibilité de cristallisation des transporteurs. Ce travail sera engagé à l'IGF avec notre collaborateur S. Granier.

L'obtention puis l'analyse de la structure 3D permettra d'identifier les déterminants moléculaires impliqués dans la spécificité ionique (Na^+/K^+). Ces données devront être confirmées par des études structure/fonction visant à évaluer l'effet de mutations dans les régions concernées sur l'activité de transport, analysée par électrophysiologie en système BLM ou après expression dans des ovocytes de xénope. Afin de préciser les conséquences physiologiques de telles mutations *in planta*, des plantes exprimant des versions mutées de HKT seront obtenues puis phénotypées sur la base de leur tolérance à la salinité et de leur teneur en Na^+ et K^+ dans les feuilles, les racines et la sève xylémienne en conditions standard ou de stress salin. Enfin, outre une meilleure compréhension des propriétés de transport et de la sélectivité ionique chez les HKT de céréales, la connaissance des séquences protéiques impliquées pourrait permettre de faciliter à terme la sélection de plantes (par « molecular breeding ») moins sensibles à la salinité grâce à leur capacité à maintenir un rapport Na^+/K^+ faible dans les parties aériennes.

Chapitre IV

Initiation de la thématique *Microbiote et fonctions racinaires*: premiers résultats

1. Introduction: analyse du contexte et mise en place de la stratégie de recherche

Les plantes exsudent de grandes quantités de composés organiques dans le sol, favorisant le développement des micro-organismes. La quantité réelle de carbone (C) investi dans l'exsudation racinaire, qui peut varier de 5 % à 50 % de la photosynthèse nette (el Zahar Haichar et al., 2016; Venturi et Keel, 2016), dépend très vraisemblablement de la santé de la plante, de son niveau de développement, de son microbiote racinaire et de la disponibilité des nutriments dans le sol (Clarkson, 1985). Un processus de chimiotaxie par les exsudats racinaires contribue à la sélection des espèces microbiennes constituant le microbiote rhizosphérique, dont la composition se différencie de celle des communautés microbiennes vivant en dehors de la rhizosphère (Bulgarelli et al., 2013). La nature des exsudats impliqués dans cette communication chimique et les mécanismes sous-jacents ont encore été relativement peu caractérisés (Oburger et Jones, 2018). De plus, les programmes d'amélioration des plantes cultivées par sélection de géotypes élites sur des sols fortement artificialisés par des apports d'engrais ont très probablement impacté l'aptitude des cultivars à établir des interactions, coûteuses en termes de quantités de photosynthétats exsudés, avec des micro-organismes bénéfiques du sol (Preece et Penuelas, 2020).

De nombreuses études indiquent que le développement du système racinaire est affecté par le microbiote que la plante sélectionne et nourrit dans la rhizosphère (Bulgarelli et al., 2013). En retour, ces bactéries peuvent exercer un effet bénéfique sur la croissance de la plante. De telles bactéries sont appelées de façon générique PGPR, pour "*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*". Les PGPR favorisent la croissance des plantes *via* des mécanismes très divers, tels qu'une amélioration de la nutrition minérale résultant de la solubilisation de sources de nutriments peu solubles, la production de phytohormones qui affectent le développement du système racinaire et souvent stimulent le développement des poils absorbants, et la protection contre les phytoparasites *vial* par exemple des processus de compétition pour l'acquisition des ressources du sol (Vacheron et al., 2013).

Des études conduites dans notre laboratoire ont montré que le rhizobium *Mesorhizobium loti* se comporte comme une PGPR lorsqu'il interagit avec *Arabidopsis thaliana*, en provoquant une augmentation de la biomasse produite ainsi qu'une forte augmentation, de plus de 100%, de la longueur des poils absorbants (Poitout et al., 2017). Le travail de doctorat de Thanyakorn Rongsawat (que j'ai co-encadré) a également révélé une forte stimulation de l'élongation des poils absorbants par différentes souches bactériennes diazotrophes chez le blé dur. Il est raisonnable de faire l'hypothèse que la stimulation des poils absorbants par de telles bactéries se traduit par une amélioration de la nutrition minérale de la plante puisque les poils absorbants jouent un rôle majeur dans l'exploration du sol et l'acquisition des ions nutritifs par le système racinaire (Rongsawat et al., 2021).

Dans le cadre de cette analyse bibliographique (Cf. aussi l'Introduction du chapitre 5 présentant mon projet de recherche), j'ai initié dans mon équipe et mon UMR, en

collaboration avec l'équipe d'Hervé Sentenac, **3 projets de recherche complémentaires** sur la thématique "*Microbiote et fonctions racinaires*". Ces projets ont été développés en utilisant le blé dur comme espèce modèle. Des collections de génotypes et des ressources génétiques extrêmement intéressantes ont été développées pour cette espèce sur notre campus par Jacques David et ses collègues (David et al., 2014), qui pourront nous permettre d'aborder, à terme, des recherches sur l'impact de la domestication et de l'amélioration sur les fonctions d'exsudation racinaire chez cette espèce, et éventuellement de développer des approches de type génétique quantitative.

Les 3 opérations complémentaires de recherche que nous avons développées ont eu pour objectif:

(i) La récupération de bactéries à partir de la rhizosphère de plans de blé dur cultivés au Liban et de blés sauvages se développant dans des zones refuges au Liban, un pays qui appartient à la "Région du Croissant Fertile" qui a vu la domestication du blé.

(ii) L'élaboration d'une méthodologie permettant de phénotyper le développement des zones pilifères et l'architecture racinaire chez des jeunes plantules de blé dur cultivés dans des dispositifs de type "rhizobox".

(iii) La mise au point d'un protocole de récolte des exsudats racinaires de plantules de blé cultivées en hydroponie dans des conditions axéniques.

Les résultats obtenus dans ces 3 directions sont résumés ci-dessous.

2. Résultats

2.1. Isolement et caractérisation physiologique et moléculaire de rhizobactéries associées au blé dur ou à ses ancêtres dans des sols libanais

Ce projet a bénéficié du travail de deux doctorants que j'ai co-encadrés, Thanyakorn Rongsawat (thèse soutenue en 2019) et Houssein Zhour (thèse en cours) (directeur des thèses: Hervé Sentenac). Des échantillons de sol rhizosphérique de blés prélevés au sud du Liban ont été obtenus grâce à une collaboration avec le laboratoire de Microbiologie de l'Université libanaise et l'IRAL (Institut de recherches agronomiques libanais).

Des échantillons de sol ont été mis en culture dans un milieu (Nfb) ne contenant pas d'azote (voir Figure IV.1). Ce milieu favorise sélectivement la croissance des bactéries diazotrophes et après 6 repiquages, un test ARA (réduction d'acétylène en éthylène) a été réalisé (travail conduit en collaboration avec Ezekiel Baudoin, UMR LSTM, Montpellier). Le test ARA permet de révéler l'activité de la nitrogénase, enzyme impliquée en conditions naturelles dans la réduction du N₂ atmosphérique en NH₄⁺ et présente chez les bactéries diazotrophes. A la suite de ce premier test ARA, les colonies bactériennes ont été individualisées et 16 souches se différenciant par leur morphologie, leur couleur et l'aspect de leurs marges ont été sélectionnées pour un nouveau test ARA. Les résultats sont présentés par la Figure IV.2 (panneau de gauche). Ces 16 souches ont ensuite été caractérisées en fonction de leur capacité à solubiliser des sources de phosphate (phosphate de calcium, phytate) et de potassium (feldspaths) insolubles. Les souches ont été déposées sur un milieu *ad hoc* contenant les sources insolubles d'ions ou de molécules additionné d'un colorant indicateur de pH. Un indice d'acidification et de solubilisation est déterminé pour chaque souche correspondant respectivement au rapport des diamètres du halo décoloré sur le diamètre de la colonie ou au rapport du diamètre de la zone solubilisée

sur le diamètre de la colonie (Figure IV.2, panneau central). Ce travail a révélé des capacités distinctes, parmi ces 16 souches, à se développer en présence de sources peu solubles de phosphore et potassium (Figure IV.2,

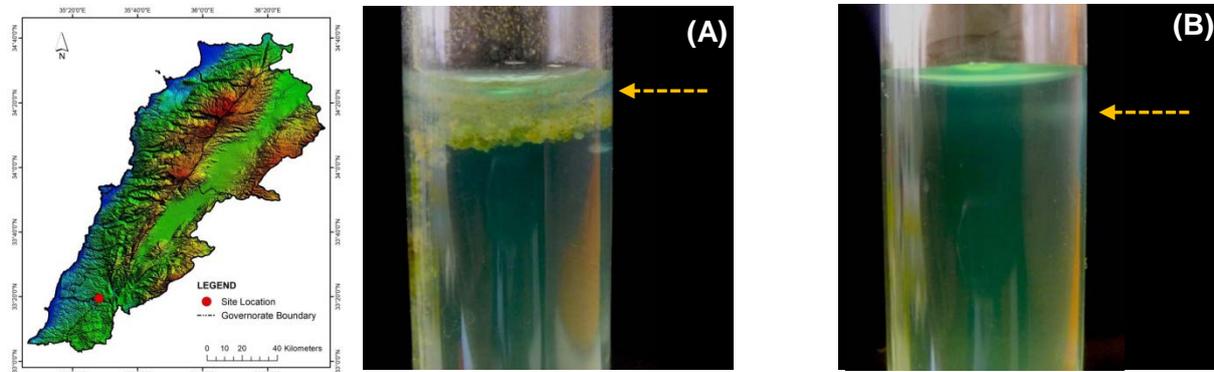


Figure IV.1. Récolte des souches bactériennes à partir de la rhizosphère des racines de blé cultivé dans le village de Zawtar Al-sharkiya près de la ville de Nabatiyeh au Liban (photo de gauche). Isolement des souches diazotrophes sur milieu sans N à partir du sol rhizosphérique (A) et sub-culture (3^{ème} repiquage) où un disque bactérien est visible sous la surface (B).

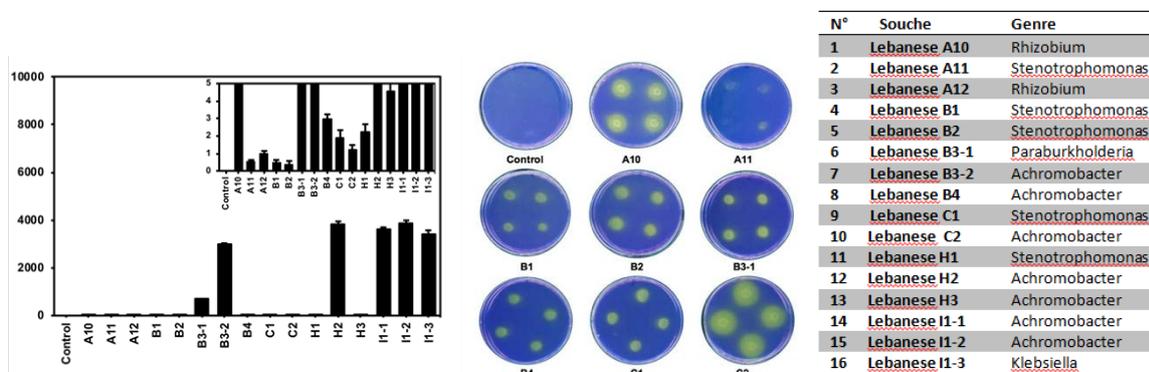


Figure IV.2. Caractérisation physiologique de souches de bactéries rhizosphériques isolées à partir de sol libanais. Panneau de gauche: capacité de réduction de l'acétylène des 16 souches bactériennes. Le test ARA (Acetylene Reduction Assay) permet d'évaluer l'activité de la nitrogénase des souches isolées donc leur capacité à réduire le N₂ atmosphérique. Panneau central: exemples de tests de la capacité de ces souches bactériennes à utiliser une source insoluble de phosphate (triphosphate de calcium). Panneau de droite: Identité des genres bactériens diazotrophes identifiés à partir du sol du croissant fertile.

Un séquençage du 16S et une amplification du gène NifH pour l'ensemble de ces 16 souches nous a ensuite permis respectivement d'obtenir l'identité des bactéries et confirmer leur statut de diazotrophes. Les souches bactériennes isolées appartiennent aux genres

Achromobacter, *Stenotrophomonas*, *Rhizobium*, *Paraburkholderia* et *Klebsiella*, tous connus pour posséder des espèces diazotrophes.

Dans une expérience préliminaire, nous avons sélectionné 3 de ces souches (dénommées B1, B3-2 et I3) pour tester leurs effets sur le développement racinaire de plans de blé cultivés en serre. Des souches de *Bradyrhizobium japonicum*, *Frankia sp* et *Azospirillum lipoferum* (souches ORS285 Δ nif, R43 et Azo4B, respectivement), diazotrophes "modèles" classiques, ont été utilisées comparativement. Les plantes ont été cultivées pendant 30 jours sur un substrat artificiel (tourbe/sable/perlite, 1/1/1 ; v/v/v) arrosé par une solution pauvre en azote. Les masses (sèches) des parties aériennes et des systèmes racinaires ont été déterminées à l'issue de cette période de croissance. Les résultats (Figure IV.3) révèlent une capacité des souches libanaises testées à se comporter comme des PGPR dans nos conditions expérimentales en stimulant la croissance des plantes. La souche libanaise B3-2 (*Achromobacter*) a induit une augmentation de production de biomasse qui était même supérieure à celle observée avec la souche d'*Azospirillum lipoferum* de référence Azo4B.

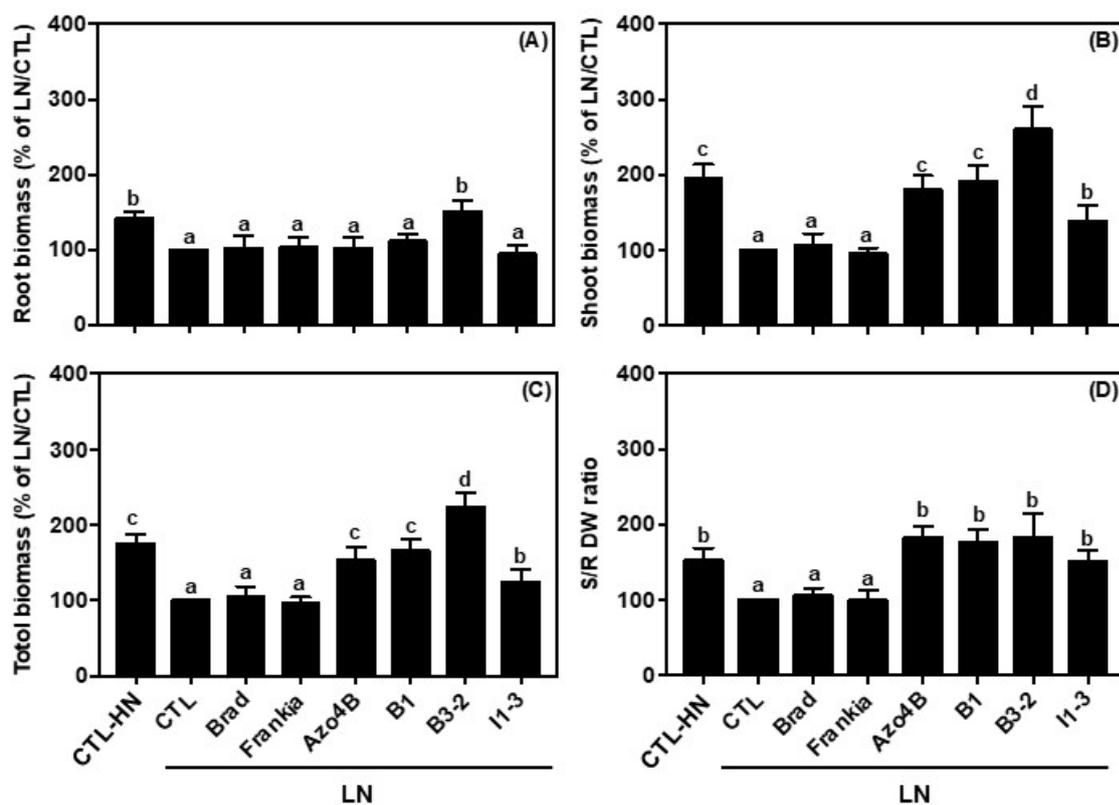


Figure IV.3. Effet de l'inoculation de souches bactériennes rhizosphériques libanaises sur la croissance du blé. Des plantes (*T. turgidum spp. durum* cv. Oued Zenati) ont été cultivées sur un sol artificiel (tourbe/sable/perlite, 1/1/1 ; v/v/v) pendant 30 jours après la transplantation des semis. Elles ont été arrosées tous les 3 jours avec une solution de Hoagland contenant 5 mM de NH_4NO_3 (traitement HN: condition "N élevé") ou avec une solution modifiée de Hoagland contenant 0,5 mM de NH_4NO_3 (traitement LN : condition "N faible"). Des plantes soumises au traitement LN ont été inoculées (inoculation du sol et des plants avant la transplantation) avec différentes souches rhizobactériennes. Un ensemble de 6 souches rhizobactériennes a été testé, dont 3 souches de laboratoire, *B. japonicum* souche ORS285 (Brad), *Frankia sp.* R43 (Frankia), *Azospirillum lipoferum*

souche 4B (Azo4B), et 3 souches libanaises, dénommées B1, B3-2 et I1-3. Traitements de contrôle HN et LN : le sol et les plants repiqués n'ont pas été inoculés. Après 30 jours de culture, les masses sèches des parties aériennes et des systèmes racinaires ont été déterminées et exprimées en % des valeurs correspondantes observées par les plantes (CTL) non inoculées et arrosées par la solution LN.

2.2. Développement d'une méthodologie de phénotypage des zones pilifères et de l'architecture racinaire

À la surface des racines, les poils absorbants sont au carrefour de la nutrition minérale de la plante et de ses interactions avec les microbes bénéfiques du sol. Notre objectif a été d'établir une méthodologie de phénotypage du développement des poils absorbants et de l'architecture racinaire. Thanyakorn Rongsawat (doctorant que j'ai co-encadré; Cf. aussi § 2.1 ci-dessus) a participé à ce projet, et Ikram Madani (doctorante que je co-encadre; directrice de thèse: Anne-Aliénor Véry) y participe aujourd'hui.

Des expériences préliminaires que nous avons réalisées afin d'évaluer la capacité de souches bactériennes différentes à favoriser l'élongation des poils des racines sur le blé dur (Rongsawat et al., 2019) avaient été effectuées en utilisant de très jeunes semis développés sur milieu gélosé en boîte de Petri. Une telle méthodologie est souvent utilisée dans la littérature, en particulier avec la plante modèle *Arabidopsis*. Notre objectif a été de développer un autre type de procédure en prenant en compte les 3 raisons suivantes :

- Après la germination, les semis de blé se développent plus rapidement que les semis d'*Arabidopsis*, et les boîtes de Petri de taille classique semblent trop petites pour permettre le développement des semis de blé pendant plus de quelques jours après la germination.
- Dans les semis cultivés sur milieu gélosé, certaines parties des systèmes racinaires sont présentes à l'intérieur de la gélose, tandis que d'autres racines poussent juste à la surface de la gélose ou au-dessus de la gélose (dans l'air à environ 100 % d'humidité relative). Dans nos tests, nous avons constaté que les poils des parties racinaires développées à l'intérieur de la gélose présentent une taille réduite alors que ceux des parties racinaires développées à l'air au-dessus de la gélose sont nettement plus longs. De telles différences étaient susceptibles de conduire à un choix "subjectif" des zones du système racinaire à analyser et donc d'introduire un biais dans l'analyse quantitative de l'allongement des poils racinaires.
- La manipulation et le transfert des racines sur une lame de verre pour l'observation au microscope sont susceptibles d'entraîner des dommages impactant le phénotypage des poils absorbants. De tels dommages pourraient par exemple être plus importants sur les poils de racine les plus longs, ou les poils les plus longs pourraient "retomber" le long de la racine et deviendraient alors difficilement observables.

La culture sur milieu gélosé ou en hydroponie étant donc difficilement compatibles avec notre cahier des charges, nous nous sommes orientés vers la mise au point d'un dispositif de type rhizobox.

Différents prototypes de type rhizobox" ont été successivement évalués. Ils se distinguaient, par exemple, par le substrat (sol artificiel, papier filtre ou tissu) dans lequel - ou à la surface duquel - les racines des plantules se développaient. La croissance à la surface d'un tissu est apparue comme la meilleure solution (l'utilisation de papier filtre provoquant rapidement des contaminations par des espèces fongiques). Différents types de tissus synthétiques (non dégradables par des micro-organismes) ont été testés (différents

matériaux et tailles de maille). Ensuite, nous avons considéré qu'un substrat solide devait être introduit "derrière" le tissu, remplissant l'espace entre les deux plaques de verre du rhizobox, afin de "tamponner" et de contrôler le niveau d'humidité à la surface du tissu. Les essais réalisés avec des sols artificiels (sable, perlite, vermiculite et mélanges) ont révélé que la pression du substrat contre le tissu et la plaque de verre présentait de fortes hétérogénéités locales, en particulier lorsque le substrat était rendu humide par l'arrosage, et que ces hétérogénéités affectaient profondément le développement final de l'architecture du système racinaire, les racines poussant à travers les zones où la pression est plus faible. La solution à ce problème a consisté à introduire un "panneau solide" de mousse de polyuréthane "derrière" le tissu. Le panneau de mousse de polyuréthane a les dimensions d'une feuille de papier A4 (ou A3), puisque les rhizoboxes sont scannés avec un scanner haute résolution A4/A3. L'épaisseur de ces panneaux de mousse est de 10 mm. En pratique, un morceau de tissu un peu plus grand que deux feuilles A4 est cousu pour former un sac de dimensions A4, dans lequel le panneau de polyuréthane est introduit. Le rhizobox est ainsi rendu symétrique et des plantules peuvent être cultivées entre le tissu et la plaque de verre des deux côtés du rhizobox.

La figure IV.4 fournit une description schématique du prototype de rhizobox actuellement utilisé. Un système d'arrosage automatique des plantes, commandé par une horloge, a été installé sur le dispositif expérimental. Le système racinaire peut être scanné périodiquement de façon non destructive. La Figure VI.4 présente un exemple de scan, obtenu pour une plantule de blé âgée de 2 semaines environ.

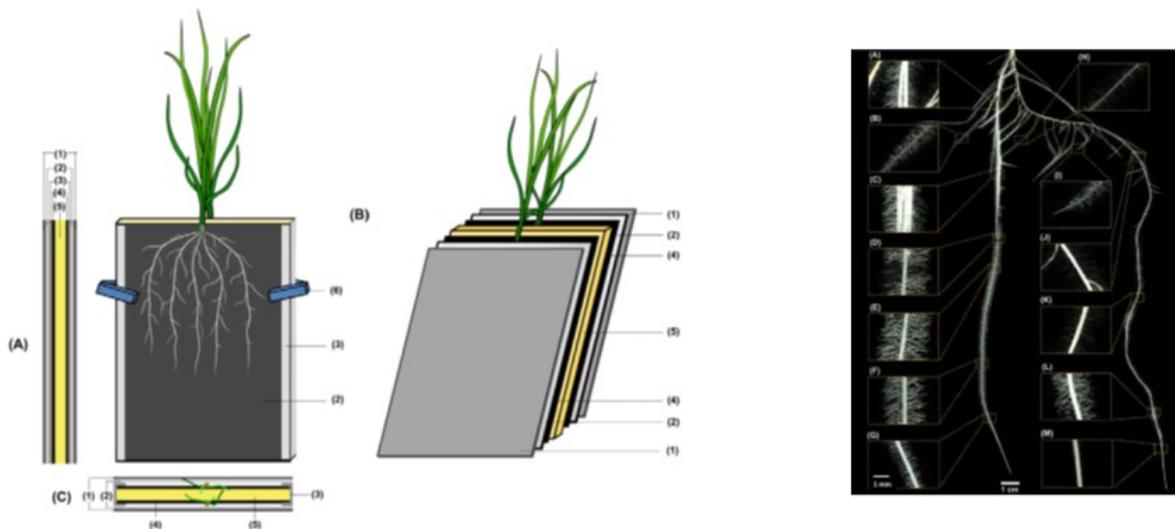


Figure IV.4. Phénotypage du développement des zones pilifères et de l'architecture racinaire de plantules de blé. Panneaux de gauche: prototype de rhizobox utilisé. Vue de côté (A), vue de face (B) et vue de dessus (C). (1) Panneau de mousse non transparent avec feuille d'aluminium (260×320×4 mm) assurant une protection extérieure contre la lumière (c'est-à-dire empêchant la lumière d'atteindre les racines). (2) Plaque de verre (260×320×2 mm). (3) Profilés d'aluminium en U assurant le maintien des plaques de verre (200×320×15 mm.). (4) Tissu technique en polyester (100%) noir (de maille 18 μ m) sur lequel se développe les racines. (5) Panneau solide en mousse de polyuréthane (260×320×15 mm). Ce panneau est "ensaché" dans le tissu de polyester. (6) Pince à ressort en nylon assemblant et "clippant" les différentes plaques/parties constituant le rhizobox. Panneau de droite: exemple de scan d'un système racinaire. Des grossissements de différentes zones du système racinaire sont inclus dans l'image, permettant de visualiser les poils absorbants et illustrant la définition du scan.

Les scans des systèmes racinaires sont ensuite analysés avec différents logiciels, dont WinRhizo[®]. Des paramètres comme la longueur totale et la surface totale des racines, par classe de diamètre, ou la longueur totale et la surface totale des poils absorbants, à différentes "profondeurs" dans le rhizobox ou à différentes distances de la graine, peuvent être obtenus.

Une première série d'expériences a révélé des réponses distinctes, en termes de croissance des racines et de développement des poils absorbants, à la faible disponibilité de phosphate ou d'azote et à l'inoculation d'une souche de *Bradyrhizobium japonicum* chez des plantules de blé (*Triticum turgidum* L. spp. durum cv. Oued Zenati) âgées de 2 semaines. La figure IV.5 fournit un exemple d'analyse quantitative de scans obtenus dans cette première série d'expériences.

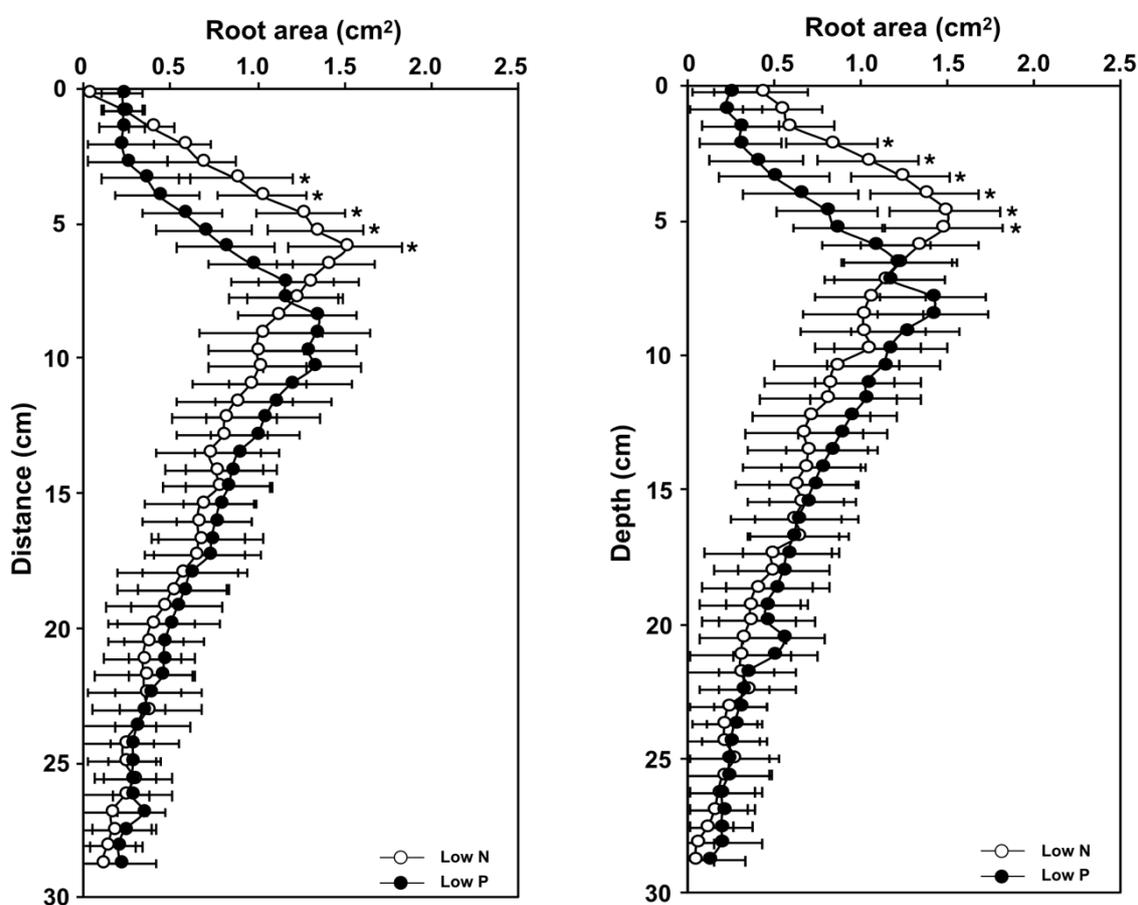


Figure IV.5. Comparaison des effets des conditions de faible disponibilité en N ou en P sur le développement du système racinaire. Les plantes (non inoculées) ont été cultivées dans des rhizoboxes pendant 12 jours, en étant arrosées avec une solution LN ("low N", cercles ouverts) ou LP ("low P" ; symboles noirs). Des images (scans) de 10 systèmes racinaires à la fin de la période de croissance de 12 jours ont été analysées à l'aide du programme ACRT (Analysis of Complex Root Tool; développé par Volker Baecker, Montpellier RIO Imaging), permettant de déterminer la surface des racines (dérivée du nombre de pixels sur l'image 2-D) en fonction soit de la distance à la graine (panneau A), soit de la profondeur "dans le sol" (panneau B), c'est-à-dire la distance à la ligne horizontale au sommet du rhizobox qui correspondrait à la "surface du sol où la germination aurait eu lieu".

Moyenne \pm SE, n = 10 systèmes racinaires par condition. Le symbole * indique une différence statistiquement significative à $p < 0,05$ (test t de Student).

2.3. Mise au point d'un protocole de récolte des exsudats racinaires de plantules de blé cultivées en hydroponie dans des conditions axéniques

Les exsudats racinaires "alimentent" le microbiote de la rhizosphère, jouent un rôle dans la signalisation et l'établissement d'interactions entre racines et bactéries bénéfiques ainsi que dans des processus d'allélopathie affectant le développement des plantes "compagnes" environnantes (éventuellement "mauvaises herbes" dans une culture).

Nous avons souhaité disposer d'une méthodologie permettant de récolter des exsudats racinaires de façon "relativement simple", afin de comparer des accessions/cultivars de blé, dans des conditions abiotiques (disponibilité des ions nutritifs dans le milieu) et biotiques (présence ou non de bactéries PGPR) diverses. Ce cahier des charges a conduit à choisir de cultiver les plantes en hydroponie dans des conditions axéniques, une aliquote de la solution nutritive étant prélevée à la fin de la culture pour une analyse de type métabolomique.

Le travail sur ce projet est mené par le doctorant Houssein Zhou (que je co-encadre; Cf. aussi le paragraphe 2.1 ci-dessus).

Dans la littérature, les protocoles classiques de récolte d'exsudats racinaires utilisent souvent des plantes cultivées en hydroponie dans une solution nutritive (non axénique), dont les systèmes racinaires sont ensuite rapidement "lavés" puis transférées pendant une période de quelques heures dans un petit volume d'eau pure, qui est récupéré pour analyser les "exsudats" libérés par les racines (Wang et al., 2006; Luo et al., 2015; Oburger et al., 2018; Li et al., 2019; Shinano et al., 2020).

Nous avons consenti un investissement méthodologique important pour développer une procédure permettant de cultiver pendant plusieurs semaines de façon axénique une plante dans un volume *ad hoc* de solution nutritive. Les dispositifs imaginés étaient peu "physiologiques" (e.g., culture des plantes dans des boîtes de type Magenta) ou devenaient de plus en plus complexes, réduisant les possibilités de tester des séries de plantes et/ou de conditions environnementales assez larges. Une idée très simple, basée sur les protocoles de bactériologie a permis les échanges gazeux entre l'atmosphère du tube et l'extérieur. Le dispositif de culture est présenté par la figure IV.6. Les plantules peuvent se développer au moins pendant 2 semaines sur ce dispositif. En fin de culture, il est systématiquement procédé à une vérification de la stérilité de la solution et des racines par étalement sur un milieu nutritif gélosé en boîte de Petri.

Ce protocole assure une récolte des exsudats émis sur une période de durée déterminée, sans manipulation du système racinaire (pouvant conduire à des blessures, par exemple la cassure de poils absorbants, et donc au relargage de composés organiques ne correspondant pas à des exsudats), sans stress osmotique (par rapport à une exsudation dans de l'eau pure), et en absence de micro-organismes contaminants (mais éventuellement en présence d'un micro-organisme sélectionné).

Dans des expériences préliminaires nous avons récemment analysé par HPLC des aliquotes de solutions nutritive obtenues par ce protocole. Les chromatogrammes obtenus

ont montré différents pics, dont certains sont susceptibles de correspondre à des exsudats classiques tels que l'acide malique et différents autres acides organiques.



Figure IV.6. Dispositif de culture pour la récolte d'exsudats racinaires: plantule de blé dur de 21 jours (variété Zagharine, élite libanaise) cultivée en hydroponie stérile.

Très récemment, nous avons obtenus des résultats d'analyses effectuées par la plateforme de métabolomique de Toulouse. Les solutions nutritives analysées avaient été récoltées après 7 et 14 jours de culture. Les molécules organiques des échantillons ont été purifiées sur colonne C18 (Sep Pak) et les éluats ont été lyophilisés. Les échantillons ont été repris dans 0.1% FA (acide formique) puis analysés sur la plateforme de métabolomique de Toulouse. Les résultats préliminaires obtenus sur un blé dur élite après 7 jours de croissance sur milieu nutritif montrent un profil de molécules exsudées composé d'acides organiques (acide cébacique, valérénique, azélaïque...), d'acides aminés (tryptophane, N-acétyltryptophane...) et de métabolites secondaires (DIMBOA-Glc, HMBOA-Glc...), composés qui sont, pour nombre d'entre eux, déjà connus pour être exsudés chez différentes plantes. Les benzoxazinoïdes (DIMBOA) constituent une classe attendue de molécules exsudées chez les céréales et sont impliquées dans les réactions de défense orientant les interactions du microbiote avec les racines.

La comparaison des molécules exsudées dans les différents blés d'un transect de domestication devrait permettre d'évaluer l'impact de la domestication sur les capacités d'exsudation des blés modernes, prémices de leurs capacités à interagir avec le microbiote.

3. Conclusion

L'investissement consenti au cours de ces 5 dernières années pour acquérir les ressources biologiques et les outils méthodologiques permettant de développer un projet sur la thématique *Microbiote et fonctions racinaires* a été réellement conséquent. Nous disposons aujourd'hui d'une collection de souches bactériennes à effet PGPR, dont certaines ont été isolées à partir de la rhizosphère de blés sauvages poussant des zones refuges au Liban. Nous avons aussi maintenant la possibilité de phénotyper le développement des zones pilifères et l'architecture racinaire chez des plantules de blé déjà relativement développées,

(pendant environ 2 semaines) dans des conditions de stress nutritionnel et/ou en présence de différentes souches de PGPR. Nous sommes aussi à même de recueillir et analyser les exsudats racinaires produits par des plantules de blé au cours de 2 ou 3 semaines de développement dans des conditions contrôlées, en termes de composition de la solution nutritive et de présence ou non d'un micro-organisme sélectionné.

Du travail reste à faire directement en aval de ces réalisations. Par exemple, nous devons procéder à un séquençage des souches bactériennes sélectionnées pour les identifier au niveau de l'espèce. Nous devons aussi investir du temps pour trouver les logiciels et procédures informatiques de phénotypage racinaire les plus adaptés à l'analyse automatique des scans que nous pouvons obtenir. Il nous faudra aussi essayer de minimiser les possibilités de perte des composés organiques volatiles lors de la préparation des échantillons contenant les exsudats racinaires en préalable à leur analyse métabolomique. Sans ignorer l'importance de ces différents enjeux, je considère ce travail initiateur est arrivé à son terme et me permet maintenant de développer un projet de recherche original dans le domaine des interactions entre la racine et son microbiote. Le chapitre 6 présente ce projet, que je propose dans le cadre de ma candidature à l'HDR.

Chapitre V: Projet de recherche

Exsudation racinaire, interaction avec le microbiote et nutrition minérale chez les blés sauvages et modernes

La photosynthèse par les parties aériennes et l'absorption minérale par les parties souterraines permettent à la plante de vivre de façon autotrophe. La disponibilité dans le sol des ions minéraux nutritifs nécessaires à la vie cellulaire constitue souvent le facteur limitant de la croissance des plantes. Pour faciliter le prélèvement de ces ions, le système racinaire a la possibilité d'établir des interactions bénéfiques avec des micro-organismes du sol, qui favorisent la nutrition hydrominérale de leur hôte, par exemple en solubilisant des minéraux nutritifs, qui deviennent ainsi plus disponibles, ou en absorbant (ou synthétisant dans le cas de la symbiose rhizobienne) ces éléments nutritifs et en les ré-excrétant directement au contact ou à l'intérieur de la plante, ou en modifiant l'architecture racinaire et en stimulant le développement des poils absorbants. La sélection et l'alimentation en substrats carbonés de ce microbiote impliquent une exsudation de composés organiques en direction de ces micro-organismes par les racines. L'importance de l'investissement que la plante doit concéder pour la mise en place et l'entretien de telles interactions bénéfiques, en termes de quantités de composés carbonés transmis aux microorganismes partenaires, augmente lorsque les ions nutritifs sont faiblement disponibles dans le sol (Clarkson, 1985). Prélèvement racinaire nutritif, exsudation racinaire, sélection et entretien du microbiote sont donc des processus en très forte interaction. Il est raisonnable d'imaginer que les plantes ont mis en place des mécanismes visant à permettre l'établissement d'un cercle vertueux entre ces processus et à optimiser le rapport bénéfice/coût de l'investissement dans la fonction d'exsudation racinaire. Dans le cadre de cette hypothèse, parce qu'un fort niveau de fertilisation réduit chez la plante le besoin d'entretenir des interactions symbiotiques coûteuses avec les micro-organismes du sol. Il est très probable que la sélection de plantes élites sur des sols artificialisés a impacté quantitativement et qualitativement les capacités d'exsudation racinaire et d'interactions avec les microorganismes du sol. Autrement dit, il est à craindre que les cultivars élites sélectionnés pour une production optimale dans des conditions de sols artificialisés aient des capacités de communication et d'interactions bénéfiques avec les microorganismes du sol dégradées par les processus de sélection.

Le projet de recherche que je propose s'inscrit dans le cadre général de cette analyse, dont certains aspects vont être présentés de façon plus détaillée ci-dessous, avant la description du programme *sensu stricto*. Les différents travaux qui ont été réalisés au cours de la thèse de Ron (Thanyakorn Ronsawat) et actuellement de celle d'Houssein (Zhour) et d'Ikram (Madani) vont nous permettre d'aborder l'étude du "cercle" des interactions entre nutrition minérale, exsudation racinaire et microbiote à différents niveaux. L'utilisation du blé comme plante modèle nous permettra d'inscrire ce travail dans le questionnement actuel concernant les conséquences des modes de sélection de cultivars élites utilisés actuellement sur les possibilités de réduction des intrants agricoles, dans une démarche de promotion de pratiques durables.

1. Introduction bibliographique

L'agriculture moderne a permis une augmentation conséquente des rendements améliorant *de facto* la sécurisation alimentaire au niveau mondial mais entraînant dans le même temps une dégradation de nombreux services écosystémiques. Cette dégradation est largement due à une chute drastique de la biodiversité, conséquence d'une simplification extrême des agro-écosystèmes et de leur artificialisation, et de la pollution résultant de ce modèle

agricole. Aujourd'hui, la compréhension des relations trophiques complexes au niveau du sol liant le microbiote aux plantes permet d'envisager une utilisation plus efficace des ressources hydrominérales et une meilleure aptitude à gérer certains stress biotiques ou abiotiques dans un nouveau modèle agricole plus diversifié.

Des questions nombreuses et très diverses peuvent être posées dans cette perspective. Par exemple, récemment au laboratoire, nous avons montré que certaines souches diazotrophes dites PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) étaient capables d'augmenter la longueur des poils absorbants de plus de 100% chez l'espèce modèle *Arabidopsis* ainsi que chez le blé dur. Les conséquences de cet allongement des poils racinaires au niveau de la nutrition hydrominérale, de la croissance de la plante, de la composition des grains et du rendement ne sont pas connues.

Les relations plantes-microbiote sont dynamiques mais après les premières étapes de domestication il y a 10 à 12000 ans, les populations de plantes cultivées ont été éclatées dans des biotopes très différents, au hasard des migrations humaines. Concomitamment à ces migrations et échanges, une sélection empirique a permis l'adaptation et la création d'une multitude de variétés locales. Le cas des grandes céréales comme le blé dur en est un exemple. A partir du XX^{ième} siècle avec l'intégration des lois de la génétique dans la sélection végétale et l'utilisation d'engrais, des schémas de sélection précis ont souvent été utilisés sur des sols ou substrats très artificialisés. De nombreux traits phénotypiques sélectionnés comme la taille de la plante, le nombre d'axillaires/talles formés, l'organisation des pièces reproductrices ont un lien étroit avec la balance phytohormonale ou sont susceptibles d'avoir eu un impact important sur le métabolisme. La communication plante-plante *via* les système racinaires et plante-microbiote implique la sécrétion de molécules du métabolisme primaire ou secondaire (sucres, acides organiques, flavonoïdes) mais aussi d'hormones (ex strigolactones) (Sawers et al., 2018). Les capacités actuelles des plantes à interagir avec le microbiote reflètent des altérations au cours des processus de sélection successifs, en particulier dans le cas des cultivars élite sélectionnés sur sol artificialisés. Cependant, pour le moment, les processus et facteurs susceptibles d'avoir contribué à cette altération (sélection sur substrats artificiels ou en présence d'engrais de traits impactant le métabolisme, dont la balance hormonale) n'ont encore été que très peu étudiés.

Le développement racinaire est un processus hautement plastique qui est influencé par les caractéristiques endogènes de la plante (contrôle génétique) et différents stimuli externes (impact environnemental) (Malamy, 2005). Ces stimuli externes peuvent être d'ordre abiotique (nutritionnel, stress mécanique...) ou biotique (symbioses, attaques pathogènes...). En outre, ces stimuli peuvent agir de façon synergique ou non. Par exemple, la disponibilité en P peut agir comme un signal externe avec un impact profond sur le développement du système racinaire (López-Bucio et al. 2003) mais dont les conséquences peuvent être contrecarrées par la mycorhization (Temagne et al., 2018). Au sein même du microbiote, il a été montré que l'inoculation de souches bactériennes (*Rhizobium*, *Azotobacter*) pouvait favoriser la mycorhization du blé avec un effet important sur l'architecture racinaire (Behl et al., 2003 ; Bartoli et al., 2020). Dans la nature, en particulier dans la rhizosphère, les plantes sont constamment défiées par des milliers de populations microbiennes différentes, y compris des commensaux, des agents pathogènes et des symbiotes. La rhizosphère est l'une des écosystèmes les plus complexes sur terre, accueillant et concentrant des millions de cellules microbiennes. La diversité microbienne dans la rhizosphère évolue en fonction des génotypes et des stades de développement de la plante et de l'environnement du sol. Les interactions des microorganismes qui coexistent dans la rhizosphère sont dynamiques, et les fluctuations des métabolites exsudés par les racines aident à façonner la composition du microbiote racinaire. La dynamique de la

croissance des racines et les processus d'exsudation modifient la composition chimique de la rhizosphère dans l'espace et le temps (Li et al., 2019).

Les métabolites libérés par les racines des plantes jouent un rôle important de signalisation dans la rhizosphère, dans la défense des plantes et la réponse aux stress abiotiques. Ces métabolites servent aussi à la reconnaissance des potentiels symbiontes et des plantes voisines. La détection des organismes (autres plantes ou micro-organismes) et les stratégies de réponse des plantes voisines vont déterminer le type de médiation entre les individus. Récemment, il a été montré que le blé, au travers d'une signalisation souterraine (exsudation de loliolide et de jasmonate) était capable de détecter une centaine d'autres espèces végétales et d'apporter une réponse allélopathique variable (Kong et al., 2020). Les mécanismes moléculaires permettant la perception de ces signaux par la plante ont été étudiés dans un certain nombre de symbioses, en particulier dans la symbiose légumineuses-Rhizobium, et les facteurs Nod qui participent au dialogue moléculaire entre les deux partenaires, et la symbiose AMF-plante avec les facteurs Myc. Les connaissances actuelles indiquent que les premières manifestations chez la plante du dialogue moléculaire avec son partenaire microbien sont généralement des changements du gradient de potentiel électrique transmembranaire des cellules de la périphérie racinaire, dont les poils absorbants, et des oscillations calciques au sein de ces cellules (Felle et al., 1995 ; Zebelo et al., 2012 ; Leborgne-castel et al., 2014 ; Yuan et al., 2017 ; Tian et al., 2020).

En modulant la composition des exsudats racinaires, les plantes peuvent modifier les propriétés du sol pour s'adapter et assurer leur survie dans des conditions défavorables. L'exsudation racinaire peut permettre une modification du pH du sol, ayant pour effet de solubiliser les nutriments sous des formes assimilables, la chélation de métaux ou de composés toxiques permettant leur absorption (e.g., le fer) ou leur immobilisation dans la rhizosphère (aluminium), l'attraction d'un microbiote bénéfique, ou la libération de substances toxiques pour des organismes pathogènes ou allélopathiques en général, pour la compétition avec d'autres plantes (Vives-Peris et al., 2019).

Les racines exsudent un répertoire diversifié de métabolites consommant de 10 à 50% du carbone fixé des plantes. La composition des exsudats est très variable suivant les plantes, le stade de développement, l'environnement... Par exemple chez *Arabidopsis thaliana* cultivée en hydroponie une centaine de composés ont été enregistrés, dont une quarantaine ont été identifiés (Strehmel et al., 2014). Cette diversité métabolique suggère un langage chimique végétal complexe qui sert d'intermédiaire dans d'innombrables interactions rhizosphériques. Par exemple, les coumarines et les benzoxazinoïdes sont des métabolites secondaires qui sont connus pour être exsudés par les racines et jouer un rôle dans la formation du microbiote racinaire (Stringlis et al., 2018; Cotton et al.2019). De petits changements dans la structure des communautés microbiennes sélectionnées par le système racinaire peuvent entraîner de grandes altérations des phénotypes de l'hôte (Brinker et al., 2019). Il a aussi été montré que le microbiote de la rhizosphère induit plusieurs signaux systémiques de l'hôte, qui déclenchent une reprogrammation métabolique et ainsi une exsudation radiculaire différentielle (Korenblum et al., 2020). Ce phénomène d'exsudation systémique de métabolites racinaires (SIREM systemically induced root exudation of metabolites), est modulé par la colonisation microbienne locale des racines. Certains métabolites exsudés sont allélopathiques et sont utilisés par la plante dans la compétition pour la lumière et la nutrition hydrominérale. Chez le sorgho, les exsudats racinaires contiennent plusieurs hydroquinones à longue chaîne, principalement la sorgoléone et son analogue le résorcinol, qui inhibent la croissance des plantes voisines par divers mécanismes, y compris l'inhibition de la photosynthèse et de la respiration (Czarnota et al., 2001; Dayan et al., 2010). La sorgoléone, le résorcinol et d'autres hydroquinones apparentées sont produits uniquement par des poils absorbants vivants et sont exsudés

sous forme de gouttelettes de couleur dorée à l'extrémité des poils (Czarnota et al., 2003; Dayan et al., 2009). Il a été vérifié que les gènes biosynthétiques clés responsables de la production de sorgoléone, en particulier *SOR1*, codant pour une désaturase, sont exprimés uniquement dans les poils absorbants (Yang et al., 2004). Les données de microscopie électronique suggèrent que de grandes quantités de ces globules sont déposées dans l'apoplaste (Czarnota et al., 2001, 2003).

Les benzoxazinoïdes (BX), tels que le 2,4-dihydroxy-7-méthoxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (DIMBOA), sont des métabolites secondaires dérivés du tryptophane et impliqués dans la défense des plantes contre les ravageurs et les pathogènes, que ces derniers soient aériens ou souterrains. Ils peuvent exercer aussi des activités allélochimiques ou antimicrobiennes. Ils ont été identifiés chez les monocotylédones, en particulier chez les Poacées et chez certaines dicotylédones (Mikic et Ahmad, 2018). Il a été montré que la synthèse et l'exsudation de DIMBOA chez le blé étaient amplifiées en présence d'adventices (Lu et al., 2012). Il a été montré que des bactéries PGPR comme *Pseudomonas putida* KT2440 présentent une augmentation de la transcription des gènes contrôlant le catabolisme et la chimiotaxie du benzoate, et que les racines de maïs de type sauvage produisant du DIMBOA attirent un nombre significativement plus élevé de *P. putida* que les racines du mutant *bx1* déficient en DIMBOA (Neal et al., 2012). Le DIMBOA joue ainsi un rôle chimique central dans le recrutement de rhizobactéries bénéfiques et de la communauté fongique pour les plantes (Cotton et al., 2019). L'acide azélaïque, un acide dicarboxylique synthétisé chez plusieurs céréales, joue un rôle dans la signalisation plantes-bactéries. Il est impliqué dans l'acquisition de la résistance systémique (SAR) chez les plantes (Lim et al., 2016). Plusieurs bactéries comme *Pseudomonas nitroreducens* peuvent utiliser l'acide azélaïque comme unique source de carbone, et il a été montré qu'AzeR est un répresseur bactérien qui répond spécifiquement à l'acide azélaïque et qui est présent chez seulement quelques genres de proteobactéries (Bez et al., 2020). Il a été par ailleurs montré que l'acide azélaïque est un acteur clé de la résistance à *Pseudomonas syringae* chez *Arabidopsis* (Jung et al., 2009 ; Cecchini et al., 2019).

Les plantes ont développé différents mécanismes pour sécréter de tels métabolites dans la rhizosphère, impliquant différents types de transports, passifs et actifs. Traditionnellement, la sécrétion des exsudats racinaires est considérée comme un processus passif, médié par différentes voies: par transport diffusif à travers la membrane plasmique de la racine, via des canaux ioniques, et par exocytose (Baetz et Martinoia, 2014). Les propriétés chimiques des composés à exsuder déterminent le processus de sécrétion correspondant.

Le transport diffusif concerne des molécules de faible poids moléculaire, comprenant des sucres, des acides aminés, des acides carboxyliques et des phénols. Ce processus est soumis aux gradients de concentrations entre le cytoplasme des cellules racinaires et la rhizosphère (Badri et Vivanco, 2009). Des canaux ioniques sont responsables de la sécrétion de glucides et de carboxylates spécifiques tels que le malate et l'oxalate. Plusieurs sortes de canaux anioniques ont été caractérisés comme perméables à ce type de composés, à des degrés divers, ainsi qu'à des d'ions inorganiques. (Cl^- et NO_3^-). Les canaux de type ALMT ("Aluminium-activated malate transporters") présentent une forte perméabilité au malate et au fumarate [par exemple, pour AtALMT6, une séquence de sélectivité fumarate > malate >> citrate > Cl^- > NO_3^- a été rapportée: Sharma et al., 2016]. Ce type de canaux joue un rôle important en particulier en exsudant des acides di- et tri-carboxyliques dans la tolérance à Al^{3+} , en complexant (immobilisant) cet ion toxique à la surface des racines. L'expression de gènes *ALMT* a également été observée comme sensible à des facteurs biotiques. Par exemple, une sécrétion accrue de malate suite à l'induction d'*AtALMT1* a été observée lorsque les tissus végétaux aériens ont été infectés par des

bactéries pathogènes, et l'hypothèse de la mise en place d'un mécanisme de défense des plantes impliquant la constitution d'un biofilm de bactéries bénéfiques à la surface des racines suite à l'exsudation de malate a été proposée (Rudrappa et al., 2008). En dehors des canaux de type AMLT, des canaux perméables à NO_3^- et Cl^- de type SLAC/SLAH, dont certains sont fortement exprimés dans les racines, présentent aussi une perméabilité (mais faible) au malate et bicarbonate (Geiger et al., 2009; Chen et al., 2010). L'exocytose, l'autre grand type de mécanismes de transport passif, est impliquée dans la sécrétion de métabolites de hauts poids moléculaire stockés dans des vésicules (Badri et Vivanco, 2009). Les métabolites exsudés proviennent du réticulum endoplasmique ou de l'appareil de Golgi et certains contribuent à la protection contre les agents pathogènes (Weston et al., 2012).

Concernant les systèmes responsables d'un transport actif d'exsudats racinaires, deux grandes familles de transporteurs membranaires ont été identifiées, appelées transporteurs ABC («ATP-Binding Cassette») et MATE («Multidroque et extrusion de composés toxiques») (Kang et al., 2011).

2. Projet

2.1. Sélection des cultivars de blé et des souches microbiennes

Nous avons initié une collaboration à partir de 2018 avec le laboratoire de microbiologie de l'Université Libanaise (Beyrouth) dirigé par Ali Chokr.

Housein Zhou, doctorant en co-tutelle entre nos 2 laboratoires, a identifié différents sites dans les provinces de Biswat, Ham et Nabi Chit où poussent des populations reliques de blé sauvages *T. t. dicocoides*. Ces blés sauvages correspondent très probablement aux populations originelles de blé présentes dans le croissant fertile il y a une dizaine de milliers d'années et utilisées par les agriculteurs du Néolithique lors des débuts de l'agriculture pour générer des blés aux caractéristiques agronomiques de plus en plus intéressantes. La première mutation sélectionnée est le maintien des épillets sur l'épi à maturité. Cette sélection a engendré l'apparition d'une nouvelle sous espèce *T. t. dicocum*, qui a été diffusée avec les migrations de l'agriculture. Cette sous-espèce a été remplacée progressivement par *T. t. durum* qui présente la particularité remarquable d'avoir, contrairement aux sous espèces ancestrales, des grains nus et donc beaucoup plus faciles à battre. Nous allons nous concentrer sur ces 3 sous-espèces *T. t. dicocoides*, *T. t. dicocum* et *T. t. durum*. Deux sous-espèces sur les 3 (*dicocoides* et *durum*) ont leur génome séquencé, ce qui représente un avantage significatif pour les approches aval décrites plus loin à savoir la protéomique et la transcriptomique (Maccaferri et al., 2019 ; Avni et al., 2017). Pour le choix des *durum*, nous prendrons un blé élite libanais (Zagharine) et un élite français (Anvergor).

Concernant maintenant le choix et l'isolement des souches microbiennes, des prélèvements de sol, de rhizosphère et de tissus racinaires de ces blés sauvages ont été effectués dans la localité de Nabi Chit. De nouveaux prélèvements seront effectués sur des *dicocum* et des *durum* élites cultivés dans les zones refuges au Liban et en France (station expérimentale de l'INRAE à Mauguio). Les sols de la Bekaa au Liban et ceux de Mauguio partagent des caractéristiques physicochimiques assez similaires avec un pH de 8.

Nous nous intéressons prioritairement aux espèces bactériennes diazotrophes car elles peuvent fournir un apport intéressant d'azote au blé. Dans un premier temps, l'objectif est de poursuivre la caractérisation des souches issues des échantillons de sol

rhizosphériques que nous avons commencé à traiter (Cf. Chapitre IV). Le travail d'isolement implique l'utilisation du milieu sélectif NfB semi-solide ne contenant pas d'azote. Ce milieu est contenu dans des tubes (vacuette) dont le bouchon présente un septum. Ce septum est utilisé lors des tests ARA (réduction de l'acétylène en éthylène par la nitrogénase) pour l'introduction de l'acétylène. Après isolement, une confirmation que la souche est effectivement diazotrophe sera apportée par une réaction de PCR ciblant le gène *NifH*. Nous évaluerons l'éventuelle capacité des souches bactériennes isolées à solubiliser des ions nutritifs dans le sol en nous focalisant sur le phosphate et le potassium. Pour cela, nous suivrons le développement des bactéries sur des milieux contenant des sources de P ou K faiblement disponibles (phosphate tricalcique ou feldspath, respectivement) et un indicateur coloré de pH permettant de détecter l'acidification du milieu (phénomène traduisant le développement des bactéries; Cf. chapitre IV).

Les connaissances ainsi acquises sur les souches bactériennes isolées nous serviront pour tester leur effet PGPR dans des conditions définies en termes de disponibilité de N, P et K. Nous testerons les effets des souches, en individuel ou en mélange, sur la croissance et le développement du blé. Ces tests se feront en pots en serre, sur un mélange inerte (vermiculite/sable/tourbe, 1/1/1, v/v/v) que nous avons déjà testé. Ce mélange sera arrosé par une solution nutritive de composition *ad hoc* (faible disponibilité de N, P et/ou K). Des mesures simples de matières fraîches et sèches seront réalisées. La teneur en éléments minéraux essentiels (y compris des oligo-éléments) sera déterminée sur la plateforme SAME de notre UMR.

Le séquençage 16S renseignera sur le genre auquel les souches bactériennes isolées appartiennent. Un travail de caractérisation moléculaire, en vue d'identifier l'espèce au sein de ce genre, *via* un séquençage génomique, sera effectué pour des souches sélectionnées.

L'objectif est de disposer à terme d'une collection de souches bactériennes diazotrophes issues de sols rhizosphériques prélevés sur de blés sauvages ou modernes au Liban, et ayant individuellement des effets de type "PGPR" sur des accessions/cultivars de blé. Des communautés synthétiques de bactéries pourront aussi être constituées et testées.

Il me semblerait très intéressant que ce travail sur les espèces bactériennes soit complété par des analyses semblables sur les espèces fongiques présentes dans les mêmes échantillons de sols. De telles analyses pourraient être conduites par des collègues de Dijon (Pierre-Emmanuel Courty) et Toulouse (G. Bécard, C. Roux et B. Lefebvre). Des échantillons de sols rhizosphériques libanais ont déjà été fournis à Pierre-Emmanuel Courty, et utilisés par une étudiante dans le cadre de son travail de stage de M2. L'isolement de souches mycorhiziennes pourrait par exemple permettre la caractérisation des exsudats mycorhiziens, à l'instar de ce que nous prévoyons de faire pour les souches bactériennes (Cf. ci-dessous).

2.2. Disponibilité des ions nutritifs, microbiote et développement racinaire

Les PGPR peuvent améliorer la nutrition minérale de la plante, et favoriser sa croissance, *via* différents mécanismes comme la solubilisation des ions nutritifs, qui deviennent ainsi plus disponibles pour la plante. Le paragraphe ci-dessus prend en compte cette possibilité. Une amélioration de la nutrition minérale peut aussi résulter de modifications de l'architecture

racinaire et d'une stimulation de la production et de l'élongation des poils absorbants racinaires en réponse à des hormones produites et sécrétées par les bactéries. La méthodologie de phénotypage de l'architecture racinaire et du développement des zones pilifères, que nous avons présenté dans la chapitre IV, va donc nous permettre d'analyser les éventuels effets des bactéries sélectionnées sur le développement racinaire.

Le système de rhizobox, développé par Ron et optimisé par Ikram, nous permettra d'étudier de façon séparée ou conjointe les effets de carences minérales et de la présence de souches bactériennes sur l'architecture racinaire et le développement des poils racinaires. Ce travail impliquera la combinaison de milieux pauvres en N et/ou P et/ou K en présence ou non de bactéries ou communautés bactériennes synthétiques. Nous souhaiterons tester dans ces conditions les représentants des différentes sous-espèces (*dicoccoides*, *dicoccum* et *durum*) de blé qui auront été sélectionnées dans les approches conduites en parallèle (Cf. aussi § 2.2 ci-dessous). La présence potentielle de signaux systémiques participant aux réponses racinaires pourra être testée en adaptant le système actuel des rhizobox pour réaliser des expériences de type « split root ». Des paramètres importants comme la longueur totale des racines, la répartition spatiale de celles-ci dans les différents horizons (0-10 cm, 10-30 cm..), la densité et la longueur des poils absorbants seront analysés à l'aide du logiciel WinRhizo et d'autres logiciels comme ACRT développé en partenariat avec Volker Becker (CNRS, Montpellier RIO Imaging) à partir du logiciel ImageJ.

2.3. Communication chimique entre racines et micro-organismes: récolte et analyse des exsudats

De nombreux systèmes de récolte des exsudats ont été testés, tous montrant des limitations et suscitant des insatisfactions, en termes de signification physiologique des conditions de culture des plantes et/ou de possibilité d'utiliser les dispositifs correspondants, relativement complexes, pour des analyses comparatives (de cultivars/accessions de plante, d'espèces microbiennes ou de nutrition minérale à relativement large échelle. Cela a conduit récemment des auteurs à publier un article dont le titre est « *Sampling root exudate : mission impossible ?* » (Oberger et Jones, 2018). L'hydroponie est critiquée pour son environnement artificiel potentiellement anoxique et loin des conditions réelles de sol. L'aéroponie utilise des volumes conséquents de milieu. La culture sur sol est elle aussi critiquée parce qu'elle engendre des difficultés au moment où les systèmes racinaires doivent être extraits du substrat sans endommager les racines/poils racinaires, de tels dommages induisant nécessairement des pertes et relargages de composés organiques sans relation simple avec la fonction d'exsudation racinaire. De plus, les méthodes publiées utilisent généralement des conditions non axéniques, en présence donc de populations microbiennes non identifiées, ce qui est susceptible de rendre difficile l'interprétation de l'analyse métabolomique. En effet, les microbes présents sont susceptibles, de façon variable et incontrôlable, d'exsuder leurs propres métabolites ainsi que de dégrader les exsudats racinaires de façon complète ou en provoquant l'apparition de produits de dégradation intermédiaires

Nous avons considéré que la mise au point d'un protocole permettant d'avoir accès à l'exsudation en condition axénique était un objectif essentiel, puisque nous voulons étudier l'effet individuel de souches microbiennes sur l'exsudation du blé et, inversement, l'effet des

exsudats de blé sur le développement de ces souches. Ensuite le choix de l'hydroponie s'est imposé parce que cette technique facilite la récolte des exsudats racinaires et surtout préserve l'intégrité de la partie racinaire lors de la récolte, minimisant donc les blessures cellulaires ou tissulaires pouvant générer des relargages dans le milieu de métabolites cellulaires non exsudés.

Le système de culture du blé pour la récolte des exsudats a évolué entre la thèse de Ron et celle d'Houssein. La simplification du système actuel permet de réduire les risques de contamination et, par sa relative simplicité, permet d'envisager d'étudier des ensembles assez larges de conditions, en termes de nombres d'accession/cultivars de blé, souches bactériennes et conditions nutritives. Le système est constitué d'un tube à essai pour réduire le volume de milieu et la plante est insérée au niveau du collet à l'aide d'un coton. La partie aérienne se développe à l'air. Après le temps de croissance choisi dans la cinétique, le milieu de culture est prélevé et une aliquote est utilisée pour en tester la stérilité par étalement sur milieu LB. Le tube à essai est couvert d'aluminium pour maintenir les racines à l'obscurité. Les premières analyses métabolomiques réalisées sur la plateforme MétaToul de Toulouse semblent conforter notre choix avec une liste de molécules rares et ciblées du métabolome cellulaire général et des molécules validées dans différents modèles comme étant exsudées, en particulier les benzoxazinoïdes comme le DIMBOA-Glc, ou des acides organiques comme l'acide azélaïque, l'acide hexanoïque (éliciteur), l'acide valérénique, l'acide sébacique...

Les exsudats sont composés de métabolites différents chimiquement avec des sucres, des acides aminés, des acides organiques, des peptides et protéines ou encore des métabolites secondaires. L'approche qui sera mise en place vise à séparer les métabolites ayant des caractéristiques physico-chimiques remarquables. Protéines et peptides seront analysés séparément des autres métabolites qui eux, seront séparés suivant leur polarité. Des approches ciblées seront aussi mises en place sur des molécules très peu abondantes comme les strigolactones et autres phytohormones. Les analyses seront réalisées sur les plateformes MetaToul pour la métabolomique et sur la plateforme MSPP de Montpellier pour les protéines et peptides.

A ce jour, les exsudats de différents blés (2 dicoccoides, 2 *dicoccum* et 2 *durum*) ont été récoltés, après 7 et 14 jours de culture, avec 6 répétitions pour chaque temps. Ce travail sera poursuivi pour augmenter le nombre d'accessions, en particulier au sein de *dicoccoides*, puisque la diversité biologique au sein de cette sous-espèce est considérable par rapport à celle qui existe au sein de *durum*.

Les exsudats de souches bactériennes sélectionnées seront eux aussi analysés (ainsi que, si possible, les exsudats de champignons mycorhiziens dans le cadre de nos collaborations). Nous testerons ensuite les exsudats de plantes sur les bactéries et en parallèle les exsudats bactériens sur les plantes afin de déterminer les composés spécifiques induits par la présence des exsudats. Des bactéries « naïves » ou ayant été au préalable en contact avec des exsudats de plantes seront mises en présence des racines et les exsudats seront de nouveau analysés. Ces expériences seront conduites de façon à évaluer quelques souches bactériennes, les plus prometteuses, qui seront mises en contact avec des blés présentant des comportements contrastés vis-à-vis de ces bactéries. A ce stade, le nombre et l'identité de souches bactériennes et accessions/cultivars de blé qui seront testés dans ces expériences ne peuvent être précisés.

2.4. Vers l'analyse des mécanismes de signalisation et communication

Après avoir identifié au sein des exsudats des composés susceptibles de participer au processus de communication chimiques entre le système racinaire et le microbiote, nous souhaiterons préciser les mécanismes de signalisation sous-jacents. Dans une première étape, les composés candidats pourront être testés dans mon équipe, sur la plateforme d'électrophysiologie de notre UMR, pour leur rôle possible d'induction d'une signalisation électrique au niveau des cellules périphériques de la racine (poils absorbants, cellules épidermiques) de blés, par des mesures de potentiel électrique transmembranaire à l'aide d'une électrode intracellulaire (Felle et al., 1995). Une analyse plus poussée pourra être effectuée avec les exsudats/composés ayant engendré une réponse électrique : examen de possible signalisation calcique par imagerie à l'aide de sondes, ou identification des canaux ioniques impliqués dans la signalisation électrique par patch-clamp sur protoplastes de cellules épidermiques/poils absorbants. Certains exsudats comme l'acide hexadécanoïque, l'acide azélaïque, l'acide caféïque, la betaïne ou encore le DIMBOA sont actuellement disponibles commercialement, ce qui pourra faciliter les analyses. D'autre part, sachant que certains composés comme l'acide azélaïque sont impliqués dans la résistance systémique acquise (SAR), des tests préliminaires sont envisageables rapidement. Le déclenchement d'une réponse électrique ou d'oscillations calciques sera un argument supplémentaire pour réaliser une analyse transcriptomique (RNA seq) sur les parties racinaires et aériennes. Ce type d'analyse pourra être aussi envisagé si un signal systémique est mise en évidence dans les expériences de « split root ».

2.5. Conclusion et perspectives

En aval des travaux évoqués ci-dessus, il sera évidemment nécessaire d'examiner si les effets bénéfiques des microorganismes observés dans nos conditions expérimentales en termes de développement du système racinaire, de contenus ioniques et de production de biomasse dans des conditions de faible disponibilité des ions nutritifs dans le milieu se traduisent aussi par des rendements en grains au champ quantitativement et qualitativement satisfaisants dans des conditions de culture à bas intrants.

Nous avons émis l'hypothèse que les bouleversements engendrés par l'avènement de l'agriculture, les migrations humaines et la *Révolution Verte* ont pu affaiblir ou rendre moins efficaces les relations du blé avec son environnement, en particulier ses relations avec le microbiote racinaire. En étudiant, ce microbiote dans la rhizosphère des populations reliques de blés sauvages du *Croissant Fertile* et en comparant les performances de blés dans ce contexte avec des blés modernes, nous cherchons à mettre en évidence les mécanismes d'optimisation de la relation blé-microbiote en espérant par la suite être en mesure de transférer chez les blés modernes (et/ou les microbiotes exotiques), des capacités d'interactions bénéfiques précédemment perdues ou dégradées au cours de la *Révolution Verte*. Dans cette perspective, il est raisonnable d'espérer que les connaissances produites et les méthodologies développées au cours de ce projet pourront aider au développement de programmes de génétique quantitative permettant d'identifier des gènes utilisables dans des programmes d'amélioration pour développer de nouveaux cultivars de blés présentant une dépendance réduite vis-à-vis des engrais et des intrants agricoles de façon générale.

Références Bibliographiques

- Adam, Z. (2013). Emerging roles for diverse intramembrane proteases in plant biology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1828(12), 2933-2936.
- Adam, Z. (2015). Plastid intramembrane proteolysis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1847(9), 910-914.
- Ahrazem, O., Rubio-Moraga, A., Berman, J., Capell, T., Christou, P., Zhu, C., & Gómez-Gómez, L. (2016). The carotenoid cleavage dioxygenase CCD 2 catalysing the synthesis of crocetin in spring crocuses and saffron is a plastidial enzyme. *New Phytologist*, 209(2), 650-663.
- Allen, K. D., Duysen, M. E., & Staehelin, L. A. (1988). Biogenesis of thylakoid membranes is controlled by light intensity in the conditional chlorophyll b-deficient CD3 mutant of wheat. *The Journal of cell biology*, 107(3), 907-919.
- Andersson, F. I., Tryggvesson, A., Sharon, M., Diemand, A. V., Classen, M., Best, C., ... & Robinson, C. V. (2009). Structure and function of a novel type of ATP-dependent Clp protease. *Journal of Biological Chemistry*, 284(20), 13519-13532.
- Apel W, Schulze WX, Bock R. 2010. Identification of protein stability determinants in chloroplasts. *Plant J*.63:636–5
- Apitz, J., Nishimura, K., Schmied, J., Wolf, A., Hedtke, B., van Wijk, K.J., and Grimm, B. (2016). Posttranslational control of ALA synthesis includes GluTR degradation by Clp protease and stabilization by GluTR-binding protein. *Plant Physiol*. 170:2040–2051
- Arnaud, N., Murgia, I., Boucherez, J., Briat, J. F., Cellier, F., & Gaymard, F. (2006). An iron-induced nitric oxide burst precedes ubiquitin-dependent protein degradation for *Arabidopsis* AtFer1 ferritin gene expression. *Journal of Biological Chemistry*, 281(33), 23579-23588.
- Arnoux P, Morosinotto T, Saga G, Bassi R, Pignol D. 2009. A structural basis for the pH-dependent xanthophyll cycle in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 21:2036–44
- Atyame Nten, C. M., Sommerer, N., Rofidal, V., Hirtz, C., Rossignol, M., Cuny, G., ... & Geiger, A. (2010). Excreted/secreted proteins from trypanosome procyclic strains. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010.
- Avni, R., Nave, M., Barad, O., Baruch, K., Twardziok, S. O., Gundlach, H., ... & Jordan, K. W. (2017). Wild emmer genome architecture and diversity elucidate wheat evolution and domestication. *Science*, 357(6346), 93-97.
- Badri, D. V., & Vivanco, J. M. (2009). Regulation and function of root exudates. *Plant, cell & environment*, 32(6), 666-681.
- Baetz, U., & Martinoia, E. (2014). Root exudates: the hidden part of plant defense. *Trends in Plant Science*, 19(2), 90-98.
- Bai, M., Zhao, X., Sahara, K., Ohte, Y., Hirano, Y., Kaneko, T., et al. (2014). Assembly mechanisms of specialized core particles of the proteasome. *Biomolecules* 4, 662–677.

- Bailey, J. E. (1963). Electron microscope observations on the precipitation of zirconium hydride in zirconium. *Acta metallurgica*, 11(4), 267-280.
- Bartoli, C., Boivin, S., Marchetti, M., Gris, C., Gascioli, V., Gaston, M., ... & Lepetit, M. (2020). *Rhizobium leguminosarum* symbiovar *viciae* strains are natural wheat endophytes and can stimulate root development and colonization by arbuscular mycorrhizal fungi.
- Behl, R. K., Sharma, H., Kumar, V., & Narula, N. (2003). Interactions amongst mycorrhiza, *Azotobacter chroococcum* and root characteristics of wheat varieties. *Journal of agronomy and crop science*, 189(3), 151-155.
- Bez, C., Javvadi, S. G., Bertani, I., Devescovi, G., Guarnaccia, C., Studholme, D. J., ... & Venturi, V. (2020). AzeR, a transcriptional regulator that responds to azelaic acid in *Pseudomonas nitroreducens*. *Microbiology*, 166(1), 73-84.
- Bhuiyan NH, Friso G, Rowland E, Majsec K, van Wijk KJ. 2016. The plastoglobule-localized metallopeptidase PGM48 is a positive regulator of senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 28:3020–37
- Boca S, Koestler F, Ksas B, Chevalier A, Leymarie J, et al. 2014. *Arabidopsis* lipocalins AtCHL and AtTIL have distinct but overlapping functions essential for lipid protection and seed longevity. *Plant Cell Environ.* 37:368–81
- Boland, C., Li, D., Shah, S.T., Haberstock, S., Dotsch, V., Bernhard, F., and Caffrey, M. (2014). Cell-free expression and in meso crystallisation of an integral membrane kinase for structure determination. *Cell Mol Life Sci* 24 : 4895-4910.
- Bréhélin, C., Kessler, F., & van Wijk, K. J. (2007). Plastoglobules: versatile lipoprotein particles in plastids. *Trends in plant science*, 12(6), 260-266.
- Bréhélin, C., & Nacir, H. (2013). When proteomics reveals unsuspected roles: the plastoglobule example. *Frontiers in plant science*, 4, 114.
- Brillouet, J. M., Romieu, C., Schoefs, B., Solymosi, K., Cheynier, V., Fulcrand, H., ... & Conéjéro, G. (2013). The tannosome is an organelle forming condensed tannins in the chlorophyllous organs of Tracheophyta. *Annals of Botany*, 112(6), 1003-1014
- Brillouet, J. M., Verdeil, J. L., Odoux, E., Lartaud, M., Grisoni, M., & Conéjéro, G. (2014). Phenol homeostasis is ensured in vanilla fruit by storage under solid form in a new chloroplast-derived organelle, the phenyloplast. *Journal of experimental botany*, 65(9), 2427-2435.
- Brinker, P., Fontaine, M. C., Beukeboom, L. W., & Salles, J. F. (2019). Host, symbionts, and the microbiome: the missing tripartite interaction. *Trends in microbiology*, 27(6), 480-488.
- Brouquisse, R. (2019). Multifaceted roles of nitric oxide in plants.
- Bugos RC, Hieber AD, Yamamoto HY. 1998. Xanthophyll cycle enzymes are members of the lipocalin family, the first identified from plants. *J. Biol. Chem.* 273:15321–24
- Bulgarelli, D., Schlaeppi K., Spaepen S., van Themaat E. V. L. and P. Schulze-Lefert (2013) Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 64: 807-838

- Caffrey, M. (2015). A comprehensive review of the lipid cubic phase or in meso method for crystallizing membrane and soluble proteins and complexes. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun* 71: 3–18.
- Cecchini, N. M., Roychoudhry, S., Speed, D. J., Steffes, K., Tambe, A., Zodrow, K., ... & Greenberg, J. T. (2019). Underground Azelaic Acid–Conferred Resistance to *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 32(1), 86-94.
- Charron JB, Ouellet F, Pelletier M, Danyluk J, Chauve C, Sarhan F. 2005. Identification, expression, and evolutionary analyses of plant lipocalins. *Plant Physiol.* 139:2017–28
- Chen, Y-H, Hu L, Punta M, Bruni R, Hillerich B, Kloss B, Rost B, Love J, Siegelbaum S A & Hendrickson W A. (2010). Homologue structure of the SLAC1 anion channel for closing stomata in leaves. *Nature* 467 : 1074-1080. doi:10.1038/nature09487
- Chen, G., & Zhang, X. (2010). New insights into S2P signaling cascades: regulation, variation, and conservation. *Protein Science*, 19(11), 2015-2030.
- Clarke, A. K. (2012). The chloroplast ATP-dependent Clp protease in vascular plants—new dimensions and future challenges. *Physiologia plantarum*, 145(1), 235-244.
- Clarke, A. K., Schelin, J., & Porankiewicz, J. (1998). Inactivation of the clpP1 gene for the proteolytic subunit of the ATP-dependent Clp protease in the cyanobacterium *Synechococcus limits growth and light acclimation*. *Plant molecular biology*, 37(5), 791-801.
- Clarkson D. T. (1985) Factors affecting mineral nutrient acquisition by plants. *Annu Rev Plant Physiol* 36: 77-115.
- Colombo, C. V., Ceccarelli, E. A., & Rosano, G. L. (2014). Characterization of the accessory protein ClpT1 from *Arabidopsis thaliana*: oligomerization status and interaction with Hsp100 chaperones. *BMC plant biology*, 14(1), 1-10.
- Connorton, J. M., Balk, J., & Rodríguez-Celma, J. (2017). Iron homeostasis in plants—a brief overview. *Metallomics*, 9(7), 813-823.
- Cotton, T. A., Pétriacq, P., Cameron, D. D., Al Meselmani, M., Schwarzenbacher, R., Rolfe, S. A., & Ton, J. (2019). Metabolic regulation of the maize rhizobiome by benzoxazinoids. *The ISME journal*, 13(7), 1647-1658.
- Cunningham FX Jr., Tice AB, Pham C, Gantt E. 2010. Inactivation of genes encoding plastoglobulinlike proteins in *Synechocystis* sp. PCC 6803 leads to a light-sensitive phenotype. *J. Bacteriol.* 192:1700–9
- Czarnota, M. A., Paul, R. N., Dayan, F. E., Nimbai, C. I., & Weston, L. A. (2001). Mode of action, localization of production, chemical nature, and activity of sorgoleone: a potent PSII inhibitor in *Sorghum* spp. root exudates. *Weed Technology*, 15(4), 813-825.
- Czarnota, M. A., Paul, R. N., Weston, L. A., & Duke, S. O. (2003). Anatomy of sorgoleone-secreting root hairs of *Sorghum* species. *International Journal of Plant Sciences*, 164(6), 861-866.

- Damiani, I. et al. (2016). Nod Factor Effects on Root Hair-Specific Transcriptome of *Medicago truncatula*: Focus on Plasma Membrane Transport Systems and Reactive Oxygen Species Networks. *Front. Plant Sci.* 7: 3389.
- David, J., Holtz, Y., Ranwez, V., Santoni, S., Sarah, G., Ardisson, M., ... & Tavaud-Pirra, M. (2014). Genotyping by sequencing transcriptomes in an evolutionary pre-breeding durum wheat population. *Molecular breeding*, 34(4), 1531-1548.
- Dayan, F. E., Rimando, A. M., Pan, Z., Baerson, S. R., Gimsing, A. L., & Duke, S. O. (2010). *Sorgoleone*. *Phytochemistry*, 71(10), 1032-1039.
- Deruere J, Römer S, d'Harlingue A, Backhaus RA, Kuntz M, Camara B. 1994. Fibril assembly and carotenoid overaccumulation in chromoplasts: a model for supramolecular lipoprotein structures. *Plant Cell* 6:119–33
- Diekmann, W., Venis, M. A., & Robinson, D. G. (1995). Auxins induce clustering of the auxin-binding protein at the surface of maize coleoptile protoplasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(8), 3425-3429.
- Dong, H., Fei, G. L., Wu, C. Y., Wu, F. Q., Sun, Y. Y., Chen, M. J., ... & Jiang, L. (2013). A rice virescent-yellow leaf mutant reveals new insights into the role and assembly of plastid caseinolytic protease in higher plants. *Plant Physiology*, 162(4), 1867-1880.
- Dougan, D. A., Micevski, D., & Truscott, K. N. (2012). The N-end rule pathway: from recognition by N-recognins, to destruction by AAA+ proteases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1823(1), 83-91.
- Dougan, D. A., Reid, B. G., Horwich, A. L., & Bukau, B. (2002). ClpS, a substrate modulator of the ClpAP machine. *Molecular cell*, 9(3), 673-683.
- el Zahar Haichar, F., Heulin, T., Guyonnet, J. P., & Achouak, W. (2016). Stable isotope probing of carbon flow in the plant holobiont. *Current opinion in biotechnology*, 41: 9-13.
- Erbse, A., Schmidt, R., Bornemann, T., Schneider-Mergener, J., Mogk, A., Zahn, R., ... & Bukau, B. (2006). ClpS is an essential component of the N-end rule pathway in *Escherichia coli*. *Nature*, 439(7077), 753-756.
- Eymery F, Rey P. 1999. Immunocytolocalization of CDSP32 and CDSP34, two chloroplastic droughtinduced stress proteins in *Solanum tuberosum* plants. *Plant Physiol. Biochem.* 37:305–12
- Fares, A., Nespoulous, C., Rossignol, M., & Peltier, J. B. (2014). Simultaneous identification and quantification of nitrosylation sites by combination of biotin switch and ICAT labeling. In *Plant Proteomics* (pp. 609-620). Humana Press, Totowa, NJ.
- Fares, A., Rossignol, M., & Peltier, J. B. (2011). Proteomics investigation of endogenous S-nitrosylation in *Arabidopsis*. *Biochemical and biophysical research communications*, 416(3-4), 331-336.
- Felle, H. H., Kondorosi, É., Kondorosi, Á., & Schultze, M. (1995). Nod signal-induced plasma membrane potential changes in alfalfa root hairs are differentially sensitive to structural modifications of the lipochitooligosaccharide. *The Plant Journal*, 7(6), 939-947.

- Flores-Perez, U´., Bedard, J., Tanabe, N., Lympelopoulou, P., Clarke, A.K., and Jarvis, P. (2016). Functional analysis of the Hsp93/ClpC chaperone at the chloroplast envelope. *Plant Physiol.* 170:147–162
- Fogeron, M. L., Badillo, A., Jirasko, V., Gouttenoire, J., Paul, D., Lancien, L., ... & Böckmann, A. (2015). Wheat germ cell-free expression: two detergents with a low critical micelle concentration allow for production of soluble HCV membrane proteins. *Protein expression and purification*, 105, 39-46.
- Fogeron, M.L., Badillo, A., Penin, F., and Böckmann, A. (2017). Wheat Germ Cell-Free Overexpression for the Production of Membrane Proteins. *Methods Mol Biol* 1635: 91–108.
- Friso, G., Giacomelli, L., Ytterberg, A. J., Peltier, J. B., Rudella, A., Sun, Q., & Van Wijk, K. J. (2004). In-depth analysis of the thylakoid membrane proteome of *Arabidopsis thaliana* chloroplasts: new proteins, new functions, and a plastid proteome database. *The Plant Cell*, 16(2), 478-499.
- Gao, M., Qu, H., Gao, L., Chen, L., Sebastian, R. S. J., & Zhao, L. (2015). Dissecting the mechanism of *Solanum lycopersicum* and *Solanum chilense* flower colour formation. *Plant Biology*, 17(1), 1-8.
- Geiger, A., Hirtz, C., Bécue, T., Bellard, E., Centeno, D., Gargani, D., ... & Peltier, J. B. (2010). Exocytosis and protein secretion in *Trypanosoma*. *BMC microbiology*, 10(1), 20.
- Geiger, D., Scherzer, S., Mumm, P., Stange, A., Marten, I., Bauer, H., ... & Romeis, T. (2009). Activity of guard cell anion channel SLAC1 is controlled by drought-stress signaling kinase-phosphatase pair. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(50), 21425-21430.
- Geiger, A., Simo, G., Grébaud, P., Peltier, J. B., Cuny, G., & Holzmüller, P. (2011). Transcriptomics and proteomics in human African trypanosomiasis: current status and perspectives. *Journal of proteomics*, 74(9), 1625-1643.
- Giglione, C., & Meinel, T. (2001). Organellar peptide deformylases: universality of the N-terminal methionine cleavage mechanism. *Trends in plant science*, 6(12), 566-572.
- Gómez-Gómez, L., Parra-Vega, V., Rivas-Sendra, A., Seguí-Simarro, J. M., Molina, R. V., Pallotti, C., ... & Ahrazem, O. (2017). Unraveling massive crocins transport and accumulation through proteome and microscopy tools during the development of saffron stigma. *International journal of molecular sciences*, 18(1), 76.
- Gueneau de Novoa, P., & Williams, K. P. (2004). The tmRNA website: reductive evolution of tmRNA in plastids and other endosymbionts. *Nucleic Acids Research*, 32(suppl_1), D104-D108.
- Hallin EI, HasanM, Guo K, Akerlund HE. 2016. Molecular studies on structural changes and oligomerisation of violaxanthin de-epoxidase associated with the pH-dependent activation. *Photosynth. Res.* 129:29–41
- Hamamoto, S., Horie, T., Hauser, F., Deinlein, U., Schroeder, J.I., and Uozumi, N. (2015). HKT transporters mediate salt stress resistance in plants: from structure and function to the field. *Curr Opin Biotechnol* 32: 113–120.

- Harbers, M. (2014). Wheat Germ Systems for Cell-Free Protein Expression. *FEBS Lett* 588: 2762–2773.
- Hansmann, P., & Sitte, P. (1982). Composition and molecular structure of chromoplast globules of *Viola tricolor*. *Plant cell reports*, 1(3), 111-114.
- Hauser, F., and Horie, T. (2010). A conserved primary salt tolerance mechanism mediated by HKT transporters: a mechanism for sodium exclusion and maintenance of high K⁺/Na⁺ ratio in leaves during salinity stress. *Plant Cell Environ* 33: 552–565.
- Hirano, Y., Kaneko, T., Okamoto, K., Bai, M., Yashiroda, H., Furuyama, K., et al. (2008). Dissecting the b-ring assembly pathway of the mammalian 20S proteasome. *EMBO J.* 27, 2204–2213.
- Horie, T., Yoshida, K., Nakayama, H., Yamada, K., Oiki, S., and Shinmyo, A. (2001). Two types of HKT transporters with different properties of Na⁺ and K⁺ transport in *Oryza sativa*. *Plant J* 27: 129–138.
- Huang, P.K., Chan, P.T., Su, P.H., Chen, L.J., and Li, H.M. (2016). Chloroplast Hsp93 directly binds to transit peptides at an early stage of the preprotein import process. *Plant Physiol.* 170:857–866
- Huang, S., Spielmeyer, W., Lagudah, E.S., James, R.A., Platten, J.D., Dennis, E.S., and Munns, R. (2006). A sodium transporter (HKT7) is a candidate for Nax1, a gene for salt tolerance in durum wheat. *Plant Physiol* 142: 1718–1727.
- Humbard, M. A., Surkov, S., De Donatis, G. M., Jenkins, L. M., & Maurizi, M. R. (2013). The N-degradome of *Escherichia coli* LIMITED PROTEOLYSIS IN VIVO GENERATES A LARGE POOL OF PROTEINS BEARING N-DEGRONS. *Journal of Biological Chemistry*, 288(40), 28913-28924.
- Isayenkov, S.V., and Maathuis, F.J.M. (2019) Plant Salinity Stress: Many Unanswered Questions Remain. *Front Plant Sci* 10: 80.
- Ismail, A.M., and Horie, T. (2017) Genomics, Physiology, and Molecular Breeding Approaches for Improving Salt Tolerance. *Annu Rev Plant Biol* 68: 405–434.
- Jarvis, P., & López-Juez, E. (2013). Biogenesis and homeostasis of chloroplasts and other plastids. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(12), 787-802.
- Joseph, M., Ludevid, M. D., Torrent, M., Rofidal, V., Tauzin, M., Rossignol, M., & Peltier, J. B. (2012). Proteomic characterisation of endoplasmic reticulum-derived protein bodies in tobacco leaves. *BMC plant biology*, 12(1), 36.
- Joshi, C.P., Zhou, H., Huang, X., and Chiang, V.L. (1997) Context sequences of translation initiation codon in plants. *Plant Mol Biol* 35: 993–1001.
- Jung, H. W., Tschaplinski, T. J., Wang, L., Glazebrook, J., & Greenberg, J. T. (2009). Priming in systemic plant immunity. *Science*, 324(5923), 89-91.
- Junge, F., Haberstock, S., Roos, C., Stefer, S., Proverbio, D., Dotsch, V., and Bernhard, F. (2011) Advances in cell-free protein synthesis for the functional and structural analysis of membrane proteins. *N Biotechnol* 28: 262–271.

- Kang, J., Park, J., Choi, H., Burla, B., Kretschmar, T., Lee, Y., & Martinoia, E. (2011). Plant ABC transporters. *The Arabidopsis book/American Society of Plant Biologists*, 9.
- Kato, Y., and Sakamoto, W. (2014). Phosphorylation of photosystem II core proteins prevents undesirable cleavage of D1 and contributes to the fine-tuned repair of photosystem II. *Plant J.* 79:312–321
- Keiler, K. C., Waller, P. R., & Sauer, R. T. (1996). Role of a peptide tagging system in degradation of proteins synthesized from damaged messenger RNA. *Science*, 271(5251), 990-993.
- Kilambi, H. V., Kumar, R., Sharma, R., & Sreelakshmi, Y. (2013). Chromoplast-specific carotenoid-associated protein appears to be important for enhanced accumulation of carotenoids in hp1 tomato fruits. *Plant Physiology*, 161(4), 2085-2101.
- Kim, J., Kimber, M. S., Nishimura, K., Friso, G., Schultz, L., Ponnala, L., & van Wijk, K. J. (2015a). Structures, functions, and interactions of ClpT1 and ClpT2 in the Clp protease system of Arabidopsis chloroplasts. *The Plant Cell*, 27(5), 1477-1496.
- Kim, J., Olinares, P. D., Oh, S. H., Ghisaura, S., Poliakov, A., Ponnala, L., & van Wijk, K. J. (2013). Modified Clp protease complex in the ClpP3 null mutant and consequences for chloroplast development and function in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 162(1), 157-179.
- Kim, J., Rudella, A., Rodriguez, V. R., Zybailov, B., Olinares, P. D. B., & van Wijk, K. J. (2009). Subunits of the plastid ClpPR protease complex have differential contributions to embryogenesis, plastid biogenesis, and plant development in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 21(6), 1669-1692.
- Kim HU, Wu SS, Ratnayake C, Huang AH. 2001. Brassica rapa has three genes that encode proteins associated with different neutral lipids in plastids of specific tissues. *Plant Physiol.* 126:330–41
- Kmiec, B., Teixeira, P. F., & Glaser, E. (2014). Shredding the signal: targeting peptide degradation in mitochondria and chloroplasts. *Trends in plant science*, 19(12), 771-778.
- Kmiec, B., Teixeira, P. F., Murcha, M. W., & Glaser, E. (2016). Divergent evolution of the M3A family of metallopeptidases in plants. *Physiologia plantarum*, 157(3), 380-388.
- Kong, C. H., Zhang, S. Z., Li, Y. H., Xia, Z. C., Yang, X. F., Meiners, S. J., & Wang, P. (2018). Plant neighbor detection and allelochemical response are driven by root-secreted signaling chemicals. *Nature communications*, 9(1), 1-9.
- Korenblum, E., Dong, Y., Szymanski, J., Panda, S., Jozwiak, A., Massalha, H., ... & Aharoni, A. (2020). Rhizosphere microbiome mediates systemic root metabolite exudation by root-to-root signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(7), 3874-3883.
- Kovacheva, S., Bédard, J., Wardle, A., Patel, R., & Jarvis, P. (2007). Further in vivo studies on the role of the molecular chaperone, Hsp93, in plastid protein import. *The Plant Journal*, 50(2), 364-379.
- Kress, W., Maglica, Ž., & Weber-Ban, E. (2009). Clp chaperone–proteases: structure and function. *Research in microbiology*, 160(9), 618-628.

- Kuroda, H., & Maliga, P. (2003). The plastid clpP1 protease gene is essential for plant development. *Nature*, 425(6953), 86-89.
- Laizet Y, Pontier D, March R, Kuntz M. 2004. Subfamily organization and phylogenetic origin of genes encoding plastid-lipid-associated proteins of the fibrillin type. *J. Genome Sci. Technol.* 3:19–28
- Langenkämper G, Manac'h N, Broin M, Cuin'e S, Becuwe N, et al. 2001. Accumulation of plastid lipid-associated proteins (fibrillin/CDSP34) upon oxidative stress, ageing and biotic stress in Solanaceae and in response to drought in other species. *J. Exp. Bot.* 52:1545–54
- Leborgne-Castel, N., & Bouhidel, K. (2014). Plasma membrane protein trafficking in plant–microbe interactions: a plant cell point of view. *Frontiers in plant science*, 5, 735.
- Leitner-Dagan Y, Ovadis M, Shklarman E, Elad Y, Rav David D, Vainstein A. 2006. Expression and functional analyses of the plastid lipid-associated protein CHRC suggest its role in chromoplastogenesis and stress. *Plant Physiol.* 142:233–44
- Levesque-Tremblay G, Havaux M, Ouellet F. 2009. The chloroplastic lipocalin AtCHL prevents lipid peroxidation and protects Arabidopsis against oxidative stress. *Plant J.* 60:691–702
- Leyon, H. (1954). The structure of chloroplasts: III. A study of pyrenoids. *Experimental Cell Research*, 6(2), 497-505.
- Li LY, Feng CX, Zhang YD (2019) Influence of collection time on the determination of root exudates in *Fraxinus mandshurica* by the metabolomics method. *Appl Ecol Environ Res* 17: 9529–9545
- Li, X., Li, Y., Arendt, C. S., and Hochstrasser, M. (2016). Distinct elements in the proteasomal b5 subunit propeptide required for autocatalytic processing and proteasome assembly. *J. Biol. Chem.* 291, 1991–2003.
- Lim, G. H., Shine, M. B., de Lorenzo, L., Yu, K., Cui, W., Navarre, D., ... & Kachroo, P. (2016). Plasmodesmata localizing proteins regulate transport and signaling during systemic acquired immunity in plants. *Cell host & microbe*, 19(4), 541-549.
- Lohscheider JN, Friso G, van Wijk KJ. 2016. Phosphorylation of plastoglobular proteins in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* 67:3975–84
- López-Bucio, J., Cruz-Ramírez, A., & Herrera-Estrella, L. (2003). The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Current opinion in plant biology*, 6(3), 280-287.
- Lu, C. H., Liu, X. G., Xu, J., Dong, F. S., Zhang, C. P., Tian, Y. Y., & Zheng, Y. Q. (2012). Enhanced exudation of DIMBOA and MBOA by wheat seedlings alone and in proximity to wild oat (*Avena fatua*) and flixweed (*Descurainia sophia*). *Weed science*, 60(3), 360-365.
- Luo, Q., Sun, L. N., & Hu, X. M. (2015) Metabonomics study on root exudates of cadmium hyperaccumulator *Sedum alfredii*. *Chin J Anal Chem* 43: 7-12
- Lundberg, D. S., & Teixeira, P. J. (2018). Root-exuded coumarin shapes the root microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(22), 5629-5631.

- Lundquist PK, Poliakov A, Bhuiyan NH, Zybailov B, Sun Q, vanWijk KJ. 2012. The functional network of the *Arabidopsis thaliana* plastoglobule proteome based on quantitative proteomics and genome-wide co-expression analysis. *Plant Physiol.* 58:1172–92
- Maccaferri, M., Harris, N. S., Twardziok, S. O., Pasam, R. K., Gundlach, H., Spannagl, M., ... & Himmelbach, A. (2019). Durum wheat genome highlights past domestication signatures and future improvement targets. *Nature genetics*, 51(5), 885-895.
- Makino, S., Beebe, E.T., Markley, J.L., and Fox, B.G. (2014) Cell-free protein synthesis for functional and structural studies. *Methods Mol Biol* 1091: 161–178
- Malamy, J. E. (2005). Intrinsic and environmental response pathways that regulate root system architecture. *Plant, cell & environment*, 28(1), 67-77.
- Martinis, J., Glauser, G., Valimareanu, S., Stettler, M., Zeeman, S. C., Yamamoto, H., ... & Kessler, F. (2014). ABC 1 K 1/PGR 6 kinase: a regulatory link between photosynthetic activity and chloroplast metabolism. *The Plant Journal*, 77(2), 269-283.
- Mian, A., Oomen, R.J., Isayenkov, S., Sentenac, H., Maathuis, F.J., and Very, A.A. (2011) Over-expression of an Na⁺-and K⁺-permeable HKT transporter in barley improves salt tolerance. *Plant J* 68: 468–479
- Mikić, S., & Ahmad, S. (2018). Benzoxazinoids-protective secondary metabolites in cereals: biochemistry and genetic control. *Ratarstvo i povrtarstvo*, 55(1), 39-48.
- Munns, R., and Tester, M. (2008) Mechanisms of salinity tolerance. *Annu Rev Plant Biol* 59: 651–681
- Nakagawara, E., Sakuraba, Y., Yamasato, A., Tanaka, R., and Tanaka, A. (2007). Clp protease controls chlorophyll b synthesis by regulating the level of chlorophyllide a oxygenase. *Plant J.* 49:800–809.
- Nath, K., Jajoo, A., Poudyal, R.S., Timilsina, R., Park, Y.S., Aro, E.M., Nam, H.G., and Lee, C.H. (2013). Towards a critical understanding of the photosystem II repair mechanism and its regulation during stress conditions. *FEBS Lett.* 587:3372–3381.
- Neal, A. L., Ahmad, S., Gordon-Weeks, R., & Ton, J. (2012). Benzoxazinoids in root exudates of maize attract *Pseudomonas putida* to the rhizosphere. *PloS one*, 7(4), e35498.
- Nilsson, R., Brunner, J., Hoffman, N. E., & van Wijk, K. J. (1999). Interactions of ribosome nascent chain complexes of the chloroplast-encoded D1 thylakoid membrane protein with cpSRP54. *The EMBO Journal*, 18(3), 733-742.
- Nishimura, K., Asakura, Y., Friso, G., Kim, J., Oh, S. H., Rutschow, H., ... & van Wijk, K. J. (2013). ClpS1 is a conserved substrate selector for the chloroplast Clp protease system in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 25(6), 2276-2301.
- Nishimura, K., Kato, Y., & Sakamoto, W. (2016). Chloroplast proteases: updates on proteolysis within and across suborganellar compartments. *Plant Physiology*, 171(4), 2280-2293.
- Nishimura, K., Kato, Y., & Sakamoto, W. (2017). Essentials of proteolytic machineries in chloroplasts. *Molecular plant*, 10(1), 4-19.

- Nishimura, K., & van Wijk, K. J. (2015). Organization, function and substrates of the essential Clp protease system in plastids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1847(9), 915-930.
- Nozawa, A., and Tozawa, Y. (2014) Modifications of wheat germ cell-free system for functional proteomics of plant membrane proteins. *Methods Mol Biol* 1072: 259–272
- Oburger, E., Jones, D.L. (2018) Sampling root exudates – mission impossible? *Rhizosphere* 6, 116–133
- Olinares, P. D. B., Kim, J., Davis, J. I., & van Wijk, K. J. (2011). Subunit stoichiometry, evolution, and functional implications of an asymmetric plant plastid ClpP/R protease complex in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 23(6), 2348-2361.
- Oomen, R.J., Benito, B., Sentenac, H., Rodriguez-Navarro, A., Talon, M., Very, A.A., and Domingo, C. (2012) HKT2;2/1, a K⁺-permeable transporter identified in a salt-tolerant rice cultivar through surveys of natural genetic polymorphism. *Plant J* 71: 750–762
- Padmanabhan A, Vuong SA, Hochstrasser M (2016) Assembly of an Evolutionarily Conserved Alternative Proteasome Isoform in Human Cells. *Cell reports*, 14:2962-74.
- Park, S., & Rodermel, S. R. (2004). Mutations in ClpC2/Hsp100 suppress the requirement for FtsH in thylakoid membrane biogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(34), 12765-12770.
- Peltier, J. B., Cai, Y., Sun, Q., Zabrouskov, V., Giacomelli, L., Rudella, A., ... & van Wijk, K. J. (2006). The oligomeric stromal proteome of *Arabidopsis thaliana* chloroplasts. *Molecular & Cellular Proteomics*, 5(1), 114-133.
- Peltier, J. B., Emanuelsson, O., Kalume, D. E., Ytterberg, J., Friso, G., Rudella, A., ... & van Wijk, K. J. (2002). Central functions of the luminal and peripheral thylakoid proteome of *Arabidopsis* determined by experimentation and genome-wide prediction. *The Plant Cell*, 14(1), 211-236.
- Peltier, J. B., Fares, A., & Rossignol, M. (2014). Identification of nitrosylated proteins (SNO) and applications in plants. In *Nitric Oxide in Plants: Metabolism and Role in Stress Physiology* (pp. 85-125). Springer, Cham.
- Peltier, J. B., Ripoll, D. R., Friso, G., Rudella, A., Cai, Y., Ytterberg, J., ... & van Wijk, K. J. (2004a). Clp protease complexes from photosynthetic and non-photosynthetic plastids and mitochondria of plants, their predicted three-dimensional structures, and functional implications. *Journal of Biological Chemistry*, 279(6), 4768-4781.
- Peltier, J. B., & Rossignol, M. (1996). Auxin-induced differential sensitivity of the H⁺-ATPase in plasma membrane subfractions from tobacco cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 219(2), 492-496.
- Peltier, J. B., Ytterberg, J., Liberles, D. A., Roepstorff, P., & van Wijk, K. J. (2001). Identification of a 350-kDa ClpP protease complex with 10 different Clp isoforms in chloroplasts of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, 276(19), 16318-16327.

- Peltier, J. B., Ytterberg, A. J., Sun, Q., & van Wijk, K. J. (2004b). New functions of the thylakoid membrane proteome of *Arabidopsis thaliana* revealed by a simple, fast, and versatile fractionation strategy. *Journal of Biological Chemistry*, 279(47), 49367-49383.
- Periasamy, A., Shadiac, N., Amalraj, A., Garajova, S., Nagarajan, Y., Waters, S., Mertens, H.D., and Hrmova, M. (2013) Cell-free protein synthesis of membrane (1,3)-beta-d-glucan (curdlan) synthase: co-translational insertion in liposomes and reconstitution in nanodiscs. *Biochim Biophys Acta* 1828: 743–757
- Pinard, D., & Mizrahi, E. (2018). Unsung and understudied: plastids involved in secondary growth. *Current opinion in plant biology*, 42, 30-36.
- Poitout, A., Martinière, A., Kucharczyk, B., Queruel, N., Silva-Andia, J., Mashkoo, S., ... & Touraine, B. (2017). Local signalling pathways regulate the *Arabidopsis* root developmental response to *Mesorhizobium loti* inoculation. *J Exp Bot*, 68: 1199-1211
- Pozueta-Romero J, Rafia F, Houline G, Cheniclet C, Carde JP, et al. 1997. A ubiquitous plant housekeeping gene, PAP, encodes a major protein component of bell pepper chromoplasts. *Plant Physiol*. 115:1185–94
- Preece C et Penuelas J (2020) A Return to the Wild: Root Exudates and Food Security. *Trends Plant Sci* 25: 14-21
- Pruvot G, Cuine S, Peltier G, Rey P. 1996. Characterization of a novel drought-induced 34-kDa protein located in the thylakoids of *Solanum tuberosum* L. plants. *Planta* 198:471–79
- Pulido, P., Llamas, E., Llorente, B., Ventura, S., Wright, L.P., and Rodríguez-Concepción, M. (2016). Specific Hsp100 chaperones determine the fate of the first enzyme of the plastidial isoprenoid pathway for either refolding or degradation by the stromal Clp protease in *Arabidopsis*. *PLoS Genet*. 12:e1005824.
- Puyaubert, J., Fares, A., Rézé, N., Peltier, J. B., & Baudouin, E. (2014). Identification of endogenously S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis* plantlets: effect of cold stress on cysteine nitrosylation level. *Plant Science*, 215, 150-156.
- Ramundo, S., Casero, D., Mühlhaus, T., Hemme, D., Sommer, F., Crèvecoeur, M., Rahire, M., Schroda, M., Rusch, J., Goodenough, U., et al. (2014). Conditional depletion of the *Chlamydomonas* chloroplast ClpP protease activates nuclear genes involved in autophagy and plastid protein quality control. *Plant Cell*. 26:2201–2222
- Rangan, L., Vogel, C., and Srivastava, A. (2008) Analysis of Context Sequence Surrounding Translation Initiation Site from Complete Genome of Model Plants. *Molecular Biotechnology* 39: 207–213
- Ren ZH, Gao JP, Li LG, Cai XL, Huang W, Chao DY, Zhu MZ, Wang ZY, Luan S, Lin HX (2005) A rice quantitative trait locus for salt tolerance encodes a sodium transporter. *Nat Genet* 37: 1141–1146
- Rey P, Gillet B, Römer S, Eymery F, Massimino J, et al. 2000. Over-expression of a pepper plastid lipid-associated protein in tobacco leads to changes in plastid ultrastructure and plant development upon stress. *Plant J*. 21:483–94

- Riedelsberger, J., Vergara-Jaque, A., Piñeros, M., Dreyer, I., and González, W. (2019) An extracellular cation coordination site influences ion conduction of OsHKT2;2. *BMC Plant Biol* 19: 316
- Rivera-Rivera, I., Román-Hernández, G., Sauer, R. T., & Baker, T. A. (2014). Remodeling of a delivery complex allows ClpS-mediated degradation of N-degron substrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(37), E3853-E3859.
- Roman-Hernandez G, Hou JY, Grant RA, Sauer RT, Baker TA. 2011. The ClpS adaptor mediates staged delivery of N-end rule substrates to the AAA+ClpAP protease. *Mol. Cell* 43:217–28
- Rongsawat, T., Peltier, J.-B., Boyer, J.-C., Véry, A.-A., and Sentenac, H (2021). Looking for Root Hairs to Overcome Poor Soils. *Trends Plant Sci* (in press)
<http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2020.09.001>
- Rongsawat T., Madani I., Sentenac H., Peltier JB Phenotyping of root hair zone development and root system architecture using rhizobox-like growth conditions. (en cours de rédaction)
- Rouquié, D., Peltier, J. B., Marquis-Mansion, M., Tournaire, C., Doumas, P., & Rossignol, M. (1997). Construction of a directory of tobacco plasma membrane proteins by combined two-dimensional gel electrophoresis and protein sequencing. *Electrophoresis*, 18(3-4), 654-660.
- Rudella, A., Friso, G., Alonso, J. M., Ecker, J. R., & Van Wijk, K. J. (2006). Downregulation of ClpR2 leads to reduced accumulation of the ClpPRS protease complex and defects in chloroplast biogenesis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 18(7), 1704-1721.
- Rudrappa, T., Czymmek, K.J., Paré, P.W., and Bais, H.P. (2008). Root-secreted malic acid recruits beneficial soil bacteria. *Plant Physiol.* 148, 1547–1556. doi: 10.1104/pp.108.127613.
- Sakuraba, Y., Tanaka, R., Yamasato, A., & Tanaka, A. (2009). Determination of a chloroplast degron in the regulatory domain of chlorophyllide a oxygenase. *Journal of Biological Chemistry*, 284(52), 36689-36699.
- Sawers, R. J., Ramírez-Flores, M. R., Olalde-Portugal, V., & Paszkowski, U. (2018). The impact of domestication and crop improvement on arbuscular mycorrhizal symbiosis in cereals: insights from genetics and genomics. *New Phytologist*, 220(4), 1135-1140.
- Schiefner A, Skerra A. 2015. Thematic review of human lipocalins: a natural protein scaffold for molecular recognition of physiological compounds. *Acc. Chem. Res.* 48:976–85
- Shadiac, N., Nagarajan, Y., Waters, S., and Hrmova, M. (2013) Close allies in membrane protein research: cell-free synthesis and nanotechnology. *Mol Membr Biol* 30: 229–245
- Shahid, S. A., Zaman, M., & Heng, L. (2018). Soil salinity: Historical perspectives and a world overview of the problem. In *Guideline for salinity assessment, mitigation and adaptation using nuclear and related techniques* (pp. 43-53). Springer, Cham.
- Shanmugabalaji V, Besagni C, Piller LE, Douet V, Ruf S, et al. 2013. Dual targeting of a mature plastoglobulin/fibrillin fusion protein to chloroplast plastoglobules and thylakoids in transplastomic tobacco plants. *Plant Mol. Biol.* 81:13–25

- Sharma T., Dreyer I., Kochian L., Piñeros M. A. (2016). The ALMT family of organic acid transporters in plants and their involvement in detoxification and nutrient security. *Front. Plant Sci.* 7:1488. doi: 10.3389/fpls.2016.01488
- Shikanai, T., Shimizu, K., Ueda, K., Nishimura, Y., Kuroiwa, T., and Hashimoto, T. (2001). The chloroplast *clpP* gene, encoding a proteolytic subunit of ATP-dependent protease, is indispensable for chloroplast development in tobacco. *Plant Cell Physiol.* 42:264–273.
- Shinano, T., Cheng, W., Saito, K., Oikawa, A., Purwanto, B. H., & Tawarayama, K. (2020) Metabolomic analysis of night-released soybean root exudates under high- and low-K conditions. *Plant and Soil*, 456: 259-276
- Simkin AJ, Gaffe J, Alcaraz JP, Carde JP, Bramley PM, et al. 2007. Fibrillin influence on plastid ultrastructure and pigment content in tomato fruit. *Phytochemistry* 68:1545–56
- Singh DK, Laremore TN, Smith PB, Maximova SN, McNellis TW. 2012. Knockdown of *FIBRILLIN4* gene expression in apple decreases plastoglobule plastoquinone content. *PLOS ONE* 7:e47547
- Singh DK, Maximova SN, Jensen PJ, Lehman BL, Ngugi HK, McNellis TW. 2010. *FIBRILLIN4* is required for plastoglobule development and stress resistance in apple and *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 154:1281–93
- Singh DK, McNellis TW. 2011. Fibrillin protein function: the tip of the iceberg? *Trends Plant Sci.* 16:432–41
- Sjögren, L. L., & Clarke, A. K. (2011). Assembly of the chloroplast ATP-dependent Clp protease in *Arabidopsis* is regulated by the ClpT accessory proteins. *The Plant Cell*, 23(1), 322-332.
- Sjögren, L. L., MacDonald, T. M., Sutinen, S., & Clarke, A. K. (2004). Inactivation of the *clpC1* gene encoding a chloroplast Hsp100 molecular chaperone causes growth retardation, leaf chlorosis, lower photosynthetic activity, and a specific reduction in photosystem content. *Plant physiology*, 136(4), 4114-4126.
- Sjögren, L. L., Stanne, T. M., Zheng, B., Sutinen, S., & Clarke, A. K. (2006). Structural and functional insights into the chloroplast ATP-dependent Clp protease in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 18(10), 2635-2649.
- Sjögren, L.L., Tanabe, N., Lympieropoulos, P., Khan, N.Z., Rodermeil, S.R., Aronsson, H., and Clarke, A.K. (2014). Quantitative analysis of the chloroplast molecular chaperone ClpC/Hsp93 in *Arabidopsis* reveals new insights into its localization, interaction with the Clp proteolytic core, and functional importance. *J. Biol. Chem.* 289: 11318–11330
- Solymosi, K., & Keresztes, Á. (2012). Plastid structure, diversification and interconversions II. Land plants. *Current chemical biology*, 6(3), 187-204.
- Solymosi, K., Tuba, Z., & Böddi, B. (2013). Desiccoplast–etioplast–chloroplast transformation under rehydration of desiccated poikilochlorophyllous *Xerophyta humilis* leaves in the dark and upon subsequent illumination. *Journal of plant physiology*, 170(6), 583-590.
- Somasundaram, S., Véry, A.A., Vinekar, R.S., Ishikawa, T., Kumari, K., Pulipati, S., Kumaresan, K., Corratgé-Faillie, C., Sowdhamini, R., Parida, A., Shabala, L., Shabala, S., and Venkataraman, G. (2020) Homology Modeling Identifies Crucial Amino-Acid Residues

- That Confer Higher Na⁺ Transport Capacity of OcHKT1;5 from *Oryza coarctata* Roxb. *Plant Cell Physiol* 61: 1321–1334
- Strehmel, N., Böttcher, C., Schmidt, S., & Scheel, D. (2014). Profiling of secondary metabolites in root exudates of *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry*, 108, 35-46.
- Striebel, F., Kress, W., & Weber-Ban, E. (2009). Controlled destruction: AAA+ ATPases in protein degradation from bacteria to eukaryotes. *Current opinion in structural biology*, 19(2), 209-217.
- Stringlis, I. A., Yu, K., Feussner, K., de Jonge, R., Van Bentum, S., Van Verk, M. C., ... & Pieterse, C. M. (2018). MYB72-dependent coumarin exudation shapes root microbiome assembly to promote plant health. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(22), E5213-E5222.
- Su, Y., Luo, W., Lin, W., Ma, L., and Kabir, M.H. (2015) Model of Cation Transportation Mediated by High-Affinity Potassium Transporters (HKTs) in Higher Plants. *Biol Proced Online* 17: 1
- Takai, K., Sawasaki, T., and Endo, Y. (2010) Practical cell-free protein synthesis system using purified wheat embryos. *Nat Protoc* 5: 227–238
- Tanaka, R., Koshino, Y., Sawa, S., Ishiguro, S., Okada, K., & Tanaka, A. (2001). Overexpression of chlorophyllide a oxygenase (CAO) enlarges the antenna size of photosystem II in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 26(4), 365-373.
- Tapken, W., Kim, J., Nishimura, K., van Wijk, K.J., and Pilon, M. (2015). The Clp protease system is required for copper ion-dependent turnover of the PAA2/HMA8 copper transporter in chloroplasts. *New Phytol.* 205:511–517.
- Temegne, N. C., Foh, T. D., Taffouo, V. D., Wakem, G. A., & Youmbi, E. (2018). Effect of mycorrhization and soluble phosphate on growth and phosphorus supply of Voandzou [*Vigna subterranea* (L.) Verdc.]. *Legume Research-An International Journal*, 41(6), 879-884.
- Teixeira, P. F., & Glaser, E. (2013). Processing peptidases in mitochondria and chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1833(2), 360-370.
- Tian, W., Wang, C., Gao, Q., Li, L., & Luan, S. (2020). Calcium spikes, waves and oscillations in plant development and biotic interactions. *Nature plants*, 6(7), 750-759.
- Tran, L. S. P., Nakashima, K., Sakuma, Y., Osakabe, Y., Qin, F., Simpson, S. D., ... & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2007). Co-expression of the stress-inducible zinc finger homeodomain ZFHD1 and NAC transcription factors enhances expression of the ERD1 gene in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 49(1), 46-63.
- Uechi, H., Hamazaki, J., & Murata, S. (2014). Characterization of the testis-specific proteasome subunit α 4s in mammals. *Journal of biological chemistry*, 289(18), 12365-12374.
- Vacheron, J., Desbrosses, G., Bouffaud, M. L., Touraine, B., Moënne-Loccoz, Y., Muller, D., Legendre L, Wisniewski-Dyé F., & Prigent-Combaret, C. (2013) Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Frontiers in plant science*, 4, 356

- van Wijk, K. J. (2015). Protein maturation and proteolysis in plant plastids, mitochondria, and peroxisomes. *Annual Review of Plant Biology*, 66, 75-111.
- van Wijk, K. J., Peltier, J. B., & Giacomelli, L. (2007). Isolation of chloroplast proteins from *Arabidopsis thaliana* for proteome analysis. In *Plant Proteomics* (pp. 43-48). Humana Press.
- van Wijk, K. J., & Kessler, F. (2017). Plastoglobuli: plastid microcompartments with integrated functions in metabolism, plastid developmental transitions, and environmental adaptation. *Annual Review of Plant Biology*, 68, 253-289.
- Varshavsky, A. (2011). The N-end rule pathway and regulation by proteolysis. *Protein science*, 20(8), 1298-1345.
- Varshavsky, A. (2019). N-degron and C-degron pathways of protein degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(2), 358-366.
- Venturi, V. and Keel, C. (2016) Signaling in the rhizosphere. *Trends Plant Sci.* 21, 187–198
- Véry, A.A., Nieves-Cordones, M., Daly, M., Khan, I., Fizames, C., and Sentenac, H. (2014) Molecular biology of K⁺ transport across the plant cell membrane: What do we learn from comparison between plant species? *J Plant Physiol* 171: 748–769
- Vigani, G., Tarantino, D., & Murgia, I. (2013). Mitochondrial ferritin is a functional iron-storage protein in cucumber (*Cucumis sativus*) roots. *Frontiers in plant science*, 4, 316.
- Vidi, P. A., Kanwischer, M., Baginsky, S., Austin, J. R., Csucs, G., Dörmann, P., ... & Bréhélin, C. (2006). Tocopherol cyclase (VTE1) localization and vitamin E accumulation in chloroplast plastoglobule lipoprotein particles. *Journal of biological chemistry*, 281(16), 11225-11234.
- Vidi PA, Kessler F, Bréhélin C. 2007. Plastoglobules: a new address for targeting recombinant proteins in the chloroplast. *BMC Biotechnol.* 7:4
- Vives-Peris, V., de Ollas, C., Gómez-Cadenas, A., & Pérez-Clemente, R. M. (2020). Root exudates: from plant to rhizosphere and beyond. *Plant cell reports*, 39(1), 3-17.
- Wada, T., Shimono, K., Kikukawa, T., Hato, M., Shinya, N., Kim, S.Y., Kimura-Someya, T., Shirouzu, M., Tamogami, J., Miyauchi, S., Jung, K.H., Kamo, N., and Yokoyama, S. (2011) Crystal structure of the eukaryotic light-driven proton-pumping rhodopsin, *Acetabularia* rhodopsin II, from marine alga. *J Mol Biol* 411: 986–998
- Wang, P., Bi, S., Wang, S., & Ding, Q. (2006) Variation of wheat root exudates under aluminum stress. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(26), 10040-10046
- Wang, J., Hartling, J. A., & Flanagan, J. M. (1997). The structure of ClpP at 2.3 Å resolution suggests a model for ATP-dependent proteolysis. *Cell*, 91(4), 447-456.
- Wang, J., Yu, Q., Xiong, H., Wang, J., Chen, S., Yang, Z., & Dai, S. (2016). Proteomic insight into the response of *Arabidopsis* chloroplasts to darkness. *PLoS One*, 11(5), e0154235.
- Waters, S., Gilliam, M., and Hrmova, M. (2013) Plant High-Affinity Potassium (HKT) Transporters Involved in Salinity Tolerance: Structural Insights to Probe Differences in Ion Selectivity. *Int J Mol Sci* 14: 7660–7680.

- Weston, L. A., Ryan, P. R., & Watt, M. (2012). Mechanisms for cellular transport and release of allelochemicals from plant roots into the rhizosphere. *Journal of experimental botany*, 63(9), 3445-3454.
- Wickner, S., Gottesman, S., Skowrya, D., Hoskins, J., McKenney, K., & Maurizi, M. R. (1994). A molecular chaperone, ClpA, functions like DnaK and DnaJ. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(25), 12218-12222.
- Wickner, S., Maurizi, M. R., & Gottesman, S. (1999). Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins. *Science*, 286(5446), 1888-1893.
- Volken, J. J., & Palade, G. E. (1952). Fine structure of chloroplasts in two flagellates. *Nature*, 170(4316), 114-115.
- Woo, K. M., Kim, K. I., Goldberg, A. L., Ha, D. B., & Chung, C. H. (1992). The heat-shock protein ClpB in *Escherichia coli* is a protein-activated ATPase. *Journal of Biological Chemistry*, 267(28), 20429-20434.
- Xu, B., Waters, S., Byrt, C.S., Plett, D., Tyerman, S.D., Tester, M., Munns, R., Hrmova, M., and Gilliham, M. (2018) Structural variations in wheat HKT1;5 underpin differences in Na⁺ transport capacity. *Cell Mol Life Sci* 75 :1133-1144
- Yamasato, A., Nagata, N., Tanaka, R., & Tanaka, A. (2005). The N-terminal domain of chlorophyllide a oxygenase confers protein instability in response to chlorophyll b accumulation in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 17(5), 1585-1597.
- Yang, X., Scheffler, B. E., & Weston, L. A. (2004). SOR1, a gene associated with bioherbicide production in sorghum root hairs. *Journal of Experimental Botany*, 55(406), 2251-2259.
- Yang Y, Sulpice R, Himmelbach A, Meinhard M, Christmann A, Grill E. 2006. Fibrillin expression is regulated by abscisic acid response regulators and is involved in abscisic acid-mediated photoprotection. *PNAS* 103:6061–66
- Youssef A, Laizet Y, Block MA, Maréchal E, Alcaraz J-P, et al. 2010. Plant lipid-associated fibrillin proteins condition jasmonate production under photosynthetic stress. *Plant J*. 61:436–45
- Ytterberg, A. J., Peltier, J. B., & Van Wijk, K. J. (2006). Protein profiling of plastoglobules in chloroplasts and chromoplasts. A surprising site for differential accumulation of metabolic enzymes. *Plant physiology*, 140(3), 984-997.
- Yuan, P., Jauregui, E., Du, L., Tanaka, K., & Poovaiah, B. W. (2017). Calcium signatures and signaling events orchestrate plant–microbe interactions. *Current Opinion in Plant Biology*, 38, 173-183.
- Zbierzak, A. M. (2009). Isolation and characterization of the chilling sensitive 1 gene from *Arabidopsis*.
- Zebelo, S. A., Matsui, K., Ozawa, R., & Maffei, M. E. (2012). Plasma membrane potential depolarization and cytosolic calcium flux are early events involved in tomato (*Solanum lycopersicon*) plant-to-plant communication. *Plant Science*, 196, 93-100.

- Zemella, A., Thoring, L., Hoffmeister, C., and Kubick, S. (2015) Cell-Free Protein Synthesis: Pros and Cons of Prokaryotic and Eukaryotic Systems. *Chembiochem* 16: 2420–2431
- Zeng, Y., Du, J., Wang, L., Pan, Z., Xu, Q., Xiao, S., & Deng, X. (2015). A comprehensive analysis of chromoplast differentiation reveals complex protein changes associated with plastoglobule biogenesis and remodeling of protein systems in sweet orange flesh. *Plant Physiology*, 168(4), 1648-1665.
- Zeth, K., Dougan, D. A., Cusack, S., Bukau, B., & Ravelli, R. B. (2002). Crystallization and preliminary X-ray analysis of the Escherichia coli adaptor protein ClpS, free and in complex with the N-terminal domain of ClpA. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 58(7), 1207-1210.
- Zhong, L., & Belote, J. M. (2007). The testis-specific proteasome subunit Prosa6T of D. melanogaster is required for individualization and nuclear maturation during spermatogenesis. *Development*, 134(19), 3517-3525.
- Zörb, C., Geilfus, C.M., and Dietz, K.J. (2019) Salinity and crop yield. *Plant Biol (Stuttg)* 21 Suppl 1: 31–38
- Zybailov, B., Friso, G., Kim, J., Rudella, A., Rodríguez, V. R., Asakura, Y., ... & van Wijk, K. J. (2009). Large scale comparative proteomics of a chloroplast Clp protease mutant reveals folding stress, altered protein homeostasis, and feedback regulation of metabolism. *Molecular & cellular proteomics*, 8(8), 1789-1810.
- Zylka, M. J., & Reppert, S. M. (1999). Discovery of a putative heme-binding protein family (SOUL/HBP) by two-tissue suppression subtractive hybridization and database searches. *Molecular brain research*, 74(1-2), 175-181.

Liste des publications indexées

- Thanyakorn Rongsawat, Jean-Benoît Peltier, Jean-Christophe Boyer, Anne-Aliénor Véry, Hervé Sentenac (2020-09). Looking for Root Hairs to Overcome Poor Soils. **Trends in Plant Science**, in press, <https://dx.doi.org/10.1016%2Fj.tplants.2020.09.001>, <https://hal.inrae.fr/hal-02947957> (IF 14.4 Q1)
- Christelle Taochy, Isabelle Gaillard, Emilie Ipotesi, Ronald Oomen, Nathalie Leonhardt, Sabine Zimmermann, Jean-Benoît Peltier, Wojciech Szponarski, Thierry Simonneau, Hervé Sentenac, Rémy Gibrat, Jean-Christophe Boyer (2015-08). The Arabidopsis root stele transporter NPF2.3 contributes to nitrate translocation to shoots under salt stress. **Plant Journal**, 83 (3), 466-479, <https://dx.doi.org/10.1111%2Ftpj.12901>, <https://hal.inrae.fr/hal-01182122> (IF: 6.1 Q1)
- Juliette Puyaubert, Abasse Fares, Jean Benoît Peltier, Emmanuel Baudouin (2014). Identification of endogenously S-nitrosylated proteins in Arabidopsis plantlets: effect of cold stress on cysteine nitrosylation level.. **Plant Science**, 215-216 150-6, <https://dx.doi.org/10.1016%2Fj.plantsci.2013.10.014>, <https://hal.inrae.fr/hal-02635103> (IF 3.6 Q1)
- Minu Joseph, M. Dolores Ludevid, Margarita Torrent, Valerie Rofidal, Marc Tauzin, Michel Rossignol, Jean Benoît Peltier (2012). Proteomic characterisation of endoplasmic reticulum-derived protein bodies in tobacco leaves. **BMC Plant Biology**, 12 36, <https://dx.doi.org/10.1186%2F1471-2229-12-36>, <https://hal.inrae.fr/hal-02646831> (IF 3.5 Q1)
- [Research article] Abasse Fares, Michel Rossignol, Jean Benoît Peltier (2011). Proteomics investigation of endogenous S-nitrosylation in Arabidopsis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 416 (3-4), 331 - 336, <https://dx.doi.org/10.1016%2Fj.bbrc.2011.11.036>, <https://hal.inrae.fr/hal-02651442> (IF 3.0 Q1)
- Anne Geiger, Gustave Simo, Pascal Grébaut, Jean Benoît Peltier, Gérard Cuny, Philippe Holzmüller (2011). Transcriptomics and proteomics in human African trypanosomiasis: Current status and perspectives. **Journal of Proteomics**, 74 (9), 1625 - 1643, <https://dx.doi.org/10.1016%2Fj.jprot.2011.01.016>, <https://hal.inrae.fr/hal-02644926> (IF 3.5 Q1)
- C.M.A. Nten, Nicolas Sommerer, Valerie Rofidal, Christophe Hirtz, Michel Rossignol, G. Cuny, Jean Benoît Peltier, A. Geiger (2010). Excreted/secreted proteins from Trypanosome procyclic strains. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, 2010 212817, <https://dx.doi.org/10.1155%2F2010%2F212817>, <https://hal.inrae.fr/hal-02668579> (IF 2.3 Q1)
- Anne Geiger, Christophe Hirtz, Thierry Becue, Eric Bellard, Delphine Centeno, Daniel Gargani, Michel Rossignol, Gérard Cuny, Jean-Benoît Peltier (2010). Exocytosis and protein secretion in Trypanosoma. **BMC Microbiology**, 10 20, <https://dx.doi.org/10.1186%2F1471-2180-10-20>, <https://hal.inrae.fr/hal-02502942> (IF 3.2 Q1)

- Michel Rossignol, Jean Benoît Peltier, Hens-Peter Mock, Andrea Matros, Ana Maria Maldonado, Jorrin-Novo Jesús V. (2006-10). Plant proteome analysis: A 2004–2006 update. **Proteomics**, 6 (20), 5529-5548, <https://dx.doi.org/10.1002%2Fpmic.200600260>, <https://hal.inrae.fr/hal-02964771> (IF 3.3 Q1)
- A. Jimmy Ytterberg, Jean-Benoît Peltier, Klaas van Wijk (2006-03-08). Protein Profiling of Plastoglobules in Chloroplasts and Chromoplasts. A Surprising Site for Differential Accumulation of Metabolic Enzymes. **Plant Physiology**, 140 (3), 984-997, <https://dx.doi.org/10.1104%2Fpp.105.076083>, <https://hal.inrae.fr/hal-02966874> (IF 6.4 Q1)
- Jean-Benoît Peltier, Yang Cai, Qi Sun, Vladimir Zabrouskov, Lisa Giacomelli, Andrea Rudella, A. Jimmy Ytterberg, Heidi Rutschow, Klaas van Wijk (2006-01-03). The Oligomeric Stromal Proteome of Arabidopsis thaliana Chloroplasts. **Molecular and Cellular Proteomics**, 5 (1), 114-133, <https://dx.doi.org/10.1074%2Fmcp.M500180-MCP200>, <https://hal.inrae.fr/hal-02966945> (IF 4.9 Q1)
- Jean-Benoît Peltier, A. Jimmy Ytterberg, Qi Sun, Klaas van Wijk (2004-11-12). New Functions of the Thylakoid Membrane Proteome of Arabidopsis thaliana Revealed by a Simple, Fast, and Versatile Fractionation Strategy. **Journal of Biological Chemistry**, 279 (47), 49367-49383, <https://dx.doi.org/10.1074%2Fjbc.M406763200>, <https://hal.inrae.fr/hal-02966801> (IF 4.0 Q1)
- Giulia Friso, Lisa Giacomelli, A. Jimmy Ytterberg, Jean-Benoît Peltier, Andrea Rudella, Qi Sun, Klaas Wijk (2004-02-06). In-Depth Analysis of the Thylakoid Membrane Proteome of Arabidopsis thaliana Chloroplasts: New Proteins, New Functions, and a Plastid Proteome Database. **The Plant cell**, 16 (2), 478-499, <https://dx.doi.org/10.1105%2Ftpc.017814>, <https://hal.inrae.fr/hal-02966865> (IF 9.6 Q1)
- Jean-Benoît Peltier, Daniel Ripoll, Giulia Friso, Andrea Rudella, Yang Cai, Jimmy Ytterberg, Lisa Giacomelli, Jaroslaw Pillardy, Klaas van Wijk (2004-01-30). Clp Protease Complexes from Photosynthetic and Non-photosynthetic Plastids and Mitochondria of Plants, Their Predicted Three-dimensional Structures, and Functional Implications. **Journal of Biological Chemistry**, 279 (6), 4768-4781, <https://dx.doi.org/10.1074%2Fjbc.M309212200>, <https://hal.inrae.fr/hal-02966794>, <https://hal.inrae.fr/hal-02966801> (IF 4.0 Q1)
- Jean-Benoît Peltier, Olof Emanuelsson, Dário Kalume, Jimmy Ytterberg, Giulia Friso, Andrea Rudella, David Liberles, Linda Söderberg, Peter Roepstorff, Gunnar von Heijne, Klaas van Wijk (2002-01-01). Central Functions of the Lumenal and Peripheral Thylakoid Proteome of Arabidopsis Determined by Experimentation and Genome-Wide Prediction. **The Plant cell**, 14 (1), 211-236, <https://dx.doi.org/10.1105%2Ftpc.010304>, <https://hal.inrae.fr/hal-02966908> (IF 9.6 Q1)
- Peltier, J. B., Ytterberg, J., Liberles, D. A., Roepstorff, P., & van Wijk, K. J. (2001). Identification of a 350-kDa ClpP protease complex with 10 different Clp isoforms in chloroplasts of Arabidopsis thaliana. **Journal of Biological Chemistry**, 276(19), 16318-16327.
- D. Rouquié, Jean Benoît Peltier, M. Marquis-Mansion, C. Tournaire, Patrick Doumas, M. Rossignol (1997). Construction of a directory of tobacco plasma membrane proteins by combined two-dimensional gel electrophoresis and protein sequencing. **Electrophoresis**,

18 654-660, <https://dx.doi.org/10.1002%2Felps.1150180352>, <https://hal.inrae.fr/hal-01833636> (IF 3.1 Q1)

Nicolaus von Wirén, Jean Benoît Peltier, D. Rouquié, M. Rossignol, J.F. Briat (1997). Four root plasmalemma polypeptides under-represented in the maize mutant *ys1* accumulate in a Fe-efficient genotype in response to iron-deficiency. **Plant Physiology and Biochemistry**, 35 (12), 12 p., <https://hal.inrae.fr/hal-02687115> (IF 3.7 Q1)

Wojciech Szponarski, Jean Benoît Peltier, G. Tena, M. Rossignol (1997). Identification of 14kDa auxin-binding proteins in a tobacco plasma membrane subfraction responsive to auxin. **Biochemistry and molecular biology international**, 43 813-821, <https://dx.doi.org/10.1080%2F15216549700204631>, <https://hal.inrae.fr/hal-02686870> (IF 1.2 ??? Q1)

Jean Benoît Peltier, M. Rossignol (1996). Auxin-induced differential sensitivity of the H⁺-ATPase in plasma membrane subfractions from tobacco cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 219 492-496, <https://dx.doi.org/10.1006%2Fbbrc.1996.0261>, <https://hal.inrae.fr/hal-02685138> (IF 3.0 Q1)

Abasse Fares, Claude Nespoulous, Michel Rossignol, Jean Benoît Peltier (2014). Simultaneous identification and quantification of nitrosylation sites by combination of biotin switch and ICAT labeling. In : Plant proteomics: methods and protocols. (609-620). **Methods in Molecular Biology**. Springer Protocols, Humana Press, 609-620, <https://hal.inrae.fr/hal-01231245>

Jean Benoît Peltier, Abasse Fares, Michel Rossignol (2014). Identification of nitrosylated proteins (SNO) and applications in plants. In : Nitric Oxide in Plants: Metabolism and Role in Stress Physiology. (85-125). Springer International Publishing, np, https://dx.doi.org/10.1007%2F978-3-319-06710-0_6, <https://hal.inrae.fr/hal-01227410>

Klaas van Wijk, Jean-Benoît Peltier, Lisa Giacomelli (2007). Isolation of Chloroplast Proteins from *Arabidopsis thaliana* for Proteome Analysis. In : **Plant Proteomics**. Humana Press, 43-48, <https://dx.doi.org/10.1385%2F1-59745-227-0%3A43>, <https://hal.inrae.fr/hal-02966918>

Curriculum vitae

Jean-Benoît PELTIER

Chargé de Recherche INRAE, BPMP, UMR 5004, INRAE Bat7, 34060 Montpellier, France
Email: jean-benoit.peltier@inrae.fr

Education

- 1994-1997 Thèse - Hétérogénéité de la réponse à l'auxine de la H⁺-ATPase de cellules de tabac (*N. tabacum* L.) : Identification de sous-fractions de plasmalemma sensible à la phytohormone et d'une nouvelle classe de protéines fixant l'auxine. Superviseur : Michel Rossignol Université of Montpellier (France)
- 1992-1993 M2 Université de Montpellier stage : Sensibilité différentielle de la H⁺-ATPase à l'auxine de cellules de tabac superviseur M. Rossignol
- 1989-1990 M1 Biochimie & Génétique, Université d'Orsay, Paris XI (France)
- 1985-1988 L3 Université d'Angers (France)

Expérience professionnelle

- 2015 – présent: Chercheur, UMR BPMP, Equipe TICER, INRAE Montpellier, Projet: Relation structure-fonction and ionic selectivity bases in HKT transporters in cereals
- 2012 – 2015: Chercheur UMR BPMP, Equipe *Canaux Ioniques*, INRAE Montpellier. Projet: Relation structure-fonction et sélectivité ionique bases chez les transporteurs HKT de céréales
- 2005 – 2012: Chercheur au laboratoire de protéomique, INRAE Montpellier. Thématique: Protéomique et modification post-traductionnelles dans la signalisation cellulaire.
- 2001 – 2005: Post-doctorat au département de biologie des plantes, Cornell University (Ithaca NY USA). Projet: Structure du complexe Clp et des plastoglobules
- 1998 – 2000: Post-doctorat au département of Biochimie, Arrhenius laboratories, Stockholm University, Stockholm. Projet: Biogenèse des thylacoïdes chez les plantes supérieures
- 1990-1992: Service National INRAE-CRAAG (Guadeloupe) Laboratoire d'amélioration des plantes (L. degras et laboratoire de Biochimie et Physiologie (C. Zinsou)
- Sélection sanitaire de l'igname et effets des phytohormones sur la croissance et le développement de *Pachyrhizus erosus*
- Juillet 1985, 86, 87, 88, 89, 90: Société France-Maize Pioneer - Corné (France). Sélection du maïs (création variétale)

Stages effectués

- 1990-1992: Service national INRA-CRAAG Laboratoire d'amélioration des plantes (dir L. Degras) et Laboratoire de Physiologie (Dir C . Zinsou)
- 192: Stage de DEA (M2) – INRAE UMR 5004 Montpellier – Sous la direction de Michel Rossignol
- 1994-1997: Thèse UMR 5004 sous la direction de Michel Rossignol
- Avr. 1998 – Dec2000: Stage post-doctoral – Stockholm University Suède – Sous la direction de Klaas Jan vanWijk
- jan. 2001 – Août 2005 : Stage post-doctoral – Université de Cornell, Etats-Unis – Sous la direction de Klaas Jan vanWijk

Collaborations

Nationales

UMR d'agroécologie: Equipe Santé des plantes: défenses et mycorhizes **Dijon**
collaboration avec Pierre-Emmanuel Courty

LSTM: Equipe Réseaux et Interactions Symbiotiques dans les éco-Agrosystèmes
Montpellier Collaboration avec Ezékiel Baudoin & Brigitte Brunel

UMR AGAP: Equipe Ge2Pop **Montpellier** Collaboration avec Jacques David, Hélène
Fréville et Pierre Roumet

LRSV Université de **Toulouse**: Collaboration avec Guillaume Bécard et Christophe Roux

UMR IGF: Equipe PBSPM **Montpellier** collaboration avec Sébastien Granier

Internationales

Laboratoire de microbiologie Université libanaise, Beyrouth, **Liban**, collaboration avec Ali
Chokr, Loubna El zein & Israa dandache

IRAL **Liban** collaboration avec Ali Chehabe et Ahmad Bitar

Contrats de recherche obtenus

2007-2010	Protein storage	ERA-PG (EU)	808107 €	Partenaires: Nestlé, PartnerChip, Aachen Univ, Era-Biotech, CSIC-IRTA, INRAE
2007-2010	PIANO	ANR Blanc	500000 €	Partenaires: Univ Dijon , Univ Paris VI , INRAE
2009-2012	TransN	ANR Blanc	176581 €	INRAE
2011-2014	CaroMaize	ANR Plant-KBBE	293000 €	Partenaires: PartnerChip & INRAE
2020-2024	SCOOP	ANR Blanc	497 841 €	Partenaires: INRAE, CNRS, SupAgro

Etudiants encadres

Etudiants en these

Abasse Fares	Thèse	2009 – 2012
Thanyakorn Rongsawat	Thèse	2016 -2019
Houssein Zhou	Thèse	2018 - en cours
Ikram Madani	Thèse	2019 – en cours

Etudiants en Master 2

Sébastien Rondeau	M2R_BFP	2007
Houssein Zhou	M2 Univ Libanaise	2018

Autres Etudiants

Charlotte Falk	L3p Métiers de la biotec	2010
Audrey Villesseche	BTS 1&2 BioAnal & Contrôle	2014-2015
Timothée Sanchez	L3 BFP	2016
Valentin Guyot	M1 BFP	2017
Elsa Friso	M1 Sc. du méd	2018
Eléna Raud	M1 BFP	2019
Quentin Riga	IL3 BFP	2020
Rayan Korriche	BTS 1 BioAnal & Contrôle	2020

Principales publications

- Rongsawat, T., Peltier, J. B., Boyer, J. C., Véry, A. A., & Sentenac, H. (2020). Looking for Root Hairs to Overcome Poor Soils. *Trends in Plant Science*. **A**
- Taochy, C., Gaillard, I., Ipotesi, E., Oomen, R., Leonhardt, N., Zimmermann, S., Peltier, J.B., ... & Gibrat, R. (2015). The Arabidopsis root stele transporter NPF2.3 contributes to nitrate translocation to shoots under salt stress. *The Plant Journal*, 83(3), 466-479. **A**
- Fares, A., Nespoulous, C., Rossignol, M., & Peltier, J. B. (2014). Simultaneous identification and quantification of nitrosylation sites by combination of biotin switch and ICAT labeling. In *Plant Proteomics* (pp. 609-620). Humana Press, Totowa, NJ. **A**
- Joseph, M., Ludevid, M. D., Torrent, M., Rofidal, V., Tauzin, M., Rossignol, M., & Peltier, J. B. (2012). Proteomic characterisation of endoplasmic reticulum-derived protein bodies in tobacco leaves. *BMC plant biology*, 12(1), 36. **A**
- Peltier, J. B., Cai, Y., Sun, Q., Zabrouskov, V., Giacomelli, L., Rudella, A., ... & van Wijk, K. J. (2006). The oligomeric stromal proteome of Arabidopsis thaliana chloroplasts. *Molecular & Cellular Proteomics*, 5(1), 114-133. **A**
- Peltier, J. B., Ytterberg, A. J., Sun, Q., & van Wijk, K. J. (2004). New functions of the thylakoid membrane proteome of Arabidopsis thaliana revealed by a simple, fast, and versatile fractionation strategy. *Journal of Biological Chemistry*, 279(47), 49367-49383. **A**
- Peltier, J. B., Ripoll, D. R., Friso, G., Rudella, A., Cai, Y., Ytterberg, J., ... & van Wijk, K. J. (2004). Clp protease complexes from photosynthetic and non-photosynthetic plastids and mitochondria of plants, their predicted three-dimensional structures, and functional implications. *Journal of Biological Chemistry*, 279(6), 4768-4781. **A**
- Peltier, J. B., Emanuelsson, O., Kalume, D. E., Ytterberg, J., Friso, G., Rudella, A., ... & van Wijk, K. J. (2002). Central functions of the lumenal and peripheral thylakoid proteome of Arabidopsis determined by experimentation and genome-wide prediction. *The Plant Cell*, 14(1), 211-236. **A**
- Peltier, J. B., Ytterberg, J., Liberles, D. A., Roepstorff, P., & van Wijk, K. J. (2001). Identification of a 350-kDa ClpP protease complex with 10 different Clp isoforms in chloroplasts of Arabidopsis thaliana. *Journal of Biological Chemistry*, 276(19), 16318-16327. **A**

Brevet

N° EP 2 083 619 B1 (PCT/FR2007/052259 WO 2008/05311 composition destinée à la lutte contre les insectes et autres arthropodes ravageurs des plantes

Lettre de motivation



Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes
UMR CNRS / INRA / SupAgro / UM

Jean-Benoît PELTIER
B&PMP, IBIP
Bat 7
2 Place Viala
34060 Montpellier

Direction de la Recherche et des Etudes Doctorales
de l'Université de Montpellier
Ecole Doctorale GAIA

Montpellier, le 20 Novembre 2020

Objet : Lettre de motivation pour l'obtention de l'Habilitation à Diriger les Recherches

Madame, Monsieur

J'ai été recruté en 2005 en tant que Chargé de Recherche à l'INRA au sein du Laboratoire de Protéomique Fonctionnelle à Montpellier puis lorsque celui-ci a fermé en 2012, j'ai rejoint le laboratoire de Biochimie & Physiologie Moléculaire des Plantes. Depuis mon recrutement, j'ai développé différents axes de recherche regroupant l'action des modifications post-traductionnelles sur les protéines (Nitrosylation, SUMOylation), la surproduction de protéines chez les plantes ou encore les relations structure-fonction de transporteurs Na/K chez les céréales. Ces projets ont bénéficié de l'aide précieuse de plusieurs étudiants qui ont participé à ce travail de recherche. En effet, au cours de ces années, j'ai encadré des étudiants de niveau L3, M1 et co-encadré 3 thèses (Abasse Fares, Thanyakorn Ronsawat, Houssein Zhou (en cours)), thèses sous la direction de Michel Rossignol (AF) ou d'Hervé Sentenac (TR, HZ) tous les deux (DR, HDR, INRAE). A l'issue de la thèse d'Abasse Fares, nous avons publié 2 articles sur son travail (dont un en premier auteur) et 2 chapitres de livre (dont un en premier auteur). L'activité d'encadrement d'étudiants est une occasion intéressante de transmettre des savoirs. Concernant le thèse de Thanyakorn Ronsawat, son travail a été valorisé pour le moment par un article de revue et dont il est le premier auteur, un autre article en cours d'écriture valorisera son travail de recherche.

L'obtention de l'Habilitation à Diriger des Recherches me permettrait de pouvoir prendre sous ma direction directe des doctorants à qui je souhaite proposer des projets innovants et porteurs.

Veuillez agréer, Madame, Monsieur, l'expression de mes sincères salutations.

Jean-Benoît Peltier

Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes
INRA - SupAgro / Bât. 7 - IBIP / 2, Place Pierre Viala / 34060 Montpellier Cedex 1
<https://www1.montpellier.inra.fr/wp-inra/bpmp/>



Tirés à part