



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-memoires-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



2013-2014

MASTER FAGE

Biologie et Ecologie pour la Forêt, l'Agronomie et l'Environnement

Spécialité

Bois, Fibre, Développement Durable (BFD)

Analyse de la voie de biosynthèse de l'acide abscissique chez deux génotypes de peuplier en réponse à la sécheresse : métabolites et expression des gènes dans les stomates

PIERRE-ANTOINE CHUSTE

Mémoire de stage, soutenu à Nancy le 03/09/2014

Maître de stage : Didier Le Thiec, Directeur de Recherche, INRA Nancy-Lorraine

Tuteur universitaire : Yves Jolivet, Professeur, Université de Lorraine, Nancy

UMR1137 INRA/UL Ecologie et Ecophysiologie Forestières
Faculté des Sciences & Technologies—54500 Vandœuvre-lès-Nancy

REMERCIEMENTS

Mes premiers remerciements vont à **Didier**, tu m'as fait confiance sur beaucoup de procédés et je t'en remercie. J'ai pu vraiment me rendre compte ce que c'est de mener un projet et je t'en remercie. Vraiment.

David, tu as dû supporter toutes mes questions, et mine de rien, tu as répondu ! Merci beaucoup pour le temps que tu m'as consacré !

Merci aussi à **Cédric**, tu m'as bien aiguillé pour toutes ces histoires obscures de LCMS et tu m'as payé des cafés ! et ça c'est cool.

Merci à **Irène** pour tous les conseils que tu m'as apportés ! Et pour la motivation.

Merci à toute l'équipe ENSAIA, **Romain, Christophe**.

Un grand merci à l'équipe de choc EEF, **Marie Béa, Cyril D, Cyril B, Franck, Nicolas, Mathilde, Nathalie, Jacqueline, Alexandre, Théo, Oliver, Pierre, Sarah, Bernard, Alwin**.

Merci également à **Yves** pour les conseils avisés.

LISTE DES FIGURES et TABLEAUX

Figure 1 : Illustration du trajet d'ABA dans les différents compartiments de l'arbre et dans le sol (d'après Sauter *et al.* 2001)

Figure 2 : Voie de biosynthèse de l'acide abscissique et gènes des enzymes impliquées.

Figure 3 : Illustration du choix des deux génotypes

Figure 4 : Schéma d'expérimentation pour les analyses métabolomiques

Figure 5 : Schéma d'expérimentation pour les analyses transcriptomiques

Figure 6 : Evolution de l'humidité et du poids des pots au cours du temps et en fonction de l'humidité des génotypes Carpaccio (rouge) et Soligo (bleu)

Figure 7 : Evolution au cours du temps (contrôles en bleu et sec en noir) de la conductance stomatique à la vapeur d'eau, g_s (A, B), de l'assimilation nette de CO_2 A (C, D) et de l'efficacité d'utilisation de l'eau intrinsèque, WUE_i , sur Carpaccio (A, C, E) et Soligo (B, D, F). Evolution du niveau d'éclairage dans la serre au cours de l'expérimentation (G,H). Les effets du traitement ont été testés avec une ANOVA à un facteur et sont libellés par * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ ou *** $p < 0,001$. Les flèches rouges indiquent les temps de prélèvement des feuilles utilisées pour les analyses transcriptomiques et métabolomiques.

Figure 8 : Effet de la sécheresse sur l'expression de gènes candidats (moyenne + erreur standard) d'enzymes chloroplastiques sur bêta-carotène hydroxylase 1 (a) et 2 (b), zéaxanthine epoxidase (c,d), 9-cis epoxy-caroténoïde dioxygénase (e, f) sur deux génotypes de peupliers, Carpaccio et Soligo à 4 heures différentes (24 (1), 30 (2), 54 (3) et 76 (4) heures). Les effets traitement, génotype et leur interaction ont été testés avec une ANOVA à deux facteurs et sont libellés par * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, NS = non significatif

Figure 9 : Effet de la sécheresse sur l'expression de gènes candidats (moyenne + erreur standard) d'enzymes cytosoliques sur xanthoxine dehydrogénase (a), aldéhyde-abscissique oxydase (b, c) et molybdène cofacteur sulfurase sur deux génotypes de peupliers, Carpaccio et Soligo à 4 heures différentes (24 (1), 30 (2), 54 (3) et 76 (4) heures). L'effet traitement, génotype et leur interaction ont été testés avec une ANOVA à deux facteurs et sont libellés par * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, NS = non significatif

Figure 10 : Heat maps représentant les niveaux de régulation (expression des secs / expression des témoins) de gènes candidats d'enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse de l'acide abscissique sur deux génotypes, Carpaccio (encadré vert) et Soligo (encadré rouge) à 4 temps (1, 2, 3 et 4 correspondant respectivement à 24, 30, 54 et 76 heures après le début de la sécheresse)

Figure 11 : Voie de biosynthèse de l'ABA version finale

Figure 12 : Réaction de clivage des AtNCED

Tableau 1 : Orthologues d'*A.thaliana* chez *P.Trichocarpa*

Tableau 2 : Prédiction de la localisation subcellulaire et du nombre d'hélices transmembranaires des enzymes putativement impliquées dans la biosynthèse d'ABA chez le peuplier. RC (Reliability Class, $1 \leq RC \leq 5$) exprime la fiabilité de la prédiction de TargetP1.1 (plus la valeur de RC est faible, plus sûre est la prédiction). P ($0 \leq P \leq 1$) représente le score associé à la prédiction de MultiLoc (plus la valeur de P est forte, plus la prédiction est fiable).

Tableau 3 : Tableau de corrélation entre les gènes des enzymes responsables de la voie de biosynthèse de l'acide abscissique

LISTE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS

A : Adénine

A : Assimilation nette de CO₂ (μmol.m⁻².s⁻¹)

AAO : Abscissique-aldéhyde oxydase

ABA : Acide Abscissique

ABA 1 : Zéaxanthine époxydase

ABA 2 : Xanthoxine déhydrogénase

ABA 3 : Cofacteur du molybdenum sulfurase

β-OHASE : Béta-carotène hydroxylase

C : Cytosine

Ca²⁺ : Ion Calcium

Cl⁻ : Ion Chlorure

CO₂ : Dioxyde de carbone

Δ¹³C : Ratio d'isotopes stables non radioactifs de carbone dans un échantillon

G : Guanine

g_s : Conductance stomatique à la vapeur d'eau (mol.m⁻².s⁻¹)

K⁺ : Ion potassium

NCED : 9-cis époxycaroténoïde dioxygénase

Pa : Pascal

PAR : Rayonnement photosynthétiquement Actif

pb : paire de bases

pH : potentiel Hydrogène

T : Thymine

T_m : Température de fusion

VPD : Déficit de Pression de Vapeur d'eau

WUE_i : Efficience d'utilisation de l'eau intrinsèque (μmol.mol⁻¹)

SOMMAIRE

INTRODUCTION

- 1) Changement climatique et sécheresse 1
- 2) Rôles des stomates 2
- 3) Système d'ouverture et de fermeture stomatique 2
- 4) Choix du support végétal : le peuplier 3
- 5) Objectifs de recherches 3

MATERIELS ET METHODES

- 1) Matériel végétal 6
- 2) Mise en place de la sécheresse et suivi 6
- 3) Mesures des échanges gazeux foliaires : assimilation nette de CO₂ et conductance stomatique à la vapeur d'eau
 - 3.1) *Présentation des mesures.* 7
 - 3.2) *Analyses statistiques.* 7
- 4) Analyses métabolomiques 7
- 5) Microdissection des stomates et analyses transcriptomiques
 - 5.1) *Microdissection* 8
 - 5.2) *Extraction d'ARN, synthèse et amplification des ADNc* 9
 - 5.3) *Dessin des amorces* 9
 - 5.4) *PCR quantitative en temps réel* 10
 - 5.5) *Prédiction de la localisation subcellulaire et de la topologie des protéines* 10
 - 5.6) *Analyses statistiques* 10

RESULTATS

- 1) Mise en place de la sécheresse 11
- 2) Echanges gazeux foliaires
 - 2.1) *Suivi de l'assimilation nette de CO₂ (A)* 13
 - 2.2) *Suivi de la conductance stomatique à la vapeur d'eau (g_s)* 13
 - 2.3) *Suivi de l'efficacité d'utilisation de l'eau (WUE_i)* 13
- 3) Analyses transcriptomiques

3.1) Recherche de gènes candidats pour la voie de biosynthèse de l'acide abscissique 14

3.2) Evolution des expressions normalisées au cours du temps 18

4) Analyses métabolomiques 20

DISCUSSION / CONCLUSION / PERSPECTIVES 20

Bibliographie

Annexe n°1 : Premières étapes de l'élaboration du protocole de dosage de l'acide abscissique

Annexe n°2 : Liste des gènes étudiés avec leurs amorces spécifiques

INTRODUCTION

1) Changement climatique et sécheresse

La sécheresse est l'un des stress abiotiques les plus importants pour les plantes, l'eau étant la ressource la plus limitante pour la croissance, la productivité et le rendement (Boyer, 1982).

La sécheresse peut être définie comme une déficience de précipitation, pendant une période de temps relatif à des paramètres multiples validés statistiquement, pour une région donnée. Une sécheresse peut prendre plusieurs formes, différant en fonction du temps et de l'intensité. Dans le contexte actuel de changement climatique, il est fortement probable que celles-ci deviendront non seulement plus fréquentes mais également plus intenses. Le GIEC (Groupe d'experts Intergouvernemental sur l'Evolution du Climat) a affirmé qu'il y a un risque de 90 % que toutes les surfaces sur le globe seront sujettes à une augmentation des températures moyennes avec comme résultante des événements climatiques plus extrêmes dont les sécheresses (IPCC 2007, 2013). Le groupe I du GIEC a également prédit une augmentation des précipitations dans certaines régions du globe durant l'hiver et le printemps et une diminution de celles-ci durant les étés. Cela aura pour conséquence un effet négatif sur beaucoup de régions et zones climatiques dépendantes de ressources agricoles ou forestières.

Les forêts ne sont pas épargnées par le changement climatique. Certains effets se révèlent bénéfiques, mais le changement climatique, dans son ensemble, risque de causer des dommages importants.

L'ampleur du changement en cours et de ses impacts a toujours été révisée à la hausse. Mais c'est la multiplication d'événements climatiques extrêmes tels que les tempêtes et les sécheresses successives au début des années 2000 qui a fait prendre conscience qu'il faut agir rapidement.

En effet, les arbres présents aujourd'hui seront sujets à des conditions climatiques qui évoluent et continueront à changer dans plusieurs décennies, voire plus d'un siècle (Lefèvre *et al.* 2014). C'est pourquoi il faudra repenser notre façon de gérer nos forêts.

Pour mieux comprendre le fonctionnement des écosystèmes forestiers et à terme assurer leur durabilité, il est important non seulement de caractériser les réponses des différentes espèces forestières aux changements climatiques, mais aussi d'analyser les mécanismes d'adaptation en abordant la plasticité inter et intra-spécifique de traits fonctionnels liés à l'acquisition des ressources (eau, carbone, ...). Une voie de recherche possible pour limiter les effets d'une réduction de disponibilité en eau est celle de l'optimisation de son utilisation pour la production de biomasse. L'efficacité d'utilisation de l'eau correspond au rapport entre la quantité de carbone fixé dans la biomasse et la quantité d'eau transpirée par la plante, pour une période de temps donnée. Elle est souvent estimée en utilisant comme indicateur intégré la composition isotopique de la matière organique en ^{13}C ($\Delta^{13}\text{C}$) (Farquhar & Richards, 1984). L'efficacité d'utilisation de l'eau (WUE) est également définie à des pas de temps plus courts, comme le rapport entre assimilation nette de CO_2 et conductance stomatique pour la vapeur d'eau (W_i , efficacité intrinsèque). WUE est souvent plus sous la dépendance de la conductance stomatique que de l'assimilation.

2) Rôles des stomates

Les plantes répondent à des stress osmotiques (qui peuvent être dus à une baisse de l'humidité du sol ou à un déficit de pression de vapeur d'eau (VPD) élevé) à de nombreuses échelles. Les plantes ferment généralement leurs stomates pour limiter les pertes en eau par transpiration, mais cela s'accompagne également par une perte de l'assimilation en CO₂. Sur une longue période de temps, cela se traduira par une perte de croissance ou dans les cas extrêmes par un dépérissement de la plante.

Les stomates sont des pores formés par une paire de cellules, les cellules de garde, qui peuvent s'ouvrir et se fermer afin de contrôler les échanges entre la plante et son environnement. La fonction principale des stomates est de contrôler les pertes en eau tout en laissant passer le dioxyde de carbone pour la photosynthèse. Dans le cas de sécheresse, le rôle des stomates pour diminuer la transpiration est par le fait extrêmement important et les réponses physiologiques des végétaux pour éviter des pertes d'eau excessives suivent principalement deux stratégies d'utilisation de l'eau, variables d'une espèce à l'autre (Van der Molen *et al.* 2011) :

- une stratégie d'évitement, caractérisée par une fermeture précoce et rapide des stomates dès l'apparition de contraintes hydriques modérées,
- une stratégie de tolérance par une fermeture relativement tardive et progressive des stomates malgré des niveaux de sécheresses poussées.

3) Système d'ouverture et de fermeture stomatique

Les changements morphologiques des cellules de garde induisent l'ouverture et la fermeture des stomates. Ceux-ci sont présents soit sur les deux faces de la feuille comme chez le peuplier avec cependant une densité plus élevée sur la face abaxiale (face inférieure) ou sur une seule face comme chez le chêne ou le hêtre.

L'ensemble des stomates forme une surface alvéolée d'espaces remplis d'air qui peut constituer entre 15 et 40 % de la surface foliaire totale. Ces espaces contiennent de l'air saturé en eau qui est évaporé via le mésophylle.

L'ouverture des stomates est provoquée par la force motrice liée à l'augmentation du volume des cellules de garde et la pression de turgescence causée par une entrée d'eau. Ces flux d'eau suivent généralement l'accumulation d'ions K⁺ provoquée par une hyperpolarisation de la membrane plasmique, suite à l'activation d'une pompe à proton (Outlaw and Manchester, 1979). L'ouverture stomatique est ensuite maintenue par l'accumulation de sucres issus de la photosynthèse des chloroplastes des cellules de garde. La fermeture stomatique est le processus inverse de celui décrit ci-dessus, impliquant en plus le calcium (Ca²⁺), c'est-à-dire avec une perte en solutés au sein des cellules de garde. L'eau va alors sortir des cellules de garde, ce qui causera une perte de turgescence et le stomate se fermera. Plusieurs facteurs comme l'acide abscissique (ABA) ou une hausse de concentration en CO₂ peuvent stimuler l'absorption de Ca²⁺ ce qui entraîne une dépolarisation de la membrane puis une sortie d'ions Cl⁻ et malate²⁻ et enfin une diffusion passive des ions K⁺ (Lawson, 2009). Les racines lors d'une sécheresse produisent des signaux chimiques tels que l'ABA qui est ensuite transportée vers les parties supérieures, telle que la feuille, afin de modifier sa physiologie. Les mouvements stomatiques sont affectés par un certains nombres de facteurs environnementaux tels que le CO₂, la lumière et la température. Généralement une augmentation de CO₂ induit une fermeture stomatique. Les stomates s'ouvrent en présence de lumière et se ferme dans l'obscurité.

4) Choix du support végétal : le peuplier

Le peuplier, appartenant au genre *Populus*, est originaire de Chine et du Japon (Khosla and Khurana, 1982). S'étant beaucoup développé notamment au Canada, ce genre couvre plusieurs espèces : le peuplier tremble (*P. tremuloides*), le peuplier baumier (*P. trichocarpa*), le peuplier à grandes dents (*P. grandidentata*), le peuplier à feuille deltoïde (*P. deltoides*), le peuplier noir (*P. nigra*). Ces espèces sont à feuilles caduques (qui renouvellent leurs feuilles chaque année), possèdent une croissance rapide, aiment l'humidité et sont généralement intolérant à l'ombre. De plus, les peupliers possèdent un large spectre de caractéristiques morphologiques et physiologiques différentes en fonction des génotypes d'une même espèce. Cette grande variation entre les espèces et son bouturage facile ont permis d'avoir une large diversité génétique au sein du genre *Populus* avec comme conséquence de nombreux hybrides possédant des caractéristiques spécifiques.

Utilisé comme support de nombreux programmes scientifiques, il le doit au fait qu'il a subi un séquençage complet (*P. trichocarpa*) mais également de par son intérêt économique. En effet, sa croissance rapide est un atout pour l'industrie papetière, le bois énergie ou le bois de construction à faible valeur.

Jusqu'à aujourd'hui, les cultures intensives de peupliers (ou populiculture) sont majoritairement pratiquées sur les plaines alluviales ou des zones où la ressource eau n'est pas un facteur limitant. Néanmoins, l'augmentation des événements climatiques extrêmes (canicule, sécheresse) prévue à moyen et à long termes dans le cadre du changement climatique global (IPCC, 2014) pourrait avoir comme conséquence une baisse de la productivité des cultures futures notamment dans les zones hors vallées. Aussi, l'enjeu des travaux de sélection génétique aujourd'hui est de parvenir à sélectionner des génotypes qui puissent avoir une productivité égale dans des situations de stress plus élevés. L'intérêt est donc d'avoir un maximum d'informations génétiques qui puissent orienter les choix futurs avec le maximum d'outils en main.

5) Objectifs de recherches

L'acide abscissique (ABA) est depuis longtemps admis comme étant le médiateur de la fermeture stomatique en situation de sécheresse édaphique. Chez les plantes, la production d'ABA est concentrée au niveau du parenchyme des racines et des feuilles matures.

Réagissant à une augmentation de pH dans le sol et donc à un sol plus sec, c'est au sein des racines que la biosynthèse de l'ABA est la plus forte. Cela paraît logique compte tenu du fait que ce sont les racines le premier percepteur d'une sécheresse édaphique.

Si la molécule d'ABA est le signal principal d'une sécheresse et qu'elle induit une fermeture stomatique une fois arrivée dans sa zone d'action (la feuille), elle peut également être « stockée » au sein de la feuille dans le compartiment apoplastique une fois la sécheresse précédente finie.

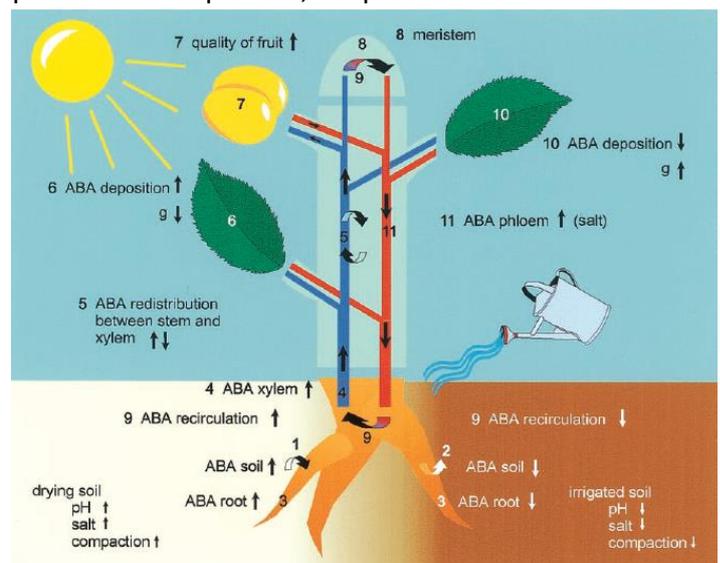


Figure 1 : Illustration du trajet d'ABA dans les différents compartiments de l'arbre et dans le sol (d'après Sauter *et al.* 2001)

Une fois les premiers signes de biosynthèse d'ABA perçus, ce « réservoir » d'ABA peut alors être évacué et permettre un début de fermeture stomatique (en effet, l'arrivée des précurseurs de l'acide abscissique permet un changement de pH qui induira l'entrée de l'ABA dans le compartiment symplastique (Sauter *et al.* 2001).

Une fois ces premières molécules d'ABA présentes, la biosynthèse pourra se dérouler pleinement dans les chloroplastes où seront biosynthétisés de l'ABA supplémentaire qui induira une fermeture stomatique.

La première question à se poser est de savoir si la fermeture stomatique provoqué par l'ABA peut être provoquée au niveau des feuilles (relargage ou synthèse *de novo*) ou si ce sont les racines, organes qui perçoit une sécheresse en premier, qui sont le lieu de biosynthèse. Gowing *et al.* en 2010 ont fait des expériences dites de « split-root ». Ce procédé consistait à scinder le système racinaire d'une plante en deux, une sous stress hydrique et l'autre non, les parties aériennes n'intervenant pas dans ce cas. Un résultat était que lors d'un stress hydrique, c'est la conductance stomatique qui est affectée avant tout. De plus, celle-ci est corrélée directement à la concentration en ABA au sein de la sève brute, cet ABA_{sève brute} étant aussi corrélée aux racines. Afin d'induire une fermeture stomatique précoce lors d'une sécheresse, c'est donc l'ABA racinaire qui est primordial. Les cellules de garde ne possédant pas de plasmodesme, c'est donc l'ABA apoplastique qui est perçu en premier. Si le stress hydrique devient plus long, la synthèse d'ABA augmenterait alors dans les feuilles. Celui-ci permettrait alors la mise en place de mécanismes dits de tolérance. Cette hormone est donc directement lié à l'état hydrique du sol. Mais, jusqu'à présent très peu d'études se sont intéressées à l'hypothèse que l'ABA pourrait être synthétisée très rapidement et directement dans les cellules de garde en permettant ainsi une fermeture des stomates plus rapide et précoce chez certaines espèces ou génotypes (Koiwai *et al.* 2004; Melhorn *et al.* 2008). Le signal intervenant au niveau des cellules de garde restant hypothétique dans ce cas.

L'objectif principal de mon stage est de répondre à ce questionnement, tout en étudiant les mécanismes de réponse à la sécheresse de deux génotypes de peupliers euraméricain (un fermant ses stomates plus précocement).

Les trois questions sous-jacentes qui sont posées sont les suivantes :

- est-ce que les gènes impliqués dans la voie de biosynthèse de l'ABA sont exprimés et régulés dans les cellules de garde dans le cadre d'une sécheresse?
- si la réponse est positive, est-ce que cela se traduit par une synthèse d'ABA dans les cellules de garde?
- est-ce qu'une fermeture stomatique précoce lors d'une sécheresse pourrait être due à une synthèse d'ABA dans les cellules de garde ?

On visera donc à étudier la voie de biosynthèse de l'ABA et les gènes des enzymes en découlant.

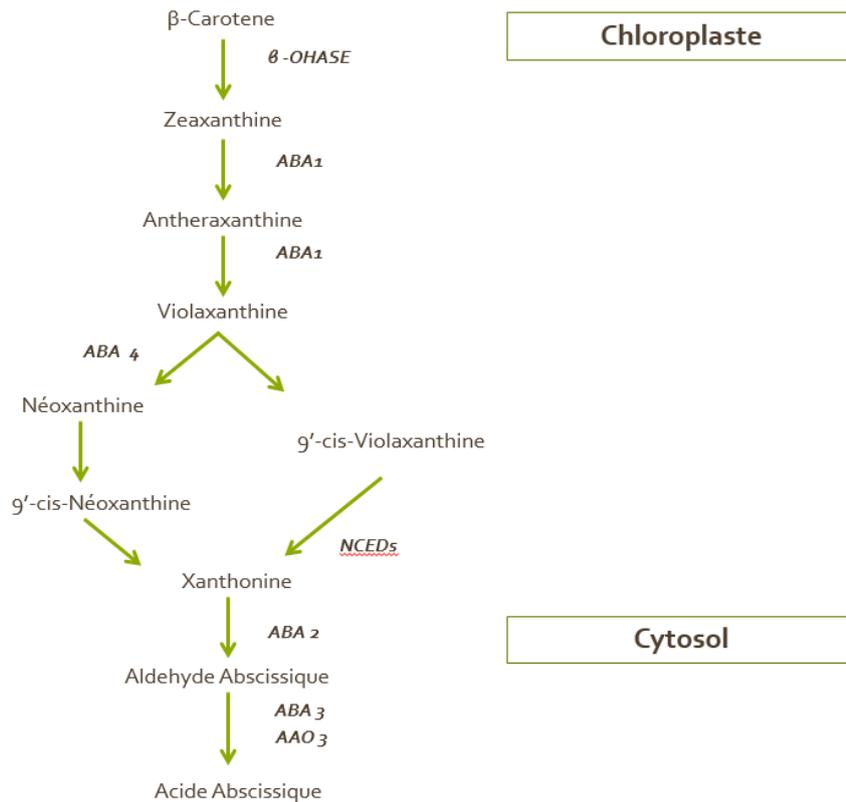


Figure 2 : Voie de biosynthèse de l'acide abscissique et gènes des enzymes impliqués.

Nous avons choisi d'étudier la voie de biosynthèse spécifique de l'acide abscissique en démarrant l'étude par la conversion du β -carotène en zéaxanthine, voie qui a été décrite chez *A. thaliana* (ref).

L'acide abscissique est un produit de clivage des caroténoïdes en C_{40} . Le β -carotène est synthétisé dans le chloroplaste à partir de deux molécules de GGPP (géranylgeranylpyrophosphate), formant un intermédiaire, le phytoène, qui après désaturation, donnera la molécule de β -Carotène. Après hydrolisation via la β -carotène hydroxylase, ce composé conduit à la formation de la zéaxanthine, premier xanthophylle spécifique de la voie de biosynthèse de l'ABA.

β -OHASE : bêta-carotène hydroxylase

ABA 1 : zéaxanthine époxydase

NCED : 9-cis époxycaroténoïde dioxygénase

ABA 2 : xanthoxine déhydrogénase

AAO : abscissique-aldéhyde oxydase

ABA 3 : cofacteur molybdène sulfurase

Une cascade de réactions est alors catalysée par des enzymes dont les gènes correspondant sont mentionnés dans le schéma ci-dessus (figure 2).

L'étape post-violaxanthine est encore soumise à controverse, c'est pourquoi nous avons choisi des gènes impliqués dans les deux voies.

Les composés passent ensuite dans le compartiment cytosolique à partir de la xanthonine. L'acide abscissique alors formée pourra aller se fixer sur ses récepteurs spécifiques et induire, dans le cas d'une sécheresse, la fermeture des stomates (Nambara et *al.* 2005).

MATERIELS ET METHODES

Cette expérimentation s'est faite au sein de l'UMR EEF (Ecologie et Ecophysiologie Forestières) dans l'équipe PhysioDiv de l'INRA (Institut National de la Recherche Agronomique).

1) Matériel végétal

Deux génotypes euraméricains (*Populus deltoides* x *Populus nigra*), **Carpaccio** et **Soligo**, ont été sélectionnés pour cette expérimentation. Ce choix s'est basé sur des expérimentations antérieures qui ont démontré que ces deux génotypes présentaient des réponses différentes face à la sécheresse.

En effet, le génotype Carpaccio est le génotype le plus tolérant à la sécheresse, se démarquant de Soligo par une fermeture stomatique plus précoce.

Les boutures des deux génotypes, provenant de la pépinière nationale de Guéméné – Penfao (Loire Atlantique), ont été plantées dans des pots de 10 litres avec comme substrat un mélange tourbe blonde et sable (50/50 v/v).

Le 13 mai 2013, un ajout d'engrais nutritive NPK aux doses 13/13/13 + 2 en magnésium a été fait à raison de 14 g par pot. L'arrosage automatique s'est fait à partir du 13 mai 2013 (à capacité au champ) au sein d'une serre à l'INRA Nancy-Lorraine.

La température de la serre est régulée à 25°C maximum.

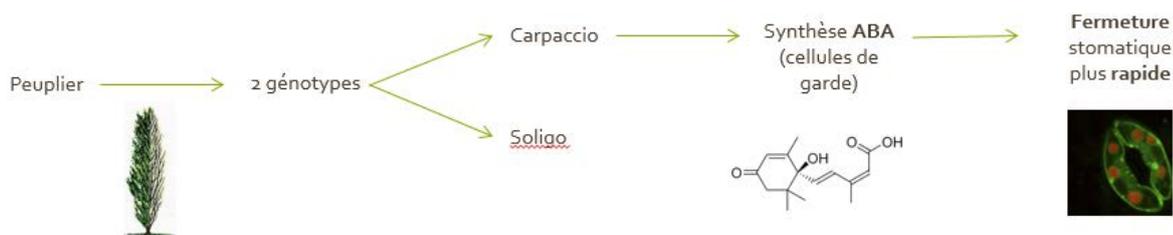


Figure 3 : Illustration du choix des deux génotypes

2) Mise en place de la sécheresse et suivi

Le plan d'expérimentation comptait 100 individus, 50 génotypes Carpaccio et 50 génotypes Soligo répartis dans une serre selon le plan suivant : Carpaccio Control – Carpaccio Sec – Soligo Control – Soligo Sec – Carpaccio Control.

6 blocs de plantes ont été disposés dans la serre de manière similaire.

L'arrêt de l'arrosage pour les plants soumis à un stress a été effectué le 9 juillet 2013 à 9h.

Le taux d'humidité du sol a été mesuré à l'aide d'un appareil TRIME-FM de la marque IMKO qui a permis de suivre l'évolution de l'humidité relative du substrat au cours du temps. Des relations ont été établies entre le poids du pot et l'humidité relative afin d'homogénéiser le niveau de sécheresse de chacun des plants (mesure toutes les 3 heures)

La sécheresse aura duré 76 heures du 9 juillet 2013 au 12 juillet 2013.

3) Mesures des échanges gazeux foliaires: assimilation nette de CO₂ et conductance stomatique à la vapeur d'eau

3.1) Présentation des mesures

Nous avons un échantillon de 24 plants pour les mesures d'échanges gazeux avec une équité répartition entre les différents génotypes (Carpaccio, Soligo) et traitement (sec ou contrôle).

Les mesures de conductance stomatique ont été effectuées lorsque les arbres avaient une hauteur de 1,30 m.

L'appareil de mesures d'échanges gazeux Li-Cor 6200 est un appareil de mesure de photosynthèse et de transpiration. C'est un système fermé permettant de mesurer des échanges gazeux sur la feuille entière. La feuille est placée dans une chambre transparente où sont mesurées la température de l'air et de la feuille ainsi que l'humidité relative. Le système portable LiCor 6200, avec une chambre de quatre litres, a été utilisé pour mesurer l'assimilation nette de CO₂ (A), la conductance stomatique à la vapeur d'eau (g_s).

La mesure de la conductance stomatique est réalisée en même temps que la mesure de la photosynthèse nette. Afin d'avoir une valeur la plus précise possible, nous avons mesuré les surfaces de feuilles utilisées pour les échanges gazeux.

3.2) Analyses statistiques :

Les données obtenues sont fixées avec une ANOVA à un facteur où l'on fixe le temps et le paramètre considéré (A, g_s ou WUE_i)

Nous avons appliqué une ANOVA pour tester les différences entre génotypes et traitements à chacun des 5 temps. Une fonction log a été appliquée afin de pouvoir être plus en accord avec les postulats de normalité voulue par l'ANOVA.

Le logiciel utilisé pour effectuer ces analyses statistiques était le logiciel R (version 3.1.1). Le seuil à partir duquel la valeur est considérée comme significative est de $p < 0.05$.

Sur chaque graphique est indiquée l'erreur standard à chaque point de mesures

4) Analyses métabolomiques

Les analyses ont été réalisées sur la plateforme de métabolomique de l'ENSAIA à l'aide d'une chromatographie en phase liquide couplée à un spectrophotomètre de masse (LCMS). Elle permet de pouvoir séparer les métabolites dans une phase mobile via le passage sur une phase stationnaire en fonction de leurs propriétés chimiques et donc de leur affinité avec la phase stationnaire.

Le plan d'expérimentation pour mener ces analyses métabolomiques est le suivant :



Figure 4 : Schéma d'expérimentation pour les analyses métabolomiques

En premier lieu, nous cherchons à tester la quantité approximative de cellules de garde à isoler afin de pouvoir être au-dessus des seuils de détection de l'ABA. En effet, aucune information n'est présente dans la littérature scientifique sur la quantité de stomates nécessaires à la détection de l'ABA afin de pouvoir doser non seulement l'acide abscissique mais également les métabolites en amont.

Nous cherchons donc à doser en parallèle des feuilles entières et de l'épiderme. Nous supposons que l'épiderme contient seulement des cellules épidermiques et des cellules de garde et que les cellules épidermiques ne contiennent pas de chloroplastes, lieu de la biosynthèse de l'ABA. Par conséquent, certains métabolites de la voie de biosynthèse de l'ABA ne devrait pas être synthétisés dans l'épiderme mais pourrait provenir d'autres compartiments de la feuille.

Comme cette partie de mon stage repose sur un postulat inconnu (le nombre de stomates nécessaire à la détection de l'ABA), il faudra donc établir un protocole en amont ainsi qu'une batterie de tests nécessaires afin de valider son efficacité.

Pour cela, nous nous basons sur le protocole établi par Zhou *et al.* (2003) qui se base sur des feuilles entières de *Brassica napus* et un dosage par LC-MS (Liquid Chromatography – Mass Spectrophotometer).

5) Microdissection des stomates et Analyses transcriptomiques

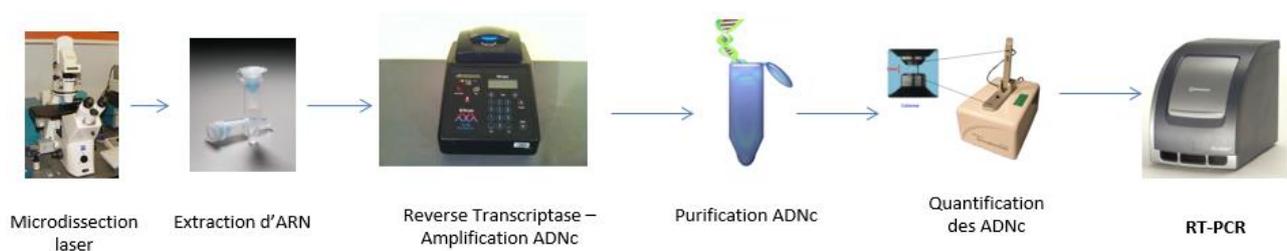


Figure 5 : Schéma d'expérimentation pour les analyses transcriptomiques

5.1) Microdissection

Lors de l'expérimentation, quatre prélèvements ont été effectués après 24, 30, 54 et 76 heures de sécheresse. A chaque temps et pour chaque génotype, une feuille mature a été prélevée sur 6 arbres « témoins » et 6 individus « stressés » (25^{ème} feuille chez Carpaccio et 17^{ème} feuille chez Soligo). Les feuilles prélevées ont été immédiatement congelées dans l'azote liquide.

Pour les analyses transcriptomiques, l'ensemble des étapes de préparations des échantillons a été réalisé comme décrit par Dumont *et al.*, 2014 : Les feuilles congelées ont été lyophilisées pendant 40h à température des plateaux de -40°C et une pression de 10 Pa. L'épiderme a été isolé en grattant la surface de la feuille avec une lame de rasoir. Les fragments ainsi obtenus ont été fixés sur une lame de verre grâce à de l'éthanol 100%. L'isolation des stomates est réalisée à partir de cette préparation. Pour chacun des 96 échantillons, 500 complexes stomatiques ont été isolés par microdissection laser en utilisant le système PALM MicroBeam (Zeiss).

5.2) Extraction d'ARN, synthèse et amplification des ADNc

L'extraction des ARN totaux de stomates ainsi que la synthèse et l'amplification des matrices ADNc ont été réalisées comme décrit par Dumont *et al.*, 2014 : Pour chaque échantillon, les ARN totaux ont été extraits à partir de 500 stomates grâce au kit « RNeasy Plus Micro Kit » (Qiagen). La transcription inverse et l'amplification des ADNc ont été réalisées sur le système Chromo4 (Bio-Rad) grâce au kit TransPlex Whole Transcriptome Amplification (Sigma) en suivant les recommandations du fabricant. Lors de l'amplification, du SYBRGreen (Sigma) est ajouté au mélange réactionnel afin de suivre en temps réel l'amplification des ADNc et de stopper la réaction 2 à 3 cycles après le début de la phase plateau de l'amplification.

Les ADNc amplifiés ont été purifiés grâce au kit QIAamp DNA Micro (Qiagen) puis quantifiés au Nanodrop (Thermo-Fischer). La concentration de chaque échantillon a été ajustée à 2,5 ng/μL.

Pour chaque génotype, 5μL de chaque échantillons d'ADNc ont été mélangés ensemble. Ce mélange a été utilisé pour réaliser une gamme de 7 points de dilution 2. Cette gamme est utilisée pour calculer l'efficacité des réactions de qPCR.

5.3) Dessin des amorces

La voie de biosynthèse de l'acide abscissique et les enzymes associées sont bien caractérisées chez *A. thaliana*. Les homologues de ces protéines ont été déterminés chez le peuplier i) à partir de la version 3.0 de l'annotation du génome de *Populus trichocarpa* disponible sur le site phytozome.com (Goodstein *et al.*, 2012), et ii) grâce aux résultats obtenus lors de l'étude phylogénétique des gènes liés au métabolisme et à la voie de signalisation de l'ABA sur 6 espèces : *P. patens*, *S. moellendorffii*, *O. sativa*, *P. trichocarpa*, *A. thaliana* et *A. lyrata* (Hanada *et al.*, 2011).

Les séquences nucléotidiques des gènes de peuplier codant ces protéines ont été chargées à partir du site www.phytozome.com et ont été utilisées pour dessiner des amorces spécifiques grâce au logiciel Primer3 (Untergasser *et al.*, 2012) avec les paramètres suivants :

- Taille des amorces égales à 20 bases
- Pourcentages de cytosine (C) et de guanine (G) ~ 50%
- Les amorces d'un même couple doivent avoir le même Tm
- $Tm \in [58 ; 62]$ au moyen de la formule suivante $Tm = (G+C) \times 4 + (A+T) \times 2$
- Taille de l'amplicon $\in [90 ; 150]$ pb
- Pas plus de 4 nucléotides identiques consécutifs
- Pas plus de 3 C ou G dans les 5 derniers nucléotides de l'extrémité 3'

Les amorces sont testées par qPCR sur des matrices ADNc et/ou ADNg de *Carpaccio*, de Soligo et de *P. trichocarpa* utilisé comme témoin positif. La courbe de dissociation obtenue après les cycles d'amplification est utilisée pour vérifier que les amorces ne permettent d'amplifier qu'un seul fragment. Les produits PCR sont ensuite séquencés (Beckman coulter genomic, G-B) et leurs séquences sont alignées sur le génome de *P. trichocarpa* par BLASTn pour vérifier la spécificité des amorces.

Les séquences des amorces sont présentées dans l'annexe 2.

5.4) PCR quantitative en temps réel

Réalisée sur le système Mx3000P QPCR (Agilent), le protocole a été suivi selon les recommandations du constructeur, c'est-à-dire 5 min à 95°C suivi de 40 cycles de 5 sec à 95°C et 20 sec à 60°C. Enfin, une courbe de dissociation est obtenue après les cycles d'amplification.

Pour chaque réaction, le mélange était constitué de :

- 10 µL de Brilliant III Ultrafast SYBR green QPCR Master mix (Agilent)
- 0.5 µL de mix d'amorces sens et antisens (10µM chacune) :
- 0.3 µL de Rox (Agilent) dilué au 1/500 ème
- 4.2 µL d'eau ultra pure (nuclease free)
- 5 µL d'ADNc amplifié (à 2,5 ng/µL)

Trois réplicats de gamme ont été faits pour chaque gène afin d'estimer l'efficacité de chaque réaction de qPCR.

Les valeurs de Ct ont été caractérisées pour un même seuil en considérant l'ensemble des PCR.

Les expressions de gènes d'intérêt ont été normalisées par l'utilisation de gènes de référence : ceux-ci sont GOGAT6, OST26 et GLR2 (testés sur GeNorm, Vandesompele *et al.* 2007).

5.5) Prédiction de la localisation subcellulaire et de la topologie des protéines

Les séquences protéiques correspondant aux gènes d'intérêt ainsi que leurs homologues chez *A. thaliana* ont été chargées à partir du site www.phytozome.com et ont été soumises à 2 logiciels en ligne de prédiction de localisation subcellulaire : TargetP 1.1 (Emanuelsson *et al.*, 2000) et MultiLoc2 (Blum *et al.*, 2009), ainsi qu'à deux logiciels de prédiction d'hélice transmembranaire : TMHMM 2.0 (www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/), et Phobius (Käll *et al.*, 2004).

Les résultats concernant les protéines de *P. trichocarpa* sont présentés dans le tableau 2 et ceux concernant *A. thaliana* sont présentés dans l'annexe 3.

5.6) Analyses statistiques :

Les données obtenues sont fixées avec une ANOVA à deux facteurs où l'on fixe le temps, le gène et où les variables sont les génotypes et le traitement.

Nous avons appliqué une ANOVA ($x = \mu + \text{génotype} + \text{traitement} + \epsilon$, où x correspond au trait, μ à la moyenne générale, « génotype » et « traitement » sont des effets testés et ϵ est l'erreur résiduelle) pour tester les différences entre génotypes et traitements à chacun des 4 temps. Une fonction log

a été appliquée afin de pouvoir être plus en accord avec les postulats de normalité voulue par l'ANOVA.

Le logiciel utilisé pour effectuer ces analyses statistiques était le logiciel R (version 3.1.1) ainsi que le logiciel STATISTICA. Le seuil à partir duquel la valeur est considérée comme significative est de $p < 0.05$.

Un tableau de corrélation a été construit à partir du logiciel STATISTICA afin de pouvoir signifier des corrélations entre chaque gène.

Sur chaque graphique est indiquée l'erreur standard à chaque point de mesures.

RESULTATS

1) Mise en place de la sécheresse

Grâce aux campagnes de mesures effectuées, nous avons pu suivre l'évolution de la sécheresse au cours du temps (Figure 6). Nous pouvons voir que l'évolution de l'humidité dans le sol est la même pour les deux génotypes. Nous observons que, durant la totalité de l'expérimentation, la décroissance de l'humidité relative suit une pente linéaire ($y = 67.463x + 7541.3$, $R^2=0.9905$) avec des variations correspondant aux changements journaliers (plus forte décroissance lors de la mi-journée). Les plants contrôles sont maintenus à 90 % de leur capacité au champ, soit une humidité de 35 % environ.

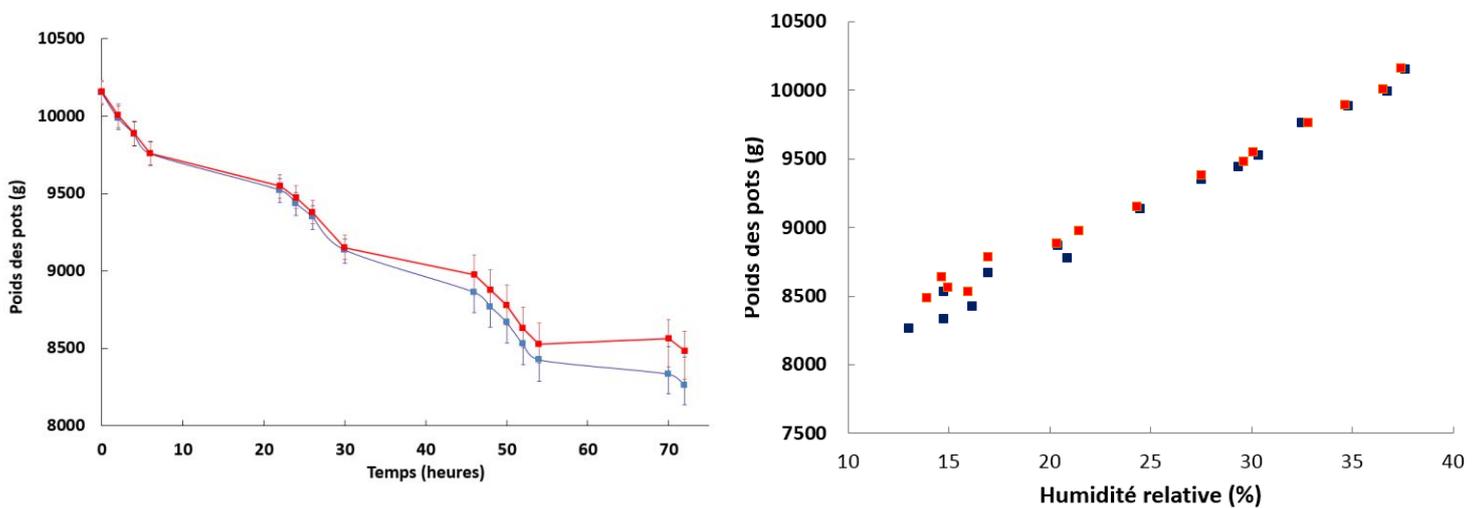


Figure 6 : Evolution du poids des pots au cours du temps et en fonction de l'humidité relative pour les génotypes Carpaccio (rouge) et Soligo (bleu)

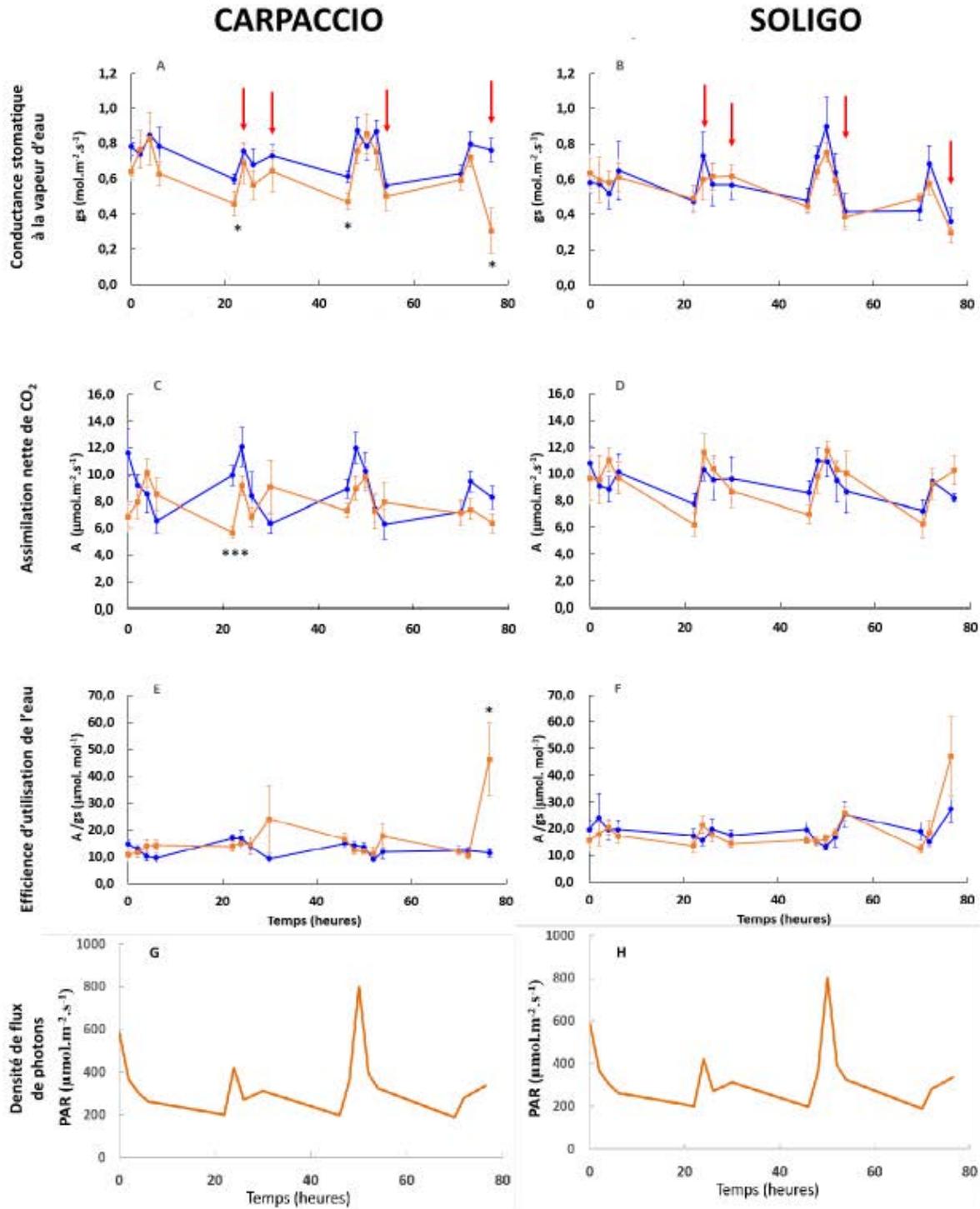


Figure 7 : Evolution au cours du temps (contrôles en bleu et sec en noir) de la conductance stomatique à la vapeur d'eau, g_s (A, B), de l'assimilation nette de CO_2 , A (C, D) et de l'efficacité d'utilisation de l'eau intrinsèque, WUE_i , sur Carpaccio (A, C, E) et Soligo (B, D, F) Evolution du niveau d'éclairage dans la serre au cours de l'expérimentation (G,H) Les effets du traitement ont été traités avec une ANOVA à un facteur et son libellés par * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ ou *** $p < 0,001$ Les flèches rouges indiquent les temps de prélèvement des feuilles utilisées pour les analyses transcriptomiques et métabolomiques

Sur la figure 6, nous pouvons voir l'évolution des poids des pots en fonction de l'humidité relative. Nous pouvons constater qu'une fois arrivé à une humidité relative basse (15-20%), qui correspond à la fin de l'expérimentation, le génotype Carpaccio stabilise son poids autour de 8500 g tandis que le génotype Soligo continue à baisser indiquant une diminution plus précoce de la transpiration chez Carpaccio.

2) Echanges gazeux foliaires

12 campagnes de mesures ont été effectuées durant les 76 heures de l'expérimentation. Elles ont été faites sur les deux génotypes et sous les deux conditions de traitement. La figure 7 montre l'évolution de la conductance stomatique à la vapeur d'eau (g_s), l'assimilation nette de CO_2 et l'efficacité d'utilisation de l'eau intrinsèque (A/g_s) au cours du temps ainsi que les variations du niveau d'éclairement dans la serre. Les fluctuations au cours du temps de ces trois paramètres pouvant être corrélées aux changements du niveau d'éclairement au cours des différentes mesures.

2.1) Suivi de l'assimilation nette de CO_2 (A)

Nous pouvons voir de nombreuses fluctuations au sein des deux génotypes avec néanmoins une tendance des plants contrôles à avoir une assimilation supérieure aux plants secs (3 temps sont significativement différents chez Carpaccio et aucun chez Soligo)

Les deux génotypes présentent des assimilations se situant dans une gamme comparable ($6-12 \mu\text{mol } CO_2 \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$).

Néanmoins, ces différences ne permettent pas d'affirmer une réelle différence entre les plants soumis à un stress hydrique et les témoins. En outre, si l'on se base sur les données recueillies au cours de cette étude et sur les tests statistiques appliqués à celles-ci, on peut dire qu'il n'y a pas de différence significative ($p < 0.05$) entre les deux génotypes.

2.2) Suivi de la conductance stomatique à la vapeur d'eau (g_s)

De même que pour l'assimilation nette de CO_2 , les courbes de suivi de la conductance stomatique pour les 2 génotypes de peuplier ont une allure très semblable. Celles-ci oscillent au cours du temps et se situent dans des gammes égales ($0.4-0.8 \text{ mol } m^{-2} s^{-1}$)

Néanmoins, une valeur intéressante à signaler se situe à 76 heures après le début de la sécheresse où le génotype Carpaccio présente une baisse significativement très marquée de sa conductance.

2.3) Suivi de l'efficacité d'utilisation de l'eau (WUEi)

L'évolution de l'efficacité d'utilisation de l'eau suit la même dynamique chez les deux génotypes.

Les deux génotypes présentent des efficacités se situant dans des gammes similaires ($10-25 \mu\text{mol } CO_2 \text{ mol } H_2O$) si l'on ne compte pas le dernier point de mesures.

A 76 heures, en situation de sécheresse, Carpaccio présente une très forte augmentation significative due à la forte baisse de sa conductance.

3) Analyses transcriptomiques

3.1) Recherche de gènes candidats pour la voie de biosynthèse de l'acide abscissique

Fonction	<i>A. thaliana</i>		% similarité	<i>P. trichocarpa</i>	
	Gène (a)	Locus		Gène model (b)	nom des gènes (c)
zeaxanthin epoxidase	ABA1	AT5G67030	80,1	Potri.005G138400 *	ABA1.1
			77,1	Potri.007G044300 *	ABA1.2
			47,7	Potri.001G229100	ABA1.L
Inconnue. Impliquée dans la biosynthèse de neoxanthine, n'a pas d'activité catalytique	ABA4	AT1G67080	70,9	Potri.004G099500 *	ABA4.1
			63,2	Potri.017G114900*	ABA4.2
9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase	ATNCED3	AT3G14440	78,3	Potri.001G393800 *	NCED3.1
			78,8	Potri.011G112400 *	NCED3.2
			-	-	-
			76,2/71 73,5/67,6	Potri.011G084100 * Potri.T074400 *	NCED5.1 NCED5.2
	ATNCED9	AT1G78390	-	-	-
	ATNCED5/ATNCED2	AT1G30100/AT4G18350	74	Potri.003G176300 *	NCED6
	ATNCED6	AT3G24220	74	Potri.003G176300 *	NCED6
Xanthoxin dehydrogenase	ABA2	AT1G52340	74	Potri.001G024300 *	ABA2
molybdenum cofactor sulfurase	ABA3	AT1G16540	75,8	Potri.007G066400	ABA3
abscisic-aldehyde oxidase	AAO3	AT2G27150	78,5	Potri.009G153800 *	AAO3.1
			77,5	Potri.009G153600 *	AAO3.2
			77,3	Potri.004G191300 *	AAO3.3
			48	Potri.009G054600	AAO3.L
beta-carotene hydroxylase	BETA-OHASE 2/BETA-OHASE 1	AT5G52570/AT4G25700	71,3/69,7	Potri.004G074000	BOHASE1
			75,6/74,8	Potri.017G145700	BOHASE2
			70,6/65,2	Potri.001G100200	BOHASE3

Tableau 1 : orthologues d'*A. thaliana* chez *P. trichocarpa*

Chez *A. thaliana*, 12 protéines ont été caractérisées comme étant impliquées dans la voie de biosynthèse de l'ABA. Onze de ces protéines sont des enzymes, seul ABA4 qui est impliquée dans la synthèse de néoxanthine, n'a pas d'activité catalytique (North *et al.*, 2007). Le nom des gènes codant ces protéines sont répertoriés dans le tableau 1. Sur la base d'une forte homologie de séquence, 19 protéines homologues ont été trouvées chez le peuplier. Les gènes codant ces protéines sont listés dans le tableau 1. Aucun orthologue d'AtNCED9 n'a été trouvé chez le *P. trichocarpa*. Ce gène a été « perdu » au cours de l'évolution chez le peuplier (Hanada *et al.*, 2011).

En 2011, Hanada *et al.*, ont étudié la phylogénie des gènes liés au métabolisme de l'ABA chez 6 espèces : *P. patens*, *S. moellendorffii*, *O. sativa*, *P. trichocarpa*, *A. thaliana* et *A. lyrata*. Pour le peuplier, cette analyse s'appuyait sur la version v2.0 de l'annotation du génome de *P. trichocarpa* et n'incluait ni les β -carotène hydroxylases et ni la molybdenum cofactor sulfurase. Pour les autres protéines, cette étude phylogénétique valide les homologues du peuplier sélectionnés pour la présente étude (notés avec un astérisque dans le tableau 1). Les gènes Potri.001G229100 et Potri.009G054600 ont été conservés dans la liste des gènes candidats bien que les protéines qu'ils codent présentent une plus faible similarité (~48%) avec celles d'*A. thaliana*. Ces gènes ont été nommés *ABA1.L* et *AAO3.L* (pour *ABA1.Like* et *AAO3.Like*). La nomenclature des autres gènes de peuplier (tableau 1) s'appuie sur la phylogénie établie par Hanada *et al.*, (2011).

	Localisation subcellulaire				Domaine transmembranaire	
	TargetP 1.1		MultiLoc		TMHMM	PHOBIUS
	Localisation	RC	Localisation	P		
BOHASE1	Chloroplaste	5	Chloroplaste	0,64	4	4
BOHASE2	Autre	2	Cytoplasme	0,62	3	4
BOHASE3	Chloroplaste	3	Chloroplaste	0,89	4	4
ABA1.1	Chloroplaste	3	Chloroplaste	0,82	1	1
ABA1.2	Chloroplaste	2	Chloroplaste	0,84	-	1
ABA1.L	Mitochondrie	4	Mitochondrie	0,84	1	2
ABA4.1	Secretory pathway	2	Extra Cellulaire	0,5	3	3
ABA4.2	Autre	2	Cytoplasme	0,64	1	3
NCED3.1	Chloroplaste	2	Chloroplaste	0,55	-	-
NCED3.2	Chloroplaste	1	Chloroplaste	0,53	-	-
NCED5.1	Chloroplaste	3	Chloroplaste	0,6	-	-
NCED5.2	Chloroplaste	5	Cytoplasme	0,77	-	-
NCED6	Chloroplaste	2	Chloroplaste	0,74	-	-
ABA2	Autre	4	Peroxisome	0,52	-	-
ABA3	Autre	1	Peroxisome	0,6	-	-
AAO3.1	Autre	3	Cytoplasme	0,74	-	-
AAO3.2	Autre	5	Cytoplasme	0,7	-	-
AAO3.3	Autre	2	Cytoplasme	0,72	-	-
AAO3.L	Autre	2	Cytoplasme	0,74	-	-

Tableau 2 : Prédiction de la localisation subcellulaire et du nombre d'hélices transmembranaires des enzymes putativement impliquées dans la biosynthèse d'ABA chez le peuplier. RC (Reliability Class, $1 \leq RC \leq 5$) exprime la fiabilité de la prédiction de TargetP1.1 (plus la valeur de RC est faible, plus sûre est la prédiction). P ($0 \leq P \leq 1$) représente le score associé à la prédiction de MultiLoc (plus la valeur de P est forte, plus la prédiction est fiable).

Dans la voie de biosynthèse de l'ABA, les premières étapes menant à la synthèse de xanthoxine ont lieu dans le chloroplaste (figure 2). L'analyse des séquences protéiques des enzymes impliquées dans ces étapes a permis de prédire que β -OHASE 1, β -OHASE 3, ABA 1.1, ABA 1.2 et toutes les NCEDs sont localisées dans le chloroplaste (tableau 2). Étonnamment, les logiciels TargetP et MultiLoc prédisent qu'ABA4.1 serait sécrétée et qu'ABA4.2 serait cytoplasmique. De plus, les protéines ABA4.1 et ABA4.2 contiendraient 3 domaines transmembranaires. Un 4ème domaine est prédit pour les deux protéines par le logiciel PHOBIUS mais avec une plus faible probabilité. Chez *A. thaliana*, il a été montré que ABA4 contient 4 hélices transmembranaires et est localisée dans les membranes de l'enveloppe des chloroplastes (Ferro *et al.*, 2003 et North *et al.*, 2007). De la même manière, les 3 β -carotène hydroxylases du peuplier seraient composées de 4 domaines transmembranaires comme leurs homologues β -OHASE1 et β -OHASE2 chez *A. thaliana* qui pourraient également être localisées dans les membranes de l'enveloppe chloroplastique (Ferro *et al.*, 2002).

Les deux dernières étapes conduisant à la synthèse d'ABA à partir de la xanthoxine ont lieu dans le cytosol. La localisation cytoplasmique des AAO3s du peuplier prédite par l'analyse bio-informatique des séquences protéiques est en accord avec cela. De manière surprenante, la prédiction de la localisation des xanthoxine dehydrogenases (ABA2) et des molybdène cofacteur sulfurases (ABA3) d'*A. thaliana* (Annexe 3) et de *P. trichocarpa* est peroxysomale (tableau 2), mais aucune donnée bibliographique ne corrobore cela. Chez *A. thaliana*, ABA2 a été localisée dans le cytosol grâce à une protéine recombinante ABA2-GFP (Cheng *et al.*, 2002).

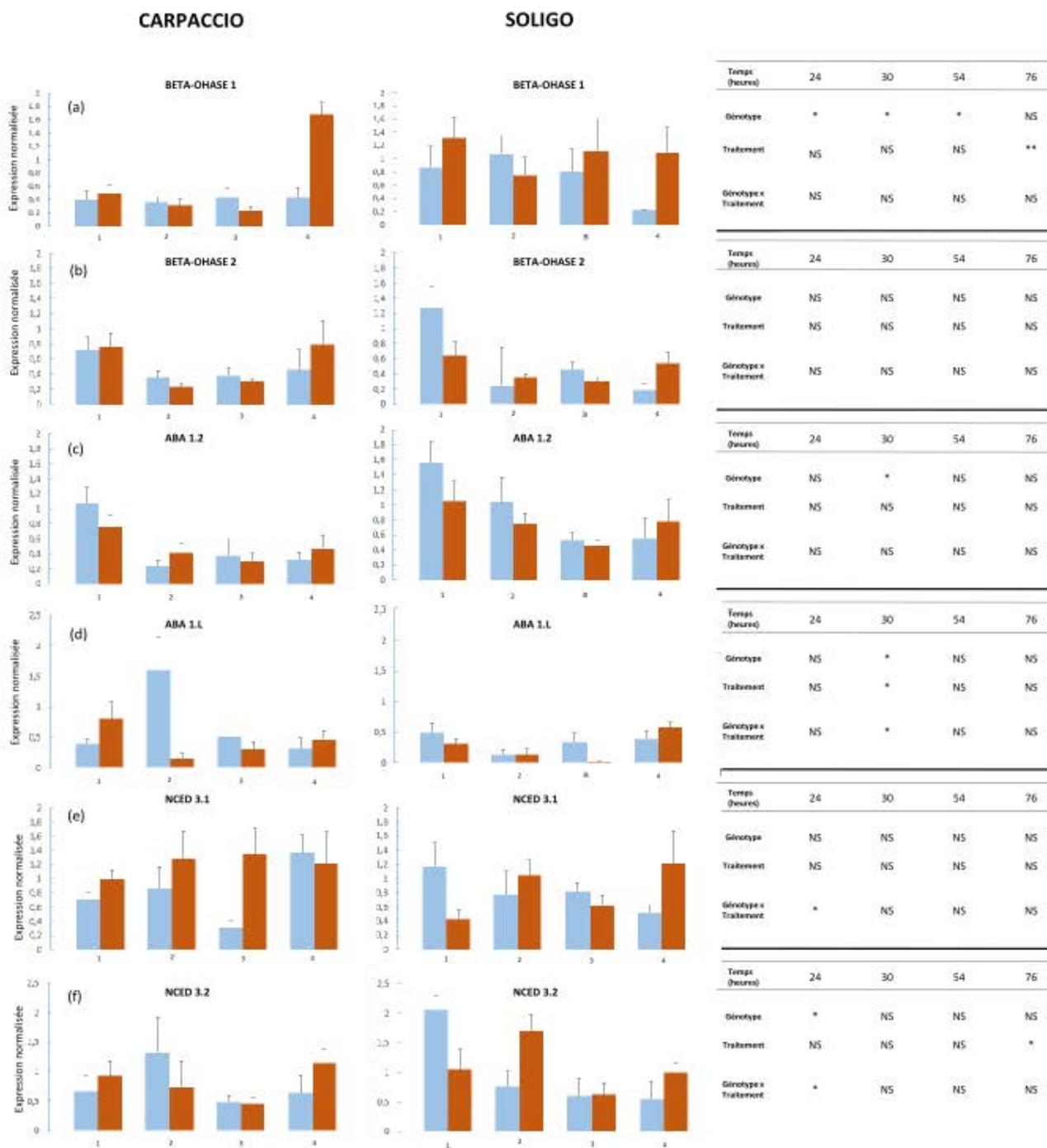


Figure 8 : Effet de la sécheresse sur l'expression de gènes candidats (moyenne + erreur standard) d'enzymes chloroplastiques sur bêta-carotène hydroxylase 1 (a) et 2 (b), zéaxanthine epoxidase (c,d), 9-cis epoxy-caroténoïde dioxygénase (e,f) sur deux génotypes de peupliers, Carpaccio et Soligo à 4 heures différentes (24 (1), 30 (2), 54 (3) et 76 (4) heures). Les effets traitement, génotype et leur interaction ont été testés avec une ANOVA à deux facteurs et sont libellés par * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, NS = non significatif

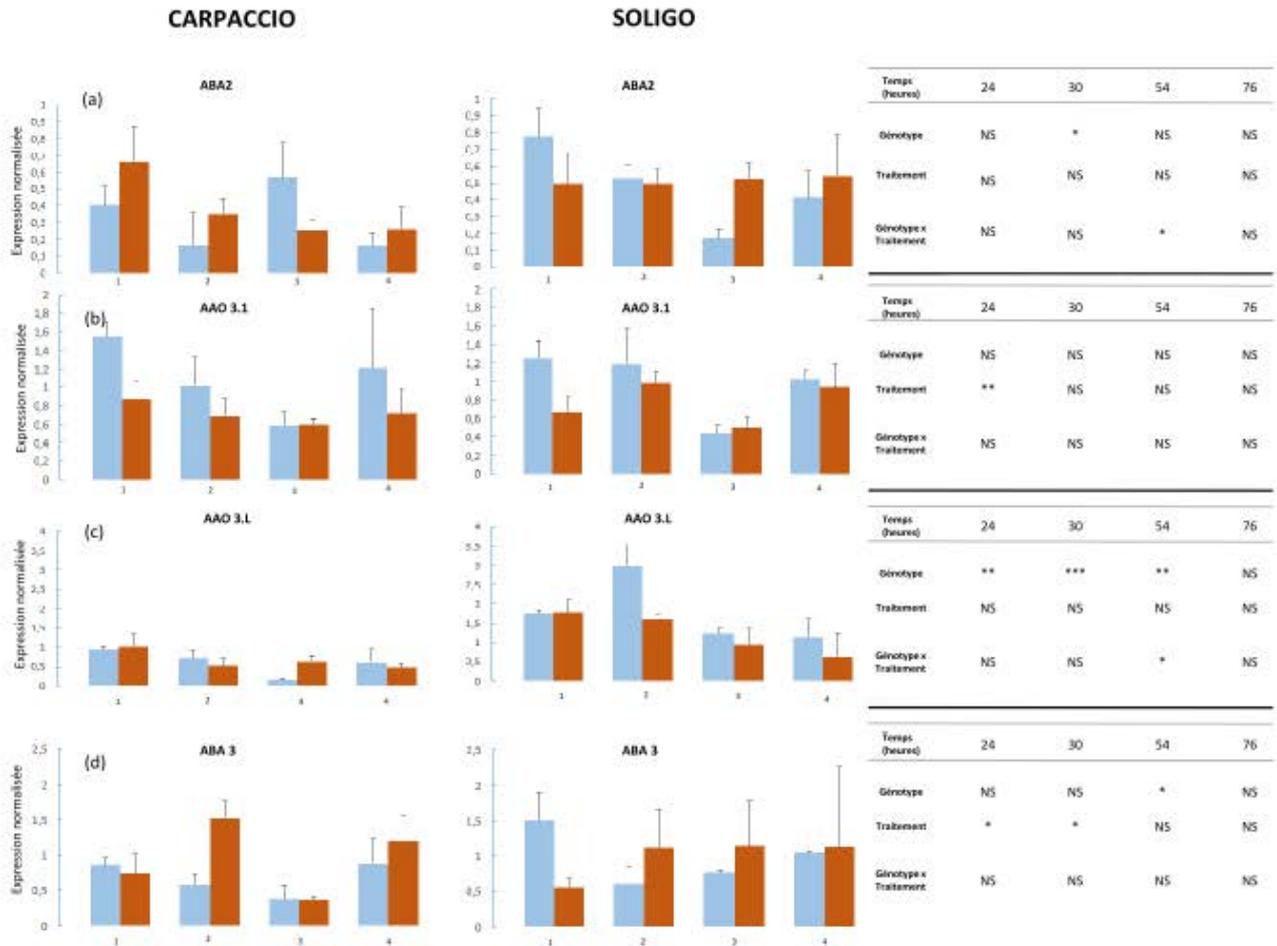


Figure 9 : Effet de la sécheresse sur l'expression de gènes candidats (moyenne + erreur standard) d'enzymes cytosoliques sur xanthoxine déhydrogénase (a), aldéhyde-abcissique oxydase (b, c) et molybdène cofacteur sulfurase sur deux génotypes de peupliers, Carpaccio et Soligo à 4 heures différentes (24 (1), 30 (2), 54 (3) et 76 (4) heures). L'effet traitement, génotype et leur interaction ont été testés avec une ANOVA à deux facteurs et sont libellés par * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, NS = non significatif

3.2) Evolution des expressions normalisées au cours du temps

Pour les 19 gènes candidats considérés (tableau 1), seule l'expression d'AAO3.2 n'a pu être quantifiée par qPCR. En effet, il n'a pas été possible de dessiner un couple d'amorces spécifiques et efficaces pour ce gène. De plus, les séquences nucléotidiques des gènes *NCED5.1* et *NCED5.2* étant à 99.7% identiques, il n'a pas été possible de dessiner des couples d'amorces discriminant les 2 transcrits. Un seul couple d'amorce ciblant les deux transcrits a donc été dessiné. Au final, 17 couples d'amorces ont été validés techniquement. Toutefois, les amorces ciblant les transcrits de β -OHASE3, *NCED5.1/NCED5.2*, *NCED6*, *ABA1.1*, *ABA4.1*, *ABA4.2* et *AAO3.3* n'ont pas permis de détecter l'expression de ces gènes dans les stomates.

Les résultats présentés dans les figures 8 et 9 ne concerne donc que l'expression des gènes β -OHASE1, β -OHASE2, *ABA1.2*, *ABA1.L*, *NCED 3.1*, *NCED 3.2*, *ABA2*, *AAO 3.L*, *AAO 3.1* et *ABA3*.

Sur les figures 8 et 9 sont représentées les expressions normalisées de chacun de ses 10 gènes sélectionnés au niveau du chloroplaste et du cytosol respectivement. Les résultats statistiques sont présentés en vis-à-vis de ces graphiques.

Nous pouvons constater un effet génotype significatif pour les temps 1, 2 et 3 (plus forte induction chez Soligo) pour β -OHASE 1 mais également un effet traitement significatif au temps 4, traduisant une augmentation de l'expression sous sécheresse chez les deux génotypes.

Même si les effets ne sont pas statistiquement significatifs, l'expression du gène *NCED 3.1* au temps 3 chez Carpaccio est plus importante dans le cas des individus stressés. Ce même comportement est présent chez Soligo au temps 4.

L'expression du gène *NCED 3.2* augmente avec le niveau de sécheresse (temps 4) chez Carpaccio et Soligo.

Variable	$r \geq$									
	-1	-0.80	-0.60	-0.40	-0.20	0	0.20	0.40	0.60	0.80
AAO3.L	1,000000	0,203763	0,354689	-0,138366	0,312523	0,115115	0,286349	0,215751	0,191207	0,270633
AAO3.1		1,000000	0,399128	-0,061163	0,167735	0,273126	0,093035	0,051106	-0,217785	0,061471
ABA1.2			1,000000	-0,002478	0,382233	0,054862	0,170116	0,646385	-0,088266	0,231420
ABA1.L				1,000000	-0,092610	-0,160439	-0,294677	-0,045155	0,106794	0,013105
ABA2					1,000000	0,034704	0,220090	0,415840	-0,067797	0,302167
ABA3						1,000000	0,024805	-0,091509	-0,103972	-0,085337
B-OHASE1							1,000000	0,331657	0,060305	0,201383
B-OHASE2								1,000000	0,089593	0,391608
NCED3.1									1,000000	0,047283
NCED3.2										1,000000

Tableau 3 : Tableau de corrélation entre les gènes des enzymes responsables de la voie de biosynthèse de l'acide abscissique

Le tableau 3 présente les corrélations entre les expressions des gènes responsables de la voie de biosynthèse de l'acide abscissique. Une valeur de R=1 indique deux gènes qui sont très positivement corrélés tandis qu'une valeur de R=-1 traduit une corrélation très négative.

Plusieurs gènes semblent être corrélés positivement entre eux, notamment *ABA 1.2* et β -OHASE 2 avec une valeur de R=0.64. β -OHASE 1 et *ABA 1.L* semblent eux être négativement corrélés entre eux.

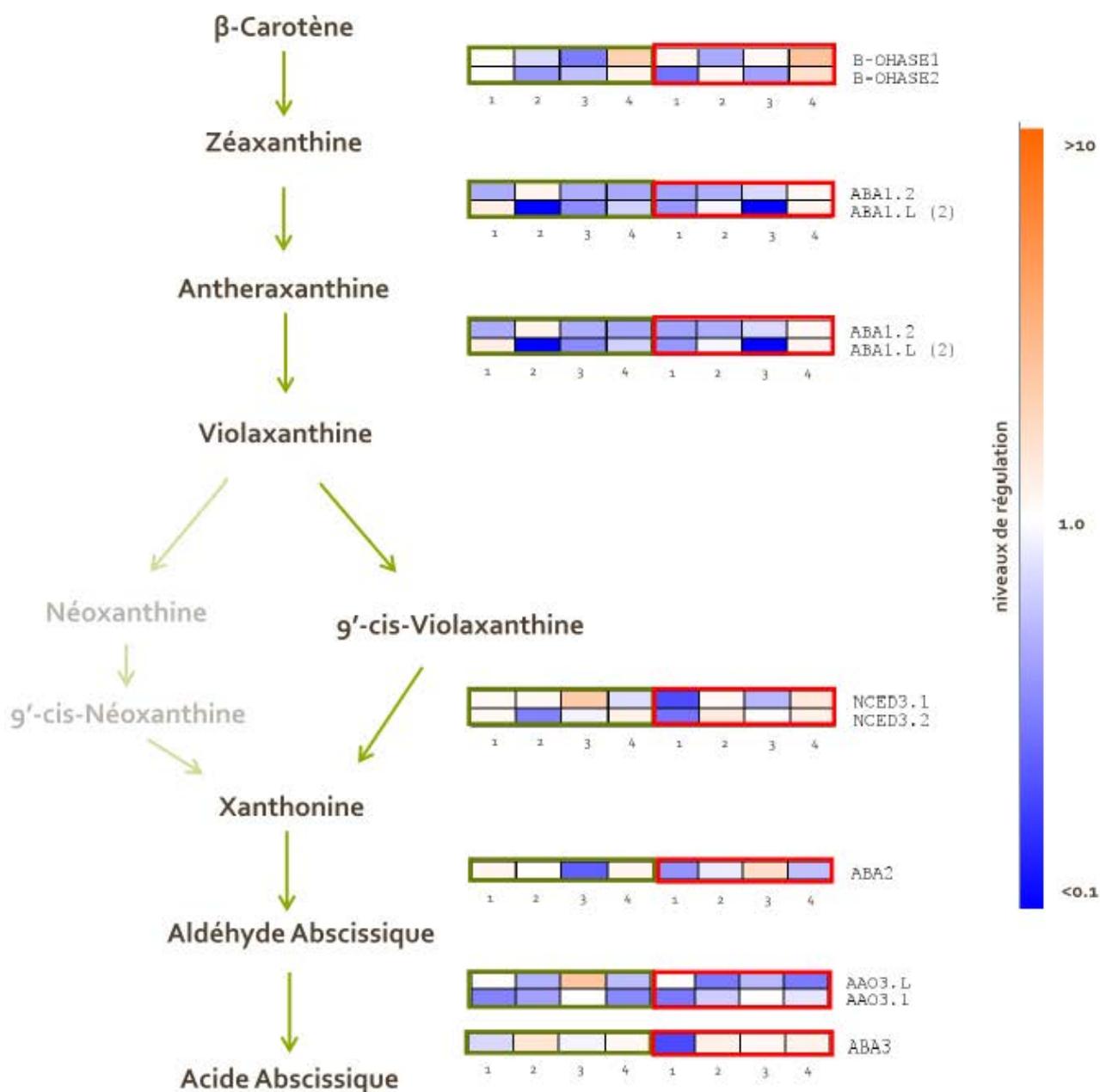


Figure 10 : Heat maps représentant les niveaux de régulation (expression des secs / expression des témoins) de gènes candidats d'enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse de l'acide abscissique sur deux génotypes, Carpaccio (encadré vert) et Soligo (encadré rouge) à 4 temps (1, 2, 3 et 4 correspondant respectivement à 24, 30, 54 et 76 heures après le début de la sécheresse)

La figure 10 représente une Heat Map symbolisant les niveaux de régulation (obtenus avec le rapport niveau d'expression de l'individu stressé sur le niveau d'expression de l'individu témoin). Nous pouvons constater que la plupart des gènes sont régulés au cours du temps notamment *B-OHASE 1/2* (Carpaccio et Soligo) dont la régulation est plus importante au temps 4. Les gènes *NCED 3.1* et *NCED 3.2* présentent également une évolution de leurs niveaux de régulation. En effet, l'expression de *NCED 3.1* atteste une augmentation de +1.8 du temps 1 au temps 4.

4) Analyses métabolomiques

La durée du stage ne m'a pas permis d'aller au bout de cette partie. Je fais donc le choix de présenter en annexe 1 les premières étapes de l'élaboration du protocole de dosage de l'acide abscissique et de ses métabolites.

DISCUSSION / CONCLUSION / PERSPECTIVES

L'efficacité d'utilisation de l'eau intrinsèque, qui est le rapport de l'assimilation nette de CO₂ sur la conductance stomatique à la vapeur d'eau, peut être modulée par une sécheresse édaphique (Guehl *et al.*, 1994). C'est un paramètre important utilisé pour établir un lien entre production de bois et gestion de l'eau (Richard *et al.*, 2002). Les corrélations existantes entre gain de carbone et perte en eau au niveau foliaire dépendent de l'influence de chacune de ses composantes, A et g_s (Farquhar *et al.* 1989). Néanmoins, il est souvent délicat de pouvoir dissocier l'effet spécifique de ces deux composantes sur l'efficacité d'utilisation de l'eau. En effet, A et g_s sont positivement corrélées (Lauteri *et al.* 1997 ; Roupsard *et al.* 2002 ; Monclus *et al.* 2006).

Monclus *et al.* (2006) ont trouvé des efficacités d'utilisation de l'eau chez *Populus deltoides* x *Populus nigra* de 25 μmol mol⁻¹, ce qui correspond avec nos valeurs de WUE_i qui sont comprises entre 10 et 25 μmol mol⁻¹.

A la fin de notre expérimentation (t > 70 heures après le début de la sécheresse), la conductance du génotype Carpaccio a chuté de manière significative, impliquant alors l'augmentation significative de l'efficacité d'utilisation de l'eau intrinsèque. Cela ne se retrouve pas chez le génotype Soligo. Par conséquent notre postulat de départ est confirmé, à savoir que les deux génotypes présentent des comportements différents face à un stress hydrique.

Permettant de limiter les pertes en eau par évapotranspiration, l'ABA est défini comme un régulateur en réponse à un stress hydrique (Kwak *et al.* 2008). En effet, cette phytohormone permet de moduler de nombreux processus physiologiques chez les espèces végétales comme l'ouverture-fermeture des stomates (Tardieu *et al.* 2010). La fermeture des stomates conduisant à réduire l'activité photosynthétique globale.

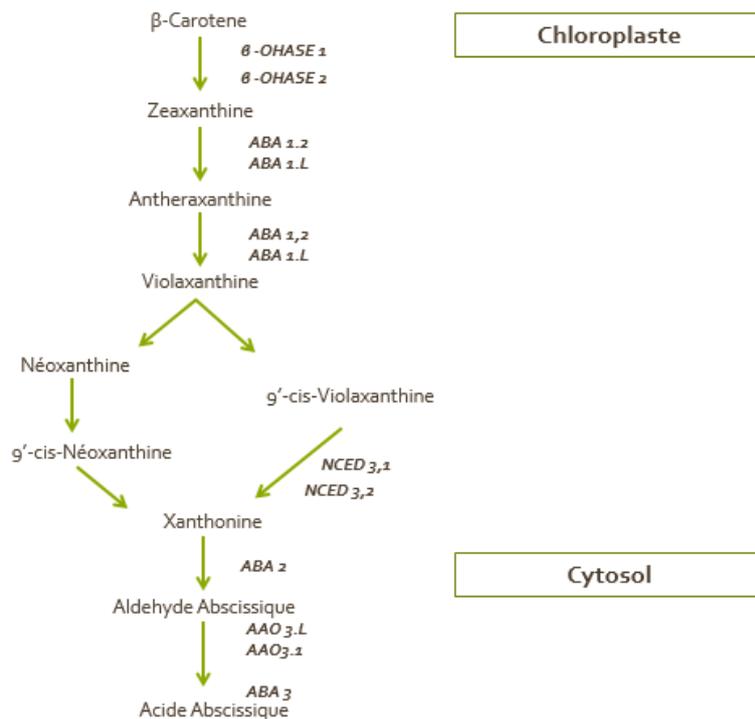


Figure 11 : Voie de biosynthèse de l'ABA version finale

Comme on peut le constater sur la figure 11, la voie alternative post-violaxanthine *via* la néoxanthine n'a pas pu être étudiée. En effet, les deux gènes d'enzymes responsables de la conversion de la violaxanthine en néoxanthine que nous avons sélectionnés n'ont pas fonctionnés. Cela peut être dû à un défaut fonctionnel, c'est-à-dire que la voie de la 9'-cis-violaxanthine soit privilégiée, ou à un problème technique. A l'heure d'écrire ce rapport, cela n'a pas encore abouti à une réponse claire. Des études postérieures tenteront d'y répondre.

En premier lieu, nous pouvons dire que l'expression de certains gènes ont été plus impactés que d'autres par la sécheresse.

Certains gènes sont corrélés positivement entre eux (voir tableau 2). Ainsi, *β-OHASE 2* est corrélé à 65 % avec *ABA 1.2*, gène suivant dans la voie de biosynthèse. Ceci démontrant que la plante réagit à la sécheresse activant positivement les gènes de la voie de biosynthèse de l'ABA.

L'étape suivante dans la voie de biosynthèse est le clivage de la 9'-cis-violaxanthine en xanthonine via l'action des NCEDs.

D'après Thompson *et al.* (2000), la seule expression des protéines NCED est suffisante pour induire la synthèse d'ABA dans les tissus où cette enzyme est fonctionnelle. Les xanthophylles forment un pool important de précurseurs (surtout dans les tissus photosynthétiques) et par conséquent, ces composés ne peuvent, *a priori*, pas être limitants. C'est pourquoi cette étape de clivage a été proposée comme étape clé de la voie de régulation de la synthèse de l'ABA.

NCED3 a été décrit comme le gène majeur de la réponse des parties aériennes au stress hydrique (Iuchi *et al.*, 2001; Tan *et al.*, 2003). Dans notre expérimentation, l'expression des gènes de *NCED3* est régulée positivement de manière significative au temps 3 ou 4 chez les deux génotypes pouvant

amener à la synthèse d'ABA. Il est à remarquer que cette expression est plus précoce chez Carpaccio (temps 3) que chez Soligo (temps 4), nous amenant à mettre en relation ce résultat avec celui d'une fermeture stomatique plus précoce.

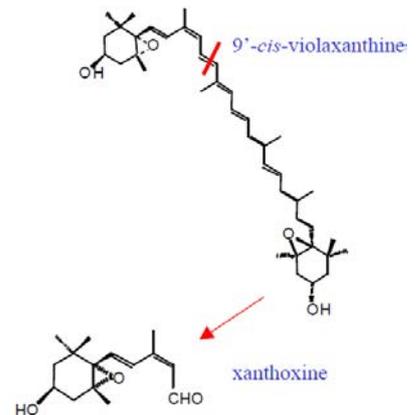


Figure 12 : Réaction de clivage des *AtNCED*

Si l'on considère à présent *ABA2*, sa régulation est faible au cours du stress hydrique. Or, *ABA2* fait partie des gènes des enzymes dites « cytosoliques » qui ont des activités qui ne diffèrent pas de manière significative en condition de stress hydrique (Cheng *et al.*, 2002).

Cette information est confortée dans notre expérimentation où les gènes cytosoliques (*ABA2*, *AAO3*, *ABA3*) sont peu régulés au cours de la sécheresse.

D'après Gonzales-Guzman *et al.* (2002), les transcrits de *ABA2* chez *A. thaliana* s'accumulent préférentiellement dans les racines et les tiges, qui ne sont pas des cibles de l'ABA.

Cheng *et al.* (2002) ont émis l'hypothèse que la protéine *ABA2* puisse être mobile et pourrait constituer un système de transport entre les cellules et entre les organes pour l'ABA (et/ou de ses précurseurs).

Le gène *AAO3* est exprimé aussi bien dans les deux conditions (stressé ou témoin) mais n'est pas régulé. Cela est conforme avec les données de la littérature (Cheng *et al.* 2002) car c'est un gène codant une enzyme cytosolique dont l'expression n'est pas impactée par le changement hydrique.

Pour conclure sur cette hypothèse, nous pouvons dire que les régulations observées au cours du stress hydrique sont en accord avec ce que propose la littérature (Iuchi *et al.*, 2001, Tan *et al.* 2003). Nous pouvons conclure que les gènes des enzymes sont bien exprimés directement dans les cellules de garde et que ceux-ci sont régulés au cours d'un stress hydrique, en adéquation avec la littérature (Thompson *et al.*, 2000).

Les mesures d'échanges gazeux sur Carpaccio montrent que la conductance baisse après 70 heures de manière significative pour les individus soumis à un stress hydrique. Cette chute de conductance, qui se traduit également par une augmentation de l'efficacité d'utilisation de l'eau, intervient 6 heures après l'expression de ces gènes. Comme les gènes de la partie cytosolique ne sont pas régulés au cours d'une sécheresse, on peut penser que la surexpression des gènes des enzymes codant le passage de 9'-*cis*-violaxanthine à la xanthoxine, *NCED*, peuvent être responsable de la fermeture stomatique opérée chez Carpaccio.

Cela ne s'observe pas chez le génotype Soligo car la cinétique de réponse était décalée avec Carpaccio. C'est au temps 4, soit à la fin de l'expérimentation, que *NCED3.1* et *NCED3.2* commencent à être surexprimés.

Perspectives

Cette expérimentation aura permis d'apporter des éléments de réponse sur les mécanismes de réponse à un stress hydrique chez *P. deltoïdes* x *P. nigra*. Néanmoins, des modifications peuvent être apportées ou d'autres pistes peuvent être explorées pour la suite des expérimentations.

- En premier lieu, l'expérimentation a eu lieu en serre, où certains paramètres peuvent être contrôlés (température, ...) mais où certaines variables subsistent. En effet, les variations d'éclairage (passage nuageux, structure de la serre faisant ombrage) ont été visibles sur les mesures d'échanges gazeux et peuvent donc introduire un biais. C'est pourquoi la possibilité de réaliser une expérience similaire en phytotron pourrait être une bonne alternative.
- Un autre point délicat se situe au niveau de la microdissection. En effet, le postulat fort de ce sujet était d'étudier spécifiquement dans les stomates. Nous avons donc décidé de microdisséquer 500 stomates par échantillon (d'après les expérimentations effectuées durant la thèse de Jennifer Dumont). Or, la quantité d'ARN disponible dans 500 complexes stomatiques n'est pas suffisante pour pouvoir s'affranchir de l'amplification des ADNc avant de quantifier l'expression de gènes par qPCR. Chaque étape rajoutée au protocole est un biais de plus qu'il faut ajouter. Pour une prochaine expérimentation, nous recommandons de tester sur une quantité supérieure à 500 stomates (750 / 1000 / 1500).
- Le protocole utilisé pour l'extraction d'ARN était un kit standard souvent utilisé dans la recherche scientifique (« RNeasy Plus Micro Kit » de la marque Qiagen). Un point à améliorer pourrait être de tester d'autres kits afin d'optimiser le rendement de l'extraction d'ARN.
- Comme il est indiqué dans la partie Introduction, l'acide abscissique est normalement induit dans les racines où il est ensuite transporté vers les parties aériennes. Une fois la partie métabolomique effectuée, il faudra alors distinguer si l'ABA qui est contenu dans l'épiderme provient effectivement d'une synthèse *in situ* ou si cela est dû soit à une remobilisation d'ABA déjà présent dans la feuille ou si celui-ci provient directement des racines. C'est pourquoi nous recommandons pour la suite de l'expérimentation de pouvoir travailler sur une feuille entière afin de pouvoir faire un ratio dans le temps entre l'ABA feuille entière et l'ABA seulement dans l'épiderme. Si l'on veut savoir si de l'ABA provient des racines, il faudra alors pouvoir doser de l'ABA directement dans les pétioles (qui ont été récoltés à différents temps)
- Des alternatives existent à la qPCR tel que la PCR-Elisa (Zhang *et al.* 2000, Egervari *et al.* 2009) Son principe repose sur la combinaison antigène – gène. Des antigènes spécifiques sont inclus au sein d'une matrice. Une fois le gène spécifique mis en solution dans la matrice, celui-ci ira se fixer sur les anti-gène tandis que les autres gènes resteront en solution. Des enzymes spécifiques vont alors se lier et pouvoir entamer le processus d'amplification.

BIBLIOGRAPHIE

- Arevalo-Ferro C, Hentzer M, Reil G, Görg A, Kjelleberg S, Givskov M, Riedel K, Eberl L. 2003. Identification of quorum-sensing regulated proteins in the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* by proteomics. *Environmental Microbiology* 5 (12) : 1350-1369
- Boyer JS. 1982 Plant Productivity and Environment. *Science* 218 : 443-448
- Blum AL, Li W, Cressy M, Dubnau J. 2009. Short- and long-term memory in *Drosophila* require cAMP signaling in distinct neuron types. *Current Biology*.19: 1341--1350
- Cheng Y, Canuto VM, Howard M. 2001. An Improved Model for the Turbulent PBL *Journal of the Atmospheric Sciences* 59 : 1550-1562
- Dumont J, Keski-Saari S, Keinanen M, Cohen D, Ningre N, Kontunen-Soppela S, Baldet P, Gibon Y, Dizengremel P, Vaultier MN, Jolivet Y, Oksanen E, Le Thiec D. 2014. Ozone affects ascorbate and glutathione biosynthesis as well as amino acid contents in three Euramerican poplar genotypes. *Tree Physiology* 34 : 253-266
- Dumont J, Spicher F, Montpied P, Dizengremel P, Jolivet Y, Le Thiec D. 2013. Effects of ozone on stomatal responses to environmental parameters (blue light, red light, CO₂ and vapour pressure deficit in three *Populus deltoides* x *Populus nigra* genotypes. *Environmental Pollution* 173 : 85-96
- Eckardt NA. 2002. Abscissic acid biosynthesis gene underscores the complexity of sugar, stress, and hormone interactions *The Plant Cell* 14 : 2645-2661
- Egervari K, Toth J, Nemes Z, Szollosi Z. 2009. An alternative and reliable real-time quantitative PCR method to determine HER2/neu amplification in breast cancer. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology* 17 : 247-254
- Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, von Heline G. 2000. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino-acid sequence. *Journal of Molecular Biology* 300 : 1005-1016
- Farquhar GD, Richards RA. 1984. Isotopic composition of plant carbon correlates with water-use efficiency of wheat genotypes. *Australian Journal of Plant Physiology* 11 : 539-552
- Ferro M, Salvi D, Rivière-Rolland H, Vermat T, Seigneurin-Berny D, Grunwald D, Garin J, Joyard J, Rolland N.. 2002. Integral membrans protein of the chloroplast envelope : identification and subcellular localization of new transporters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (17) : 11487-11492
- Ferro M *et al.* 2003 Proteomics of the Chloroplast Envelope Membranes from *Arabidopsis thaliana*. *Molecular & Cellular Proteomics* 2 : 325-345
- Goodstein DM, Shu S, Howson R, Neupane R, Hayes RD, Fazo J, Miltros T, Dirks W, Hellsten U, Putnam N, Rokhsar DS. 2012. Phytozome : a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Research* 40 : 1178-1186
- Gowing DJ, Davies WJ, Jones HG. 1990. A positive root-sourced signal as an indicator of soil drying in apple, *Malus domestica* Borkh. *Journal of Experimental Botany* 41, 1535-1540
- Guehl JM, Huc R, Ferhi A. 1994. Pioneer and late stage tropical rainforest tree species (French Guiana) growing under common conditions differ in leaf gas exchange regulation, carbon isotope discrimination and leaf water potential. *Oecologia* 99 : 297-305

- Hanada K, Akiyama K, Sakurai T, Toyoda T, Shinozaki K, Shiu SH..2010 sORF finder : A program package to identify small open reading frames with high coding potential. *Bioinformatics* 26(3) : 399-400
- Hanada K, Kuromori T, Myouga F, Toyoda T, Li WH, Shinozaki K. 2009 Evolutionary persistence of functional compensation by duplicate genes in Arabidopsis. *Genome Biology and Evolution* 1. 409-414
- IPCC. 2007. Climate Change 2007 : The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment. *Cambridge University Press*, 996 pp.
- IPCC 2014 Climate Change 2013. The physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the fifth Assessment Report on the IPCC. *Cambridge University Press*
- Iuchi S, Kobayashi M, Taji T, Naramoto M, Seki M, Kato T, Tabata S, Kakubari Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. 2001. Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-*cis*-epoxycartenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in Arabidopsis *The Plant Journal* 27 : 325-333
- Kall L, Krogh A, Sonnhammer EL. 2004. A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method. *Journal of Molecular Biology* 338 : 1027-1036
- Khosla DK, Dhall SP. 1982. Studies in *Populus ciliata* Wall. Ex Royle 1. Correlation of phenotypic observations with sex of tress. *Silvae Genetics* 28 : 21-23
- Koiwai H, Nakaminami K, Seo M, Mitsuhashi W, Toyomasu T, Koshiba T. 2004. Tissue-Specific Localization of an Abscisic Acid Enzyme, AAO3, in Arabidopsis. *Plant Physiology* 134 : 1697-1707
- Kwak JE, Drier E, Barbee SA, Ramaswami M, Yin JCP, Wickens M. 2008. GLD2 poly(A) polymerase is required for long-term memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 105(38): 14644-14649
- Kuromori T, Sugimoto E, Shinozaki K. 2014. Intertissue signal transfer of abscisic acid from vascular cells to guard cells. *Plant Physiology* 164 : 1587-1592
- Lauteri M, Scartazza M, Guido C, Brugnoli E. 1997. Genetic variation in photosynthetic capacity, carbon isotop discrimination and mesophyll conductance in provenances of *Castanea sativa* adapted to different environments. *Functional Ecology* 11 : 675-683
- Lefevre CE, Wilson VA, Morton FB, Brosnan SF, Paukner A, Bates TC. 2014. Facial width-to-height ratio relates to alpha status and assertive personality in capuchin monkeys. *Plos ONE* 8 : 44-49
- Melhorn V, Matsumi K, Koiwai H, Ikegami K, Okamoto M, Nambara E, Bittner F, Koshiba T. 2008. Transient expression of AtNCED3 and AAO3 genes in guard cells causes stomatal closure in *Vicia faba*. *Journal of Plant Ressource* 121 : 125-131
- Monclus R, Dreyer E, Villar M. 2006. Impact of drought on productivity and water use efficiency in 29 génotypes of *Populus deltoides* x *Populus nigra*. *New Phytologist* 169 : 765-777
- Nambara E, Marion-Poll A. 2005. Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Plant Biologist* 56 : 165-185
- North D *et al.* 2007. Limited Access Orders in the Developing World : A new approach to the problems of Development. *The world bank* 4359
- Outlaw WH, Manchester J. 1979. Guard cell starch concentration quantitatively related to stomatal aperture. *Plant Physiology* 64 : 79-82
- Tan C, Stronach B, Perrimon N. 2003. Roles of myosin phosphatase during Drosophila development. *Development* 130 : 671-681.

- Tardieu F, Parent B, Simonneau T. 2010 Control of leaf growth by abscisic acid : hydraulic or non hydraulic processes ? *Plant, Cell and Environment* 33 : 636-647
- Thompson R, Edwards R, Hart JA. 2002. Close proximity Soundings within Supercell Environments Obtained from the Rapid Update Cycle. *American Meteorological Society* 58 : 585-545
- Reichstein M, Tenhunen JD, Roupsard O, Ourcival JM, Rambal S, Dore S, Valentini R. 2002. Ecosystem respiration in two Mediterranean evergreen Holm Oak forests : drought effects and decomposition dynamics *Functional Ecology* 16 : 27-39
- Richard M, De Groot P, Courtin O, Poulain D, Klis F, Gaillardin C. 2002.. GPI7 affects cell-wall protein anchorage in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Microbiology* 148 : 2125-2133
- Sauter A, Davies WJ, Hartung W. 2001. The long-distance abscisic acid signal in the droughted plant : the fate of the hormone on its way from root to shoot. *Journal of Experimental Botany* 52 : 1991-1997
- Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG. 2012. Primer3-new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* 40 : 1-12
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 3 : 1-11
- Van der Molen M K, Dolman AJ, Ciais P, Eglin T, Gobron N, Law BE, Meir P, Peters W, Phillips OL, Reichstein M, Chen T, Dekker SC, Doubkova M, Friedl MA, Jung M, van den Hurk BJJM, de Jeu, RAM, Kruijt B, Ohta T, Rebel KT, Plummer S, Seneviratne SI, Sitch S, Teuling AJ, van der Werf GR, Wang, G. Drought and ecosystem carbon cycling. *Agricultural and Forest Meteorology* 151 : 765-773
- Zhang J, Davies WJ. 1990. Changes in the concentration of ABA in the xylem sap as a function of changing soil water status can account for changes in leaf conductance and growth. *Plant, Cell and Environment* 13 : 277-285
- Zhang P, Gebhart CJ, Burden D, Duhamel GE. 2000. Improved diagnosis of porcine proliferative enteropathy caused by *Lawsonia intracellularis* using polymerase chain reaction-enzyme-linked oligosorbent assay (PCR-ELOSA) *Molecular and Cellular Probes* 14 : 101 - 108
- Zhou R, Squires TM, Ambrose SJ, Abrams SR, Ross ARS, Cutler AJ. 2003. Rapid extraction of abscisic acid and its metabolites for liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography* 1010 : 75-85

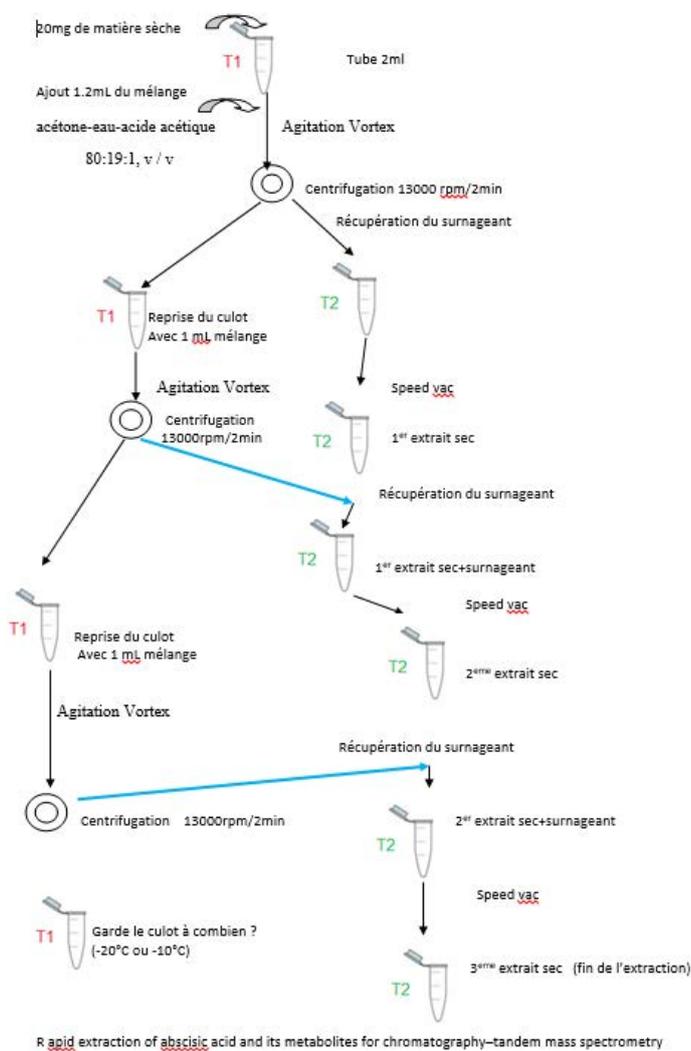
ANNEXES

Annexe n°1 : Premières étapes de l'élaboration du protocole de dosage de l'acide abscissique

Support de départ : *Rapid extraction of abscisic and its metabolites for liquid chromatography-tandem mass spectrometry* Zhou et al. 2003

Matériel végétal : feuille entière de *P.nigra* x *P.deltoides* sous stress hydrique.

Protocole d'extraction d'ABA testé :

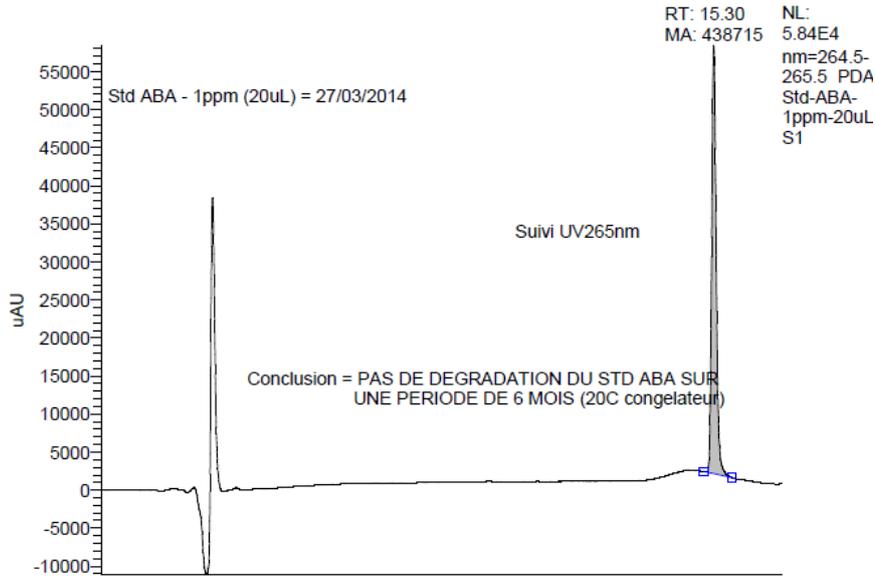


Protocole testé (établi en interne)

1^{ère} étape : tester la stabilité de l'ABA

Objectif : déterminer si de l'ABA âgé de 6 mois et stocké à -20°C se dégrade

RT: 0.14 - 16.99 SM: 7B

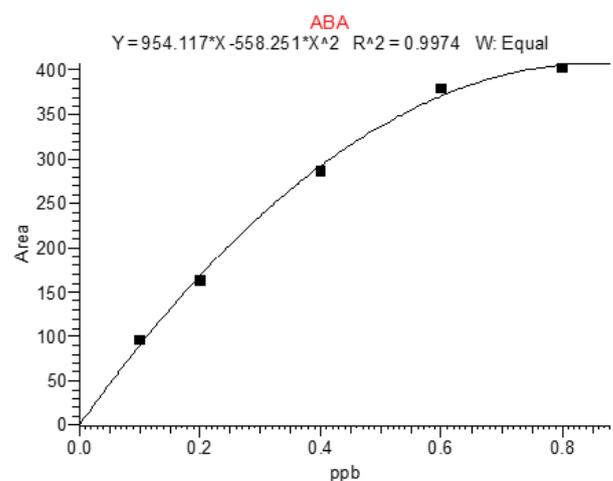
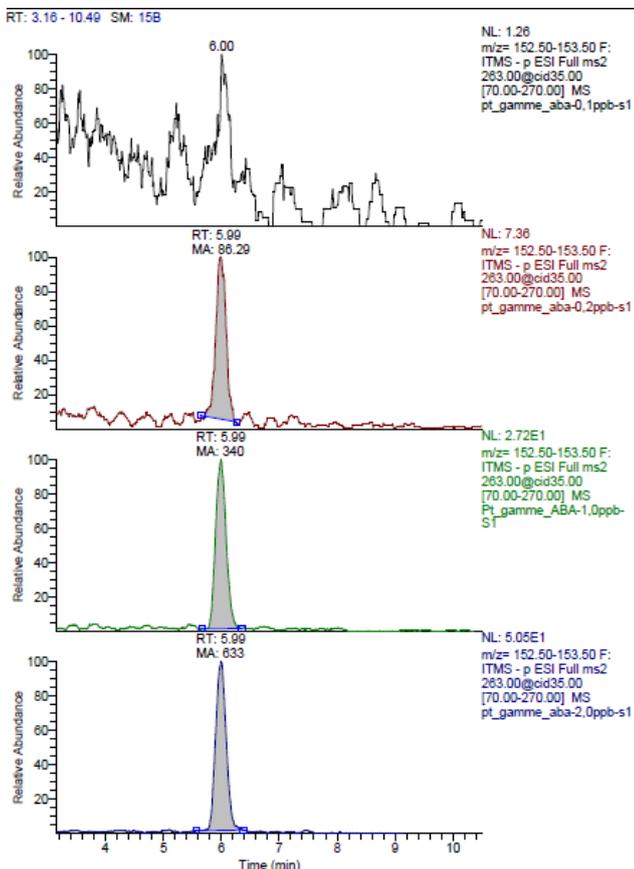


Conclusion : les échantillons sont stables sur une période de 6 mois.

2^{ème} étape : réalisation d'une gamme de dilution pour déterminer les limites de détection

Objectif : déterminer les limites basses et hautes de détection par l'appareil LCMS

Dilution allant de 10 ppb à 0.1 ppb -> résultats très bons, la gamme de dilution suit une courbe logarithmique ($R^2=0.9974$)



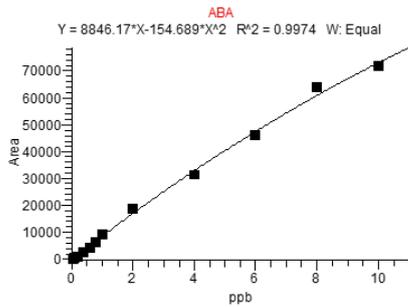
3^{ème} étape : Tests de dilution avec différents volumes d'injection

Objectif : déterminer si les résultats sont identiques avec deux volumes d'injection différents et deux modes d'injection différents

Test avec 50 µL et 25 µL et en mode « boucle pleine » ou « boucle partielle »

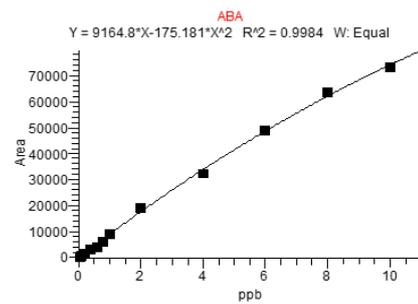
ACIDE ABSCISSIQUE = 4 et 7 avril 2014

Gamme ABA Externe – 50µL injectés (Mode « boucle pleine ») – 4 avril



Gamme 0-10ppb (Mode MS2)

Gamme ABA Externe – 25µL injectés (Mode « boucle partielle ») – 7 avril



Gamme 0-10ppb (Mode MS2)

4^{ème} étape : Détermination de la perte en composé à chaque étape d'extraction d'ABA

Impact de l'étape de passage en SpeedVac (SpeedVacuum) – étape de séchage sous vide : perte importante d'ABA lors du passage au SpeedVac (test 1 nuit + test 48 heures)

Impact de l'étape de purification – passage sur colonne SPE : perte d'ABA également (mais moindre) à chaque étape de purification

5^{ème} étape : Détermination de l'impact de la masse de feuille de départ (25 mg / 100 mg)

Les matrices avec 25 mg de feuille sont à proscrire car la concentration en ABA est trop faible et n'est pas quantifiable via LCMS. On cherchera donc à privilégier les 100 mg (résultat cohérent avec les données de Zhou *et al.* 2003 qui préconisait entre 20 et 100 mg)

Le temps imparti par mon stage ne m'a pas permis d'aller plus loin dans l'élaboration de ce protocole.

Annexe n°2 : Liste des gènes étudiés avec leurs amorces spécifiques

Nom du gène	Plus proche orthologue chez <i>A.thaliana</i>	Nom Phytozome (v9.1)	Amorces sens et antisens 5'-3'	Alias
<i>β-OHASE 1</i>	AT4G25700/AT5G52570	POPTR_0004s07230	GTTCGGCATGGCCTATATGT TGCTGCTACCCTGGTGAAT	Potri.004G074000.1
<i>β-OHASE 2</i>	AT4G25700/AT5G52570	POPTR_0017s01240	CCAGCAATTTCCCTTCTCTC CCAAGGGAATCTCTTGTGA	Potri.017G145700
<i>ABA 1.2</i>	<i>ABA1 (AT5G67030)</i>	POPTR_0007s10980	CAGGATGATGGGATAAGGT TTCTTGGGCCCGAATAAGT	Potri.007G044300
<i>ABA 1.L</i>	<i>ABA1 (AT5G67030)</i>	POPTR_0001s23620	CATGCTTCGAAGGTACGAGA GACAAGGAGCCAGATCCAAA	Potri.001G229100.1
<i>NCED 3.1</i>	<i>ATNCED3 (AT3G14440)</i>	POPTR_0001s40420	AAGACCCGGTTCGCTTACTT CTCCGTAAGTGTGCTTGTGT	Potri.001G393800.1
<i>NCED 3.2</i>	<i>ATNCED3 (AT3G14440)</i>	POPTR_0011s11370	GAAAATCCCGGTTGCTTACT ACAAAGGCTCTCCACCGAAT	Potri.011G112400.1
<i>ABA2</i>	<i>ABA2 (AT1G52340)</i>	POPTR_0001s06170	TGGGAGGAATGCTAAGTTC AAGCCCCATCAAGCATTAG	Potri.001G024300.1
<i>AAO 3.L</i>	AT4G34890	POPTR_0004s20280	TGCTCACGTACCAGAACTCA GCACGCTCATTTACGACCTT	Potri.009G054600.1
<i>AAO 3.1</i>	<i>AAO3 (AT2G27150)</i>	POPTR_0009s15580	GCTACAAGGGCAGCTATAAG CCCTAAGTACCTTCCACATT	Potri.009G153800
<i>ABA 3</i>	<i>ABA3 (AT1G16540)</i>	POPTR_0007s08330	GGAGAGTGAAGGGGAAGATT TTTCTTCTCCCACTCGAAGC	Potri.007G066400 (.1 à .4)
<i>ABA 1.1</i>	<i>ABA1 (AT5G67030)</i>	POPTR_0005s18160	GTGCTCGAGAATGGACAACA GCCTCCTTGGGTCCAAATAA	Potri.005G138400 (.1 et .2)
<i>ABA 4.1</i>	<i>ABA4 (AT1G67080)</i>	POPTR_0004s09860	TGCCTGGTATAGCGAAGATG GAGAAACCGAATGTCGAGTC	Potri.004G099500 (.1 à .3)
<i>ABA 4.2</i>	<i>ABA4 (AT1G67080)</i>	POPTR_0005s15630	CTATTTGCTGCAAGGCAGGT CGGCACCTTTGGTTAGTGCT	Potri.017G114900.1
<i>NCED 5</i>	<i>ATNCED5 (AT1G30100)</i>	POPTR_0011s11370	TGCTACTGATGCCAAGGACA	Potri.011G084100.1
		POPTR_0011s02230	TTGGATTCTGGCTCTTCCCA	Potri.T074400.1
<i>NCED 6</i>	<i>ATNCED6 (AT3G24220)</i>	POPTR_0011s08240	CCGGTTCGTTACCTAGCAA ATGGCTCACCACCAAACCTA	Potri.003G176300.1
<i>AAO 3.2</i>	<i>AAO3 (AT2G27150)</i>	POPTR_0009s15560	GCTGCAAGAGCAGCTATAAG CAGGTACCTTCCACGTTGT	Potri.009G153600.1
<i>AAO 3.3</i>	<i>AAO3 (AT2G27150)</i>	POPTR_0004s20280	CGCTGCACAAGCAGCTATTA TAGGCATAATGGCAGGAACC	Potri.004G191300.1
<i>β-OHASE 3</i>	AT4G25700/AT5G52570		CAACTTCACCACGAGACAA CGTTGAACCTCCTTCTCCAA	Potri.001G100200.1

Annexe n°3 : Prédiction de la localisation subcellulaire et du nombre d'hélices transmembranaires des enzymes impliquées dans la biosynthèse d'ABA chez *A. thaliana*. RC (Reliability Class, $1 \leq RC \leq 5$) exprime la fiabilité de la prédiction de TargetP1.1 (plus la valeur de RC est faible, plus sûre est la prédiction). P ($0 \leq P \leq 1$) représente le score associé à la prédiction de MultiLoc (plus la valeur de P est forte, plus la prédiction est fiable).

	Localisation subcellulaire				Domaine transmembranaire	
	TargetP 1.1		MultiLoc		TMHMM	PHOBIUS
	Localisation	RC	Localisation			
BETA_OHASE1	Chloroplaste	2	Chloroplaste	0,97	4	4
BETA_OHASE2	Chloroplaste	1	Chloroplaste	0,95	4	4
ABA1	Chloroplaste	3	Chloroplaste	0,9	-	-
ABA4	Chloroplaste	1	Chloroplaste	0,73	4	4
NCED3	Chloroplaste	3	Chloroplaste	0,37	-	-
NCED9	Autre	3	Cytoplasme	0,7	-	-
NCED5	Chloroplaste	2	Chloroplaste	0,65	-	-
NCED2	Autre	3	Cytoplasme	0,32	-	-
NCED6	Mitochondrie	5	Chloroplaste	0,6	-	-
ABA2	Autre	4	Peroxisome	0,91	-	-
ABA3	Autre	1	Peroxisome	0,77	-	-
AAO3	Autre	1	Cytoplasme	0,83	-	-

RESUME

Ce mémoire présente l'étude de la voie de biosynthèse de l'acide abscissique sous une sécheresse édaphique chez deux génotypes de *P.nigra* x *P.deltoides* présentant des comportements différents face à un stress hydrique. Nous chercherons à déterminer si les gènes des enzymes de la voie de biosynthèse de l'ABA peuvent être exprimés et régulés au sein des cellules de garde des stomates. Dans un premier temps, une expérimentation en serre a été effectuée avec des mesures d'échanges gazeux (conductance stomatique à la vapeur d'eau, assimilation nette de CO₂). Dans un second temps, l'étude des niveaux de régulation de gènes d'enzymes candidates a été faite via des techniques de qPCR. Le résultat principal est que ces gènes sont non seulement exprimés au sein des cellules de garde mais sont également régulés au cours d'une sécheresse courte (76h). L'élaboration d'un protocole d'extraction d'ABA épidermique et de ses métabolites a été entamé et les résultats en découlant pourront étayer les conclusions.

ABSTRACT

This paper presents the Study of the biosynthetic pathway of abscisic acid in a soil drought in two genotypes of Euramerican poplar (*P. nigra* x *P. deltoides*) with different attitudes to water stress. The main objective was to determine whether the enzyme genes biosynthetic pathway of ABA can be expressed and regulated in guard cells. For this, a greenhouse experiment was conducted with leaf gas exchange measurements (stomatal conductance to water vapor, net CO₂ assimilation). In a second step, the study of levels of regulation of enzyme candidate genes was done via qPCR techniques. The main result is that these genes are expressed not only in guard cells but are also regulated in a short drought (76h) with difference of expressions between genotypes.