



HAL
open science

Étude du rôle du gène PROSCOOP12 dans le développement racinaire chez *Arabidopsis thaliana*

Marie-Charlotte Guillou

► **To cite this version:**

Marie-Charlotte Guillou. Étude du rôle du gène PROSCOOP12 dans le développement racinaire chez *Arabidopsis thaliana*. Sciences du Vivant [q-bio]. 2019. dumas-02384982

HAL Id: dumas-02384982

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02384982>

Submitted on 28 Nov 2019

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.

Année universitaire : **2018-2019**

Spécialité : **Horticulture**

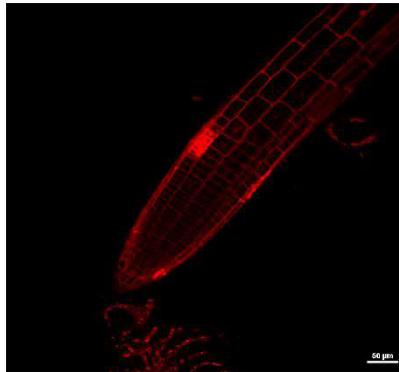
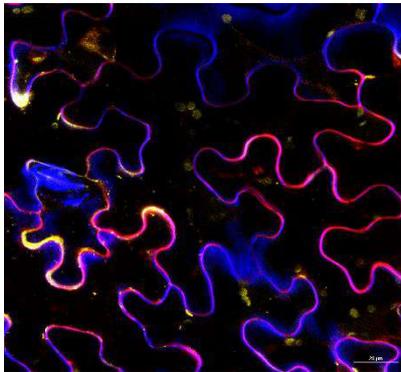
Spécialisation : **Semences et Plants**

Mémoire de fin d'études

- d'Ingénieur de l'Institut Supérieur des Sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage
- de Master de l'Institut Supérieur des Sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage
- d'un autre établissement (étudiant arrivé en M2)

Etude du rôle du gène *PROSCOOP12* dans le développement racinaire chez *Arabidopsis thaliana*

Par : Marie-Charlotte Guillou,
Organisme d'accueil : IRHS Angers



Soutenu à Angers le 17 Septembre 2019

Devant le jury composé de :

Président : Olivier Leprince, Professeur
ACO

Autres membres du jury : Marie-Hélène
Macherel, Maître de Conférences ACO

Maître de stage : Emilie VERGNE, Ingénieur
de recherche INRA

Enseignant référent : Philippe Grappin,
Maître de Conférences ACO

Les analyses et les conclusions de ce travail d'étudiant n'engagent que la responsabilité de son auteur et non celle d'AGROCAMPUS OUEST

REMERCIEMENTS

Ce mémoire de fin d'étude est le synonyme de l'aboutissement d'une longue période de reprise d'études durant laquelle j'ai eu la chance d'être accompagnée par des personnes bienveillantes. Je profite donc de ces quelques lignes pour remercier ceux à qui je dois les bons souvenirs que je vais garder.

Tout d'abord, mes remerciements les plus chaleureux à Emilie Vergne. Ton accompagnement tout au long de ces trois années a été un grand soutien scolaire, professionnel et personnel. Je savais que j'étais « entre de bonnes mains » sous ton encadrement. Tes conseils et ta rigueur m'ont beaucoup appris et encouragés à donner le meilleur de moi-même lors de cet apprentissage. Ça y est, maintenant tu vas pouvoir souffler un peu, fini les « TSFA-version1-2-3-4-5-XXX... » à remplir.

Je remercie Jean-Pierre Renou et Sébastien Aubourg de m'avoir également encadrée durant ces trois années. J'ai beaucoup appris scientifiquement et professionnellement auprès de vous et je vous remercie pour votre confiance. Grâce à vous j'ai pu poursuivre sur un sujet passionnant et plein d'avenir et véritablement murir et m'épanouir professionnellement.

Merci Philippe Grappin pour ton suivi sur ces trois années. Tu as su m'apporter des réponses clés lors de périodes de doutes et de difficultés expérimentales. Merci également de m'avoir encouragée à saisir les opportunités qui m'ont été offertes.

Un grand merci à Pascal Poupard et toute l'équipe Fungisem pour votre accueil dans l'équipe. Même si finalement j'ai été peu présente dans votre bâtiment, vous constituez une belle équipe, dans laquelle j'ai beaucoup aimé la bonne ambiance qui y règne et l'organisation. Plus particulièrement, j'adresse un immense merci à Sophie Aligon. Merci pour ton aide dans les manip. Tu as dû jongler entre de nombreuses manip réparties sur de nombreux projets. Tu m'as aidé à régler pas mal de galères de manip (à se demander si le phénotype de notre mutant n'était pas de mettre en panne toutes les chambres de cultures dans lesquelles nous le déposons !). Malgré tout, tu as toujours gardé de la place dans ton temps pour m'aider. Merci également pour toutes les « couvades » de plantes que tu as faites pendant mes absences, lors de mes périodes d'alternance en cours notamment. C'est vraiment un plaisir de travailler avec toi.

Je remercie Aurélia Rolland et Fabienne Simonneau pour votre accompagnement précieux sur le plateau IMAC. Merci pour tous vos conseils et les petites pauses avec vous. Votre bonne humeur et votre gentillesse sont un régal quand on ouvre la porte du plateau.

Je remercie Juliette Bénéjam et Xabi Cazenave, mes deux colocataires de bureau, pour votre compagnie et votre bonne humeur. Merci particulièrement à David Windels pour ta compagnie dans les labos parfois désertiques, pour ta bonne humeur et surtout pour ton aide toujours volontaire.

Je souhaite remercier aussi Sandra Pelletier pour m'avoir permis de réaliser mon tout premier stage en laboratoire de recherche à l'IRHS en 2012 sur un sujet précurseur à celui de mon apprentissage. On ne sait pas toujours ce que l'avenir nous réserve. Je n'aurai pas forcément imaginé que mes premiers pas auprès de toi me conduiraient ensuite vers la reprise de mes études et sur le projet SCOOP. Et encore ... qu'ils m'emmèneraient finalement jusqu'à [attention spoil] : une thèse à l'IRHS.

Enfin, un grand merci à l'ensemble des agents de l'IRHS avec qui je poursuis mon parcours année après année. J'apprends à vos côtés et c'est un plaisir de venir travailler dans les enceintes de cet institut.

TABLE DES MATIERES

| | |
|---|--------|
| REMERCIEMENTS | - 1 - |
| TABLE DES MATIERES | - 1 - |
| GLOSSAIRE | - 1 - |
| LISTE DES ABBREVIATIONS | - 1 - |
| LISTE DES ANNEXES | - 1 - |
| LISTE DES ILLUSTRATIONS | - 1 - |
| Partie I - INTRODUCTION | - 1 - |
| 1.1. Contexte scientifique et enjeux | - 1 - |
| 1.2. Connaissances scientifiques | - 1 - |
| 1.2.1. Les peptides sécrétés | - 1 - |
| 1.2.2. Croissance et développement des racines | - 3 - |
| 1.2.3. Les espèces réactives de l'oxygène | - 4 - |
| 1.3. Introduction au stage | - 6 - |
| 1.3.1. Expression du gène précurseur <i>PROSCOOP12</i> | - 6 - |
| 1.3.2. Etudes préliminaires du précurseur et du peptide prédit | - 7 - |
| 1.3.3. Problématique, objectifs du stage et stratégie mise en place | - 10 - |
| Partie II - MATERIEL ET METHODE | - 12 - |
| 2.1. Matériel | - 12 - |
| 2.2. Méthodes | - 12 - |
| 2.2.1. Conditions de culture des plantes | - 12 - |
| 2.2.2. Conditions de culture des bactéries | - 12 - |
| 2.2.3. Techniques d'imagerie cellulaire | - 13 - |
| 2.2.4. Technique de phénotypage | - 14 - |
| 2.2.5. Génotypage | - 14 - |
| 2.2.6. Expression transitoire de 35S:: <i>PROSCOOP12</i> ::RFP | - 15 - |
| Partie III - RESULTATS | - 16 - |
| 3.1. Caractérisation racinaire du mutant <i>proscoop12</i> | - 16 - |
| 3.1.1. Observation morphologique des cellules | - 16 - |
| 3.1.2. Observation des ROS dans la racine principale | - 17 - |
| 3.2. Obtention et phénotypage du mutant surexpresser | - 19 - |
| 3.2.1. Lignées mutantes obtenues | - 19 - |
| 3.2.2. Phénotypage au stade F1 | - 21 - |
| 3.3. Localisation cellulaire de la protéine fusion <i>PROSCOOP12</i> ::RFP | - 23 - |
| Partie IV - DISCUSSION | - 25 - |
| 4.1. Implication du gène <i>PROSCOOP12</i> dans la croissance racinaire | - 25 - |
| 4.2. Une surexpression de <i>PROSCOOP12</i> perturbe le développement général | - 25 - |

| | |
|--|--------|
| 4.3. Localisation membranaire de la protéine fusion PROSCOOP12::RFP..... | - 26 - |
| Partie V - CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES | - 28 - |
| 4.1. Conclusions scientifiques | - 28 - |
| 4.2. Perspectives scientifiques | - 28 - |
| 4.3. Améliorations méthodologiques..... | - 29 - |
| ANNEXES | - 31 - |
| BIBLIOGRAPHIE | - 35 - |

GLOSSAIRE

Mutant KO : plante portant un gène inactivé par l'insertion d'une séquence ADN (ADN-t).

Cassette génique : fragment d'ADN comportant plusieurs gènes transférés ensemble lors d'une transgénèse.

Promoteur 35S : promoteur constitutif dirigeant l'expression permanente d'un gène dans tous les tissus.

Suppresseur de silencing viral P19 : utilisé lors de transformations génétiques pour améliorer le niveau d'expression d'un gène d'intérêt. La protéine P19 forme un complexe avec les petits ARN interférant, pour les rendre inaccessibles aux gènes du « silencing » (silencing gene) dont la fonction est de diminuer la transcription d'un gène étranger.

LISTE DES ABBREVIATIONS

A. thaliana : *Arabidopsis thaliana*

aa : acides aminés

Col-0 : écotype Columbia-0

DAB : 3,3'-DiAminoBenzidine

H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène

HPF : HydroxyPhenyl Fluorescent

HR : Hypersensitive Response

KO : Knock Out

LB : Lysogeny Broth ou Luria-Bertani

MS : Murashige et Skoog

N. benthamiana : *Nicotiana benthamiana*

NBT : Nitro Blue Tetrazolium

NOX : NADPH (Nicotinamidadenine Dinucleotidephosphate) oxydase

O₂⁻ : anion superoxyde

OH· : radical hydroxyle

pb : paire de base

PCR : Polymerase Chain Reaction

POD : peroxydase

PROSCOOP : précurseur protéique de SCOOP

RE : Réticulum Endoplasmique

ROS : Reactive oxygen species

SOD : superoxyde dismutase

SCOOP : Serine Rich Endogenous Peptide

t-DNA : ADN de transfert (ADN-t)

WS : écotype Wassilewskija

LISTE DES ANNEXES

| | |
|--|------|
| <u>Annexe I</u> : Induction des réponses de défense immunitaire par SCOOP12. | P.31 |
| <u>Annexe II</u> : Effets du peptide SCOOP12 spécifiques à <i>A. thaliana</i> . | P.32 |
| <u>Annexe III</u> : Schéma de la construction 35S:: <i>PROSCOOP12</i> ::RFP. | P.33 |
| <u>Annexe IV</u> : Phénotypes des plantes F1 A à L et du témoin WS âgés de 4 semaines au stade rosette. | P.34 |

LISTE DES ILLUSTRATIONS

| | |
|--|--------|
| Figure 1: Deux grands groupes de peptides sécrétés classés selon leurs caractéristiques structurales..... | - 2 - |
| Figure 2: Organisation de la racine d' <i>Arabidopsis thaliana</i> en trois zones distinctes. | - 3 - |
| Figure 3: Répartition spatiale des ROS selon les trois zones de la racine d' <i>Arabidopsis thaliana</i> | - 6 - |
| Figure 4: Bilan des 136 expériences dans lesquelles le gène <i>AT5G44585</i> est différentiellement transcrit. | - 7 - |
| Figure 5: Comparaison phénotypique entre les mutants <i>proscoop12</i> et les plantes sauvages WS et Col-0..... | - 7 - |
| Figure 6: Séquence de la protéine PROSCOOP12..... | - 8 - |
| Figure 7: Localisation de la protéine fusion PROSCOOP12::RFP..... | - 9 - |
| Figure 8: Modèle putatif expliquant les fonctions du peptide SCOOP12 dans le développement racinaire et la réponse au stress biotique par l'inhibition de la protection contre le stress oxydatif..... | - 10 - |
| Figure 9: Schéma d'obtention de graines ayant intégré la construction permettant la surexpression de <i>PROSCOOP12</i> | - 14 - |
| Figure 10: Comparaison de racines sauvages et mutantes d' <i>A. thaliana</i> à j+25..... | - 16 - |
| Figure 11: Observation de l'accumulation d'O ₂ ⁻ dans les racines mutantes et sauvages. . - | 18 - |
| Figure 12: Observation de l'accumulation d'H ₂ O ₂ dans les racines mutantes et sauvages. - | 19 - |
| Figure 13: Génotypage des plantes transformées à la génération F1. | - 20 - |
| Figure 14: Comparaison des phénotypes au stade « rosette » entre le sauvage WS, une plante non transformée et une plante transformée. | - 21 - |
| Figure 15 : Phénotype au stade rosette du mutant surexpresser E (F1)..... | - 21 - |
| Figure 16: Comparaison des phénotypes au stade « silique » entre le sauvage WS et le mutant surexpresser E. | - 22 - |
| Figure 17: Localisation membranaire de la protéine fusion PROSCOOP12::RFP suite à une plasmolyse au glycérol 30%..... | - 23 - |
| Figure 18: Localisation de la protéine fusion PROSCOOP12::RFP suite à une plasmolyse au CaCl ₂ 1M. | - 24 - |
| Tableau 1 : Lignées du mutant surexpresser obtenues..... | - 20 - |

Partie I - INTRODUCTION

1.1. CONTEXTE SCIENTIFIQUE ET ENJEUX

Pour favoriser leur développement, leur croissance et leur défense face aux agressions extérieures constantes, les plantes sont capables de mettre en place des réseaux de signalisation et des mécanismes de régulation complexes. Par exemple, une agression par un agent pathogène est rapidement perçue par la plante et des modifications en cascades de l'activité métabolique des cellules sont mises en place pour alerter les cellules voisines et se défendre du stress (Benhamou *et al.*, 2012). Les hormones végétales ont longtemps été considérées comme les principales molécules de signalisation au cours de ces processus. Cependant, la découverte de nombreux petits peptides sécrétés impliqués dans les voies de signalisation a stimulé les recherches dans ce domaine (De Coninck *et al.*, 2016). Ces peptides sécrétés jouent un rôle important du fait de leur interaction directe avec les agents pathogènes ou indirecte via leur fonction dans le développement et les signaux cellulaires mis en place (Murphy *et al.*, 2012; Gust *et al.*, 2017). A présent, il devient crucial de comprendre la communication intercellulaire sous-jacente aux peptides sécrétés pour mieux comprendre la régulation des processus de développement et de défense de la plante et être capable de proposer de futures stratégies d'amélioration considérant conjointement ces deux mécanismes.

Dans ce contexte, une approche pluridisciplinaire associant de la bioinformatique, de la transcriptomique et du phénotypage a permis d'identifier une famille de 14 gènes d'*Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) codant pour des précurseurs de petits peptides sécrétés riches en sérines, nommés *PROSCOOP* 1 à 14 (Gully and Pelletier *et al.*, 2019). Le projet SCOOP - pour Serine riCh endOgenOus Peptides ou l'étude de peptides sécrétés riches en sérines – a été développé dans l'objectif de comprendre et de caractériser plus particulièrement la fonction biologique, actuellement inconnue, d'un des membres de la famille, nommé *PROSCOOP12*. Nos premiers travaux (Gully and Pelletier *et al.*, en 2019), ont montré l'implication de ce gène dans les mécanismes de défense contre les infections pathogènes et dans le développement racinaire chez *A. thaliana*. Afin de mieux comprendre le rôle de *PROSCOOP12* dans la régulation du développement, deux pistes d'études semblent intéressantes à suivre. La première repose sur une caractérisation phénotypique de deux mutants pour le gène *PROSCOOP12* pour observer ses effets propres sur le développement de la plante, et notamment le développement racinaire. La seconde étude consiste en la caractérisation de la localisation subcellulaire du propeptide afin de préparer l'identification de ses partenaires protéiques et notamment de son récepteur ; l'identification du couple peptide-récepteur, à l'origine des processus moléculaires induits, est en effet le challenge actuel des recherches dans ce domaine. Les avancées sur ces deux pistes expérimentales font ainsi l'objet de ce mémoire de fin d'étude.

1.2. CONNAISSANCES SCIENTIFIQUES

1.2.1. Les peptides sécrétés

D'importants progrès dans la caractérisation des peptides sécrétés et la compréhension des voies de signalisation sous-jacentes ont été faits ces dernières années. En effet, il a été montré que les peptides sécrétés jouent un rôle majeur aussi bien dans les mécanismes de défense face aux agents pathogènes que dans les processus de croissance et de développement (Murphy *et al.*, 2012; Marmioli and Maestri, 2014; Gust *et al.*, 2017). Ces

petits peptides sécrétés peuvent jouer également le rôle d'hormones peptidiques, appelées aussi phytocytokines en raison de fonctions similaires aux cytokines animales, qui sont cruciales pour la communication intercellulaire (Watowich *et al.*, 1996; Taverna *et al.*, 2014).

La systémine fut la première hormone peptidique identifiée chez la tomate (Ryan *et al.*, 1998). Elle est impliquée dans la réponse de défense contre les blessures mécaniques et induit l'expression de plus de 15 gènes de défense (Ryan *et al.*, 1998). Chez *Arabidopsis*, plus de 1000 précurseurs de peptides sécrétés, d'environ 70 à 120 acides aminés (aa) sont prédits mais les fonctions biologiques et biochimiques d'une grande majorité d'entre eux restent toujours inconnues (Lease *et al.*, 2006). Plusieurs raisons peuvent expliquer ce manque de données. Leur découverte est très récente car leur très petite taille et leur faible niveau de conservation les rendent difficile à détecter par les procédures d'annotation bioinformatiques des génomes (Silverstein *et al.*, 2007). De plus, des redondances fonctionnelles sont fréquemment observées au sein d'une même famille (Matsubayashi, 2014) et rendent donc les approches de caractérisation *via* des mutants KO (mutant « Knock Out » ou encore mutant « nul ») difficiles à exploiter.

Les peptides sécrétés peuvent être majoritairement classés dans deux groupes distincts (figure 1): (i) les petits peptides modifiés (5 à 20 aa) qui sont les cibles de modifications post-traductionnelles (Murphy *et al.*, 2012) (et font l'objet de ce mémoire) et les (ii) peptides riches en cystéines (environ 50 aa) qui sont caractérisés par un nombre important de résidus cystéines impliqués dans les ponts disulfures intramoléculaires (Tavormina *et al.*, 2015).

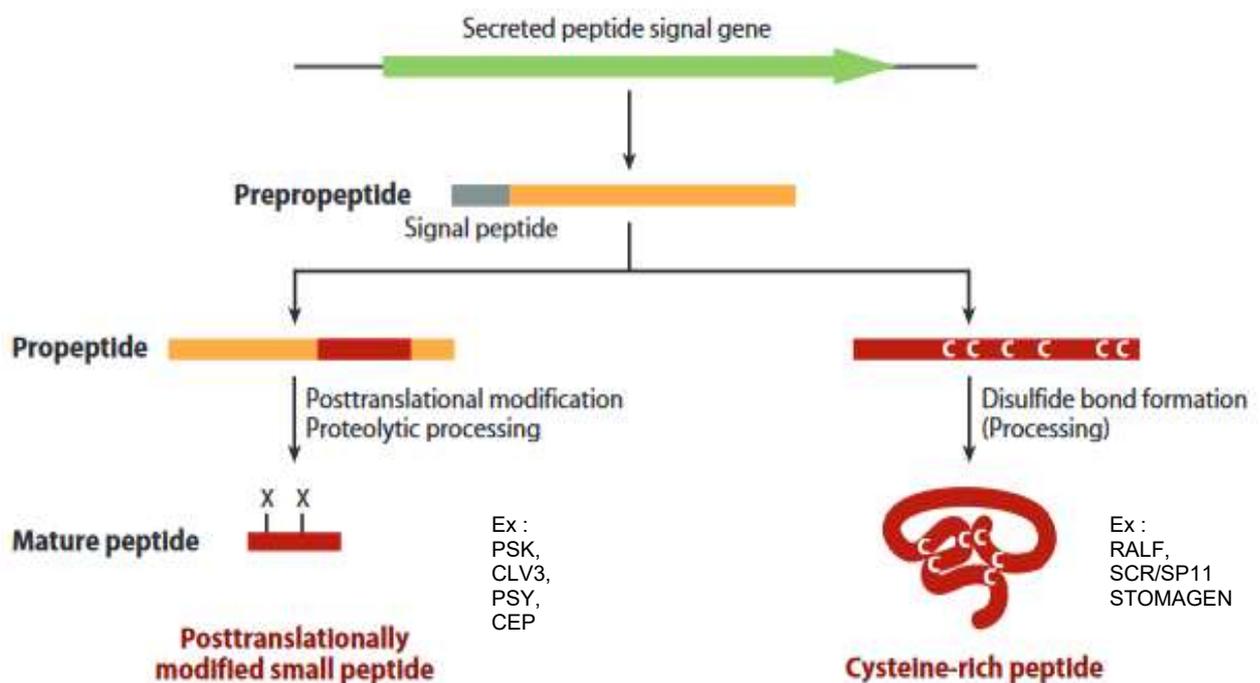


Figure 1 : Deux grands groupes de peptides sécrétés classés selon leurs caractéristiques structurelles (Matsubayashi, 2014).

Les peptides comportant des modifications post-traductionnelles complexes suivies d'un traitement protéolytique sont appelés « petits peptides post-traductionnellement modifiés » ; les peptides comportant la formation de liaisons disulfures intramoléculaires sont définis comme des peptides riches en cystéine.

Légende : en jaune, la séquence du gène codant pour le prépropeptide ; en gris, le peptide signal ; en rouge la séquence active du peptide sécrété.

Ces deux classes de peptides dérivent initialement d'une protéine précurseur inactive appelé pré-propeptide d'une taille plus importante (De Coninck *et al.*, 2016). Ce pré-propeptide présente une région appelée « peptide d'adressage » à l'extrémité N-terminale pouvant être prédite par les logiciels SignalP (Bendtsen *et al.*, 2004) et PREDOTAR (Small *et al.*, 2004) et qui est responsable de l'adressage de la protéine dans le réticulum endoplasmique (RE). Les petits peptides modifiés se caractérisent par une région centrale variable et une courte séquence conservée (de 5 à 15 aa) à l'extrémité C-terminale, correspondant au peptide mature sécrété (Marshall *et al.*, 2011; Matsubayashi, 2014). Cette dernière peut être détectée grâce à l'algorithme MEME (Bailey *et al.*, 2015) qui s'appuie sur l'analyse de plusieurs protéines homologues. Suite aux processus de clivage et d'adressage au RE, le propeptide (dénué de son peptide d'adressage) subit des modifications post-traductionnelles conduisant à la maturation et à la sécrétion du peptide « mature » aussi dit « sécrété », *via* sa voie de sécrétion spécifique (Matsubayashi, 2014).

Outre leur rôle dans les mécanismes de défense comme molécules clés de signalisation du système immunitaire, de nombreux petits peptides post-traductionnellement modifiés sont également impliqués dans les processus de développement (Segonzac *et al.*, 2019; Gust *et al.*, 2017) et notamment dans le contrôle du développement racinaire chez *A. thaliana*. C'est le cas des peptides AtPep1, ou encore des familles de peptides CEP (C-TERMINALLY ENCODED PEPTIDE) et CLE (CLV3/ESR-related peptide) (Bartels *et al.*, 2015; Delay *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2010). Le phénotype du mutant *proscop12* chez *A. thaliana*, montre également une implication du peptide SCOOP12 dans le développement de la racine (Gully and Pelletier *et al.*, 2019). Ce mémoire se concentre ainsi particulièrement sur son rôle dans cet organe.

1.2.2. Croissance et développement des racines

L'extrémité de la racine d'*A. thaliana* est compartimentée en trois zones distinctes (figure 2): la zone méristématique ou de division cellulaire, la zone d'élongation cellulaire et la zone de différenciation cellulaire (Dolan *et al.*, 1993; Schiefelbein *et al.*, 1991; Dunand *et al.*, 2007).

La zone méristématique est la région dans laquelle se trouvent les cellules initiales indifférenciées (Van den Berg *et al.*, 1997). De nombreuses divisions cellulaires ont lieu dans cette zone pour produire de nouvelles cellules (Verbelen *et al.*, 2006). Celles-ci s'allongent dans la zone d'élongation, où elles perdent leur capacité à se diviser mais subissent d'importants changements comme le développement d'une vacuole, la réorganisation du cytosquelette et des modifications de la paroi (Verbelen *et al.*, 2006). Cette dernière joue un rôle important dans l'expansion cellulaire. En effet, le relâchement de la paroi permet aux cellules de se dilater, tandis que la réticulation de la paroi empêche leur allongement. Enfin, dans la zone de différenciation, les cellules ralentissent progressivement leur allongement et ne subissent qu'un allongement mineur pour atteindre finalement leur longueur adulte (Verbelen *et al.*, 2006). Les cellules commencent à acquérir leurs attributs différenciés finaux

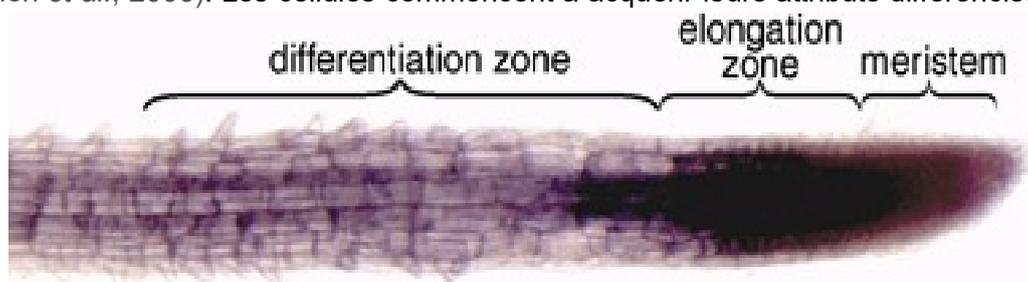


Figure 2 : Organisation de la racine d'*Arabidopsis thaliana* en trois zones distinctes.
Barre verticale noire = 100µm. (Dunand *et al.*, 2007).

comme la formation de poils racinaires (Steeves *et al.*, 1989). Au-delà de cette zone, les cellules sont différenciées et matures et leur taille n'augmente plus (Schiefelbein *et al.*, 1991). Il est estimé que les cellules atteignent ce stade après 25 à 30 jours de croissance (Wang *et al.*, 2000). Les cellules matures sont ainsi spécialisées et ont acquis leurs caractéristiques et leurs fonctions spécifiques (Verbelen *et al.*, 2006).

L'organisation cellulaire entre ces différentes zones est très coordonnée (Schaefer, 2014) et les frontières entre ces zones s'harmonisent en fonction de leurs activités cellulaires caractéristiques (Verbelen *et al.*, 2006). En conditions optimales, la croissance de la racine primaire chez *A. thaliana* s'arrête après 4 à 5 semaines. Elle est déterminée et le méristème ne produit plus de nouvelles cellules (Baum *et al.*, 2002; De Tullio *et al.*, 2010). Néanmoins, la racine est très sensible et réactive aux conditions environnementales influençant l'organisation du méristème. Dans des conditions non favorables, le méristème se réorganise immédiatement et les divisions cellulaires n'ont plus lieu. La croissance de la racine est inhibée et la production de racines secondaires peut augmenter. Par exemple, une déficience en phosphate provoque chez *A. thaliana* la différenciation progressive des cellules méristématiques et un arrêt précoce de la croissance de la racine (Sanchez-Calderon *et al.*, 2005).

Le développement de la racine est ainsi sous contrôle génétique, hormonal et environnemental et cette régulation complexe en fait un organe très sensible (Torrey, 1976; Feldman, 1984; Garay-Arroyo *et al.*, 2012). Mais, son développement peut également être soumis à une régulation par la teneur en certains métabolites secondaires que produit la plante au cours de ces processus physiologiques. Ainsi, les espèces réactives de l'oxygène connues (ROS pour Reactive Oxygen Species) ont été identifiées comme impliquées dans les processus de développement (Schopfer *et al.*, 2002).

1.2.3. Les espèces réactives de l'oxygène

Au cours des nombreuses réactions métaboliques des cellules, comme la consommation de l'oxygène par les mitochondries, des ROS, dérivés de la réduction de l'oxygène, sont produits. Ces ROS sont des radicaux oxygénés très réactifs chimiquement du fait de la présence d'un électron non apparié (Podgórska *et al.*, 2017).

1.2.3.a Implication dans les processus de défense de la plante

Les ROS ont longtemps été considérés comme des métabolites associés à des événements toxiques. En effet, ils sont impliqués dans de nombreuses réactions de défense des plantes et notamment dans la réponse hypersensible et la mort cellulaire programmée pour éviter l'invasion des cellules voisines par un agent pathogène (Mur *et al.*, 2008). Plus précisément, les divers stress environnementaux, biotiques et abiotiques, entraînent une production de ROS excessive et cette surproduction conduit les cellules vers un état de « stress oxydatif ». Celui-ci provoque progressivement la peroxydation des lipides, l'oxydation des protéines, l'endommagement des acides nucléiques, l'inhibition enzymatique, l'activation de la voie de la mort cellulaire programmée et finalement la mort des cellules (Shah *et al.*, 2001; Mittler, 2002; Sharma *et al.*, 2012; Maheshwari and Dubey, 2009; Srivastava and Dubey, 2011; Meriga *et al.*, 2004).

Cependant, en absence de stress les plantes produisent également des ROS en quantité constante. La teneur en ROS est à l'état d'équilibre ; on parle d'homéostasie, entre la quantité de ROS produits et leur élimination. Des études ont souligné l'importance de ces ROS à l'état homéostatique et leur rôle en tant que messagers secondaires responsables des

communications intercellulaires impliquées dans les processus de développement de la plante (Schopfer *et al.*, 2002).

1.2.3.b Rôle dans le développement racinaire

Que les ROS agissent comme « molécules dommageables » ou comme molécules de signalisation dépend de l'équilibre délicat entre la production de ROS et leur piégeage et élimination. En raison des rôles multifonctionnels des ROS, il est nécessaire que les cellules contrôlent étroitement leur quantité pour éviter d'une part tout stress oxydatif et d'autre part leur élimination totale. Le piégeage, ou la détoxification, de l'excès de ROS est réalisé par un système antioxydant efficace comprenant des antioxydants non enzymatiques ainsi que des antioxydants enzymatiques (Sharma *et al.*, 2012). *Via* cette régulation des ROS, les cellules contrôlent de nombreux processus de développement et cela est particulièrement le cas dans la racine. Foreman *et al.* (2003) et Renew *et al.* (2005) l'ont mis en évidence avec les mutants *rhd2* présentant des racines 20% plus courtes que celles du sauvage ; phénotype corrélé à un niveau de ROS plus faible. Ils ont ainsi montré que le gène *RHD2* code pour une NADPH oxydase (NOX), une protéine capable de transférer des électrons du NADPH à l'oxygène et conduisant ainsi à la formation de ROS.

Au sein de l'extrémité racinaire, trois principales ROS jouent un rôle majeur dans la signalisation cellulaire et la croissance. Il s'agit de l'ion superoxyde $O_2^{\cdot-}$, du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et du radical hydroxyle $OH\cdot$. Chez *A. thaliana*, chacun de ces ROS possède un rôle complexe et spécifique et leur répartition spatiale dans les différentes zones de la racine influence leur fonction (Sadhukhan *et al.*, 2019), (figure 3).

Les NADPH oxydases (NOX) présentes dans les membranes plasmiques des cellules méristématiques sont capables de catalyser la réduction d'un électron de l'oxygène (O_2) à la surface des cellules et conduisent ainsi à la formation de l'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$ (Foreman *et al.*, 2003). Cet anion peut être converti en peroxyde d'hydrogène, H_2O_2 , de manière spontanée ou *via* la catalyse enzymatique de la superoxyde dismutase (SOD) (Dunand *et al.*, 2007). L' H_2O_2 peut également être produit de manière indépendante de l' $O_2^{\cdot-}$ par d'autres enzymes, telles les peroxydases (POD) de type III présentes dans l'apoplasme des cellules (Elstner *et al.*, 1976). L' $O_2^{\cdot-}$ et l' H_2O_2 sont accumulés dans les zones méristématiques et d'élongation de la racine et leur accumulation favorise la formation de l' $OH\cdot$ dans la zone d'élongation (Liszkay *et al.*, 2004). Ce radical hydroxyle s'accumule plus précisément dans les parois des cellules (Liszkay *et al.*, 2004; Renew *et al.*, 2005) et, en favorisant la scission des polymères de pectines et de xyloglucanes, il contribue au relâchement de la paroi et ainsi à l'élongation des cellules (Fry, 1998; Miller, 1986).

Lorsque la croissance des cellules cesse dans la zone d'élongation, elles se différencient dans la zone de différenciation. Une production plus importante d' H_2O_2 catalysée par les peroxydases pariétales dans cette zone contribue, cette fois-ci, à une réticulation des polymères et à la formation de liaisons complexes dans la paroi (Hohl *et al.*, 1992; Schopfer, 2002). Celle-ci se raidit, empêchant la cellule de s'étirer et stoppant ainsi son élongation. D'autres expérimentations ont mis en évidence une étroite corrélation entre la production d' H_2O_2 et l'arrêt de croissance. En effet, l'application exogène de peroxyde d'hydrogène induit une inhibition du développement racinaire (Schopfer, 1996) et un stress salin sur racine d'*A. thaliana* provoque une forte accumulation d' H_2O_2 et un arrêt de la croissance (Lin *et al.*, 2001).

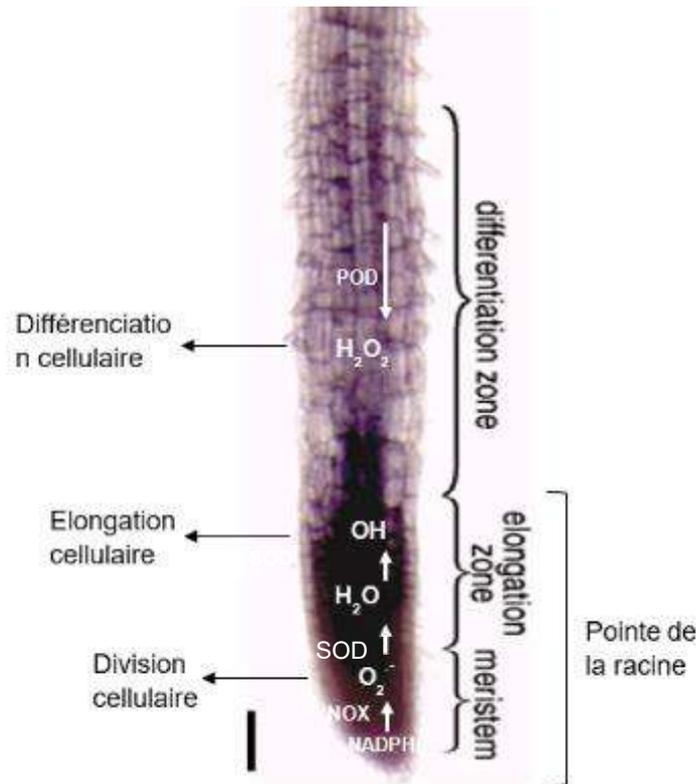


Figure 3 : Répartition spatiale des ROS selon les trois zones de la racine d'*Arabidopsis thaliana*.

Barre horizontale noire = 100 µm. Adapté de Dunand *et al.*, 2007.

Enzymes NOX : NADPH oxydases - SOD : superoxyde dismutase - POD : peroxydases

A l'état homéostatique, les ROS sont donc impliqués dans chacune des zones de la racine et sont capables de contrôler des mécanismes antagonistes comme l'élongation des cellules (Potikha *et al.*, 1999; Liskay *et al.*, 2004) et leur rigidification lors de l'arrêt de leur croissance et de leur différenciation (Pomar *et al.*, 2002). Leur rôle dépend de la zone dans laquelle ils sont accumulés et leur régulation est soumise à un réseau complexe d'interactions enzymatiques, hormonales et peptidiques. Il a par exemple été montré chez *A. thaliana* que les peroxydases de type III sont régulées par le facteur de transcription RSL4, lui-même activé par l'auxine (Marzol, 2018).

1.3. INTRODUCTION AU STAGE

1.3.1. Expression du gène précurseur *PROSCOOP12*

Une analyse approfondie a débuté en 2016 sur le 12^{ème} membre de la famille *PROSCOOP* qui est composée de 14 gènes homologues chez *Arabidopsis*. Ce gène est référencé dans le site de référence TAIR par l'identifiant AT5G44585. Il a été nommé *PROSCOOP12*, la protéine codée *PROSCOOP12* et le peptide putatif sécrété *SCOOP12*. Une étude de données transcriptomiques accumulées autour de ce gène, a révélé qu'il était impliqué dans de nombreux processus et notamment dans les mécanismes de défense contre les agents pathogènes, contre le stress oxydatif mais aussi dans le processus de développement racinaire chez *A. thaliana* (figure 4).

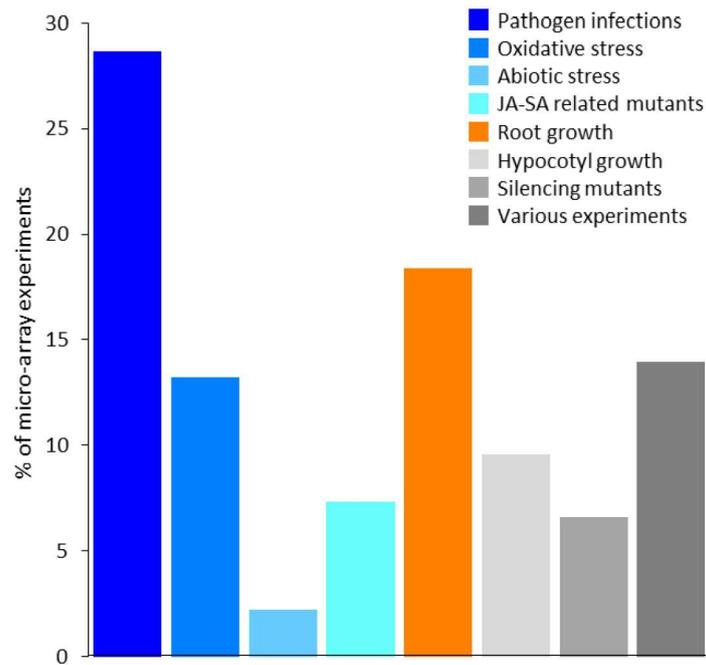


Figure 4 : Bilan des 136 expériences dans lesquelles le gène *AT5G44585* est différentiellement transcrit. (Gully and Pelletier et al, 2019).

1.3.2. Etudes préliminaires du précurseur et du peptide prédit

1.3.2.a La mutation KO du gène précurseur *PROSCOOP12* induit un phénotype racinaire

Le gène *PROSCOOP12* a été muté par l'insertion d'un ADN de transfert (l'ADN-T FLAG_394H10 (Gully and Pelletier et al., 2019)), de manière à inactiver son expression dans

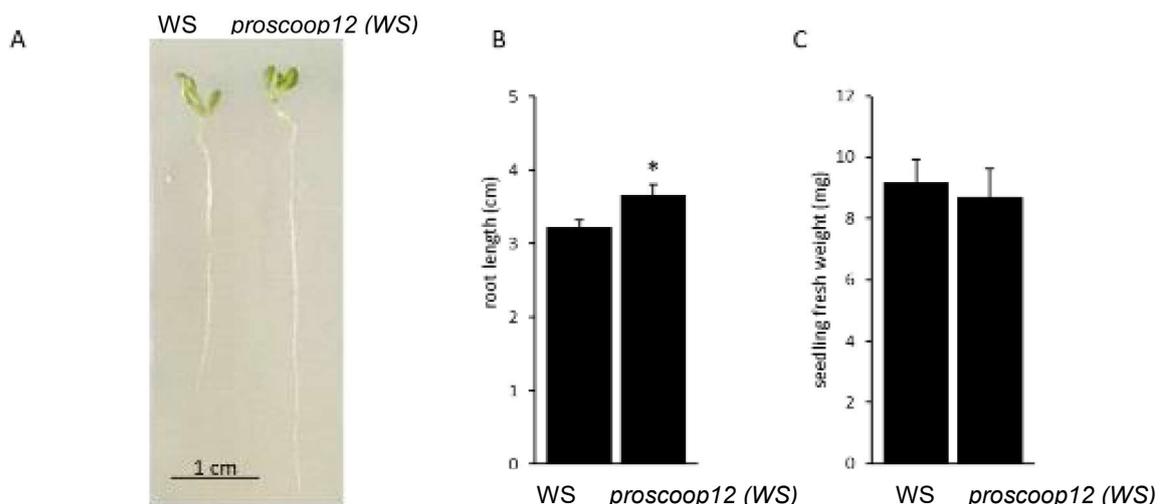


Figure 5 : Comparaison phénotypique entre les mutants *proscop12* et les plantes sauvages WS et *Col-0*. (Gully and Pelletier et al, 2019).

(A, B) Phénotypes de croissance racinaire après 10 jours de croissance en jour court. Un test de Student a révélé que la différence de longueur de racine entre les types sauvages et mutants est très significative (* $P < 0,05$). (C) Poids frais de plantules déterminé après 10 jours de croissance.

Les barres indiquent la combinaison de deux répétitions biologiques (25 plantules chacune) et les barres d'erreur indiquent \pm l'écart-type standard de la moyenne.

les lignées mutantes. Un phénotype racinaire a été mis en évidence sur les mutants KO *proscop12*, dans les fonds génétiques Col-0 et WS : un allongement de la racine principale (figure 5), observable après 11 jours de croissance. Aucune différence entre le poids frais des plantes sauvages et mutantes n'a par contre été mise en évidence. Ceci souligne que l'allongement des racines chez les mutants n'est pas dû à une augmentation de la vitesse de croissance des plantules.

1.3.2.b Prédiction du peptide sécrété SCOOP12

La protéine PROSCOOP12 est constituée de 78 acides aminés (figure 6). Elle contient un peptide signal de 28 acides aminés en position N-terminale, prédit par les logiciels SIGNALP (Nielsen, 2017) et PREDOTAR (Small *et al.*, 2004). En prenant en compte les 60 protéines homologues détectées dans les bases de données, exclusivement chez les *Brassicaceae*, l'algorithme MEME (Bailey *et al.*, 2015) prédit un motif relativement conservé de 13 aa, du côté C-terminal. Ce motif pourrait correspondre à un peptide mature sécrété et pose l'hypothèse de la présence d'un ou plusieurs sites de clivage protéolytique dans le précurseur protéique PROSCOOP12.

MRNTISSKMGQVLIVLLLLCTVLCRTESALPSGQHSVLLTGRRLMGSGASG**PVRSSQSSQAGGR**FNDADPIAIDYGKY

Figure 6 : Séquence de la protéine PROSCOOP12.

Les logiciels SIGNALP (Nielsen, 2017) et PREDOTAR (Small *et al.*, 2004) prédisent la présence d'un peptide signal de 28 acides aminés en N-terminal (en bleu). L'algorithme MEME (Bailey *et al.*, 2015) prédit un peptide mature côté C-terminal de 13 acides aminés (en vert).

1.3.2.c Application exogène du peptide de synthèse SCOOP12

La séquence prédite par l'algorithme MEME du peptide SCOOP12 (figure 6) a été synthétisée (Eurogentec ®) dans le but d'explorer ses fonctions. L'application exogène du peptide de synthèse sur des plantules en croissance d'*A. thaliana* d'écotype Col-0 a montré que le peptide induit une réponse immunitaire (Annexe I) en augmentant la synthèse de ROS, en induisant l'expression de gènes de défense spécifiques comme le gène *FLG22-INDUCED RECEPTOR-LIKE KINASE1 (FRK1)*, ou encore en induisant la déposition de callose dans les feuilles (Gully and Pelletier *et al.*, 2019). De plus, l'application exogène du peptide SCOOP12, à une concentration de 1µM, conduit à une inhibition du développement des plantules.

Ce peptide est donc impliqué dans deux processus, à savoir la défense et le développement de la plante. De plus, son application sur d'autres espèces de la famille des Brassicacées comme le colza, ou d'autres familles comme les Solanacées, montre une spécificité du peptide à la plante *A. thaliana* (Annexe II).

1.3.2.d Localisation du propeptide

Au cours de l'expression transitoire sur feuille de *Nicotiana benthamiana* (*N. benthamiana*) du gène *PROSCOOP12* fusionné au gène codant pour le marqueur fluorescent RFP (cassette en annexe III), la localisation cellulaire de la protéine PROSCOOP12 a été observée sous microscopie confocale à balayage laser (figure 7).

Plusieurs marqueurs fluorescents ont été utilisés pour différencier les compartiments cellulaires et localiser la protéine fusion PROSCOOP12::RFP. Les feuilles infiltrées ont été colorées au calcofluor dont la fluorescence bleue est détectée à 417-488nm et marque la paroi pectocellulosique (figure 8, c-f). La molécule YFP, de fluorescence jaune, est détectée à 500-550nm. Fusionnée aux aquaporines membranaires, elle permet de visualiser la membrane plasmique (figure 7, d-f). La RFP est détectée à 568-614nm. Fusionnée à la protéine

PROSCOOP12, elle permet de visualiser en rouge sa localisation au niveau cellulaire (figure 7, e-f). Ces images révèlent une fluorescence spécifique de la protéine fusion qui co-localise avec les fluorescences des marqueurs membranaire et pariétal, au niveau des extrémités des cellules. Il n'est pas possible d'identifier plus clairement la localisation de la protéine fusion puisque les cellules sont à l'état de turgescence. Une plasmolyse est une technique qui pourra être appliquée afin de provoquer un stress osmotique et décoller la membrane plasmique de la paroi. De cette manière, il sera possible d'observer plus précisément la localisation de la fluorescence rouge émise par la protéine fusion PROSCOOP12::RFP.

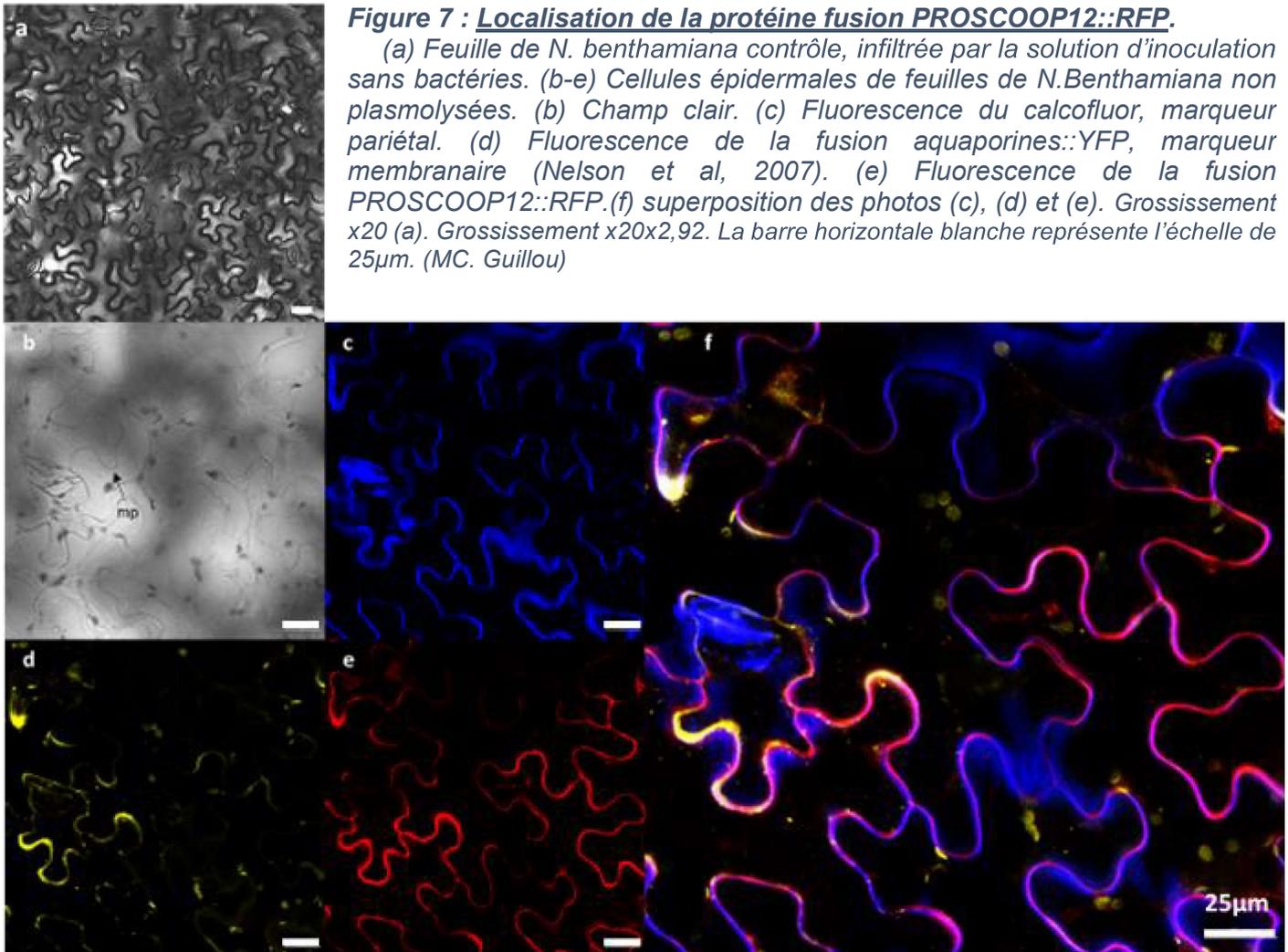


Figure 7 : Localisation de la protéine fusion PROSCOOP12::RFP.

(a) Feuille de *N. benthamiana* contrôle, infiltrée par la solution d'inoculation sans bactéries. (b-e) Cellules épidermiques de feuilles de *N. Benthamiana* non plasmolisées. (b) Champ clair. (c) Fluorescence du calcofluor, marqueur pariétal. (d) Fluorescence de la fusion aquaporines::YFP, marqueur membranaire (Nelson et al, 2007). (e) Fluorescence de la fusion PROSCOOP12::RFP. (f) superposition des photos (c), (d) et (e). Grossissement x20 (a). Grossissement x20x2,92. La barre horizontale blanche représente l'échelle de 25µm. (MC. Guillou)

1.3.2.e Conclusion des premières recherches

En conclusion, SCOOP12 appartient à une nouvelle famille de peptides prétendument sécrétés, spécifiques d'*A. thaliana*. D'un point de vue fonctionnel, ce peptide est classé comme une phyto cytokine (comme la systémine, et les PIP (Vie et al., 2015)). L'implication de PROSCOOP12 et précisément du peptide SCOOP12 dans les processus de défense a été clairement définie par Gully and Pelletier et al., en 2019 et des résultats ont également montrés l'implication du gène dans certains processus de développement. De plus, les analyses de données transcriptomiques recueillies à partir de feuilles d'*A. thaliana* mutants et sauvages ont mis en évidence d'une part l'action négative du gène PROSCOOP12, codant pour le peptide SCOOP12, sur la réponse antioxydante et d'autre part son effet positif sur la production de ROS au niveau des feuilles. Par analogie, nous pouvons supposer une action similaire du peptide sur la régulation des ROS au niveau racinaire, ce qui pourrait expliquer le phénotype d'allongement des racines chez le mutant *proscoop12*. Ainsi, SCOOP12 pourrait

jouer un rôle en tant que modérateur des réponses de défense, ainsi que dans l'allongement des racines (figure 8), pour prévenir les pertes d'énergies inutiles (Walters *et al.*, 2007).

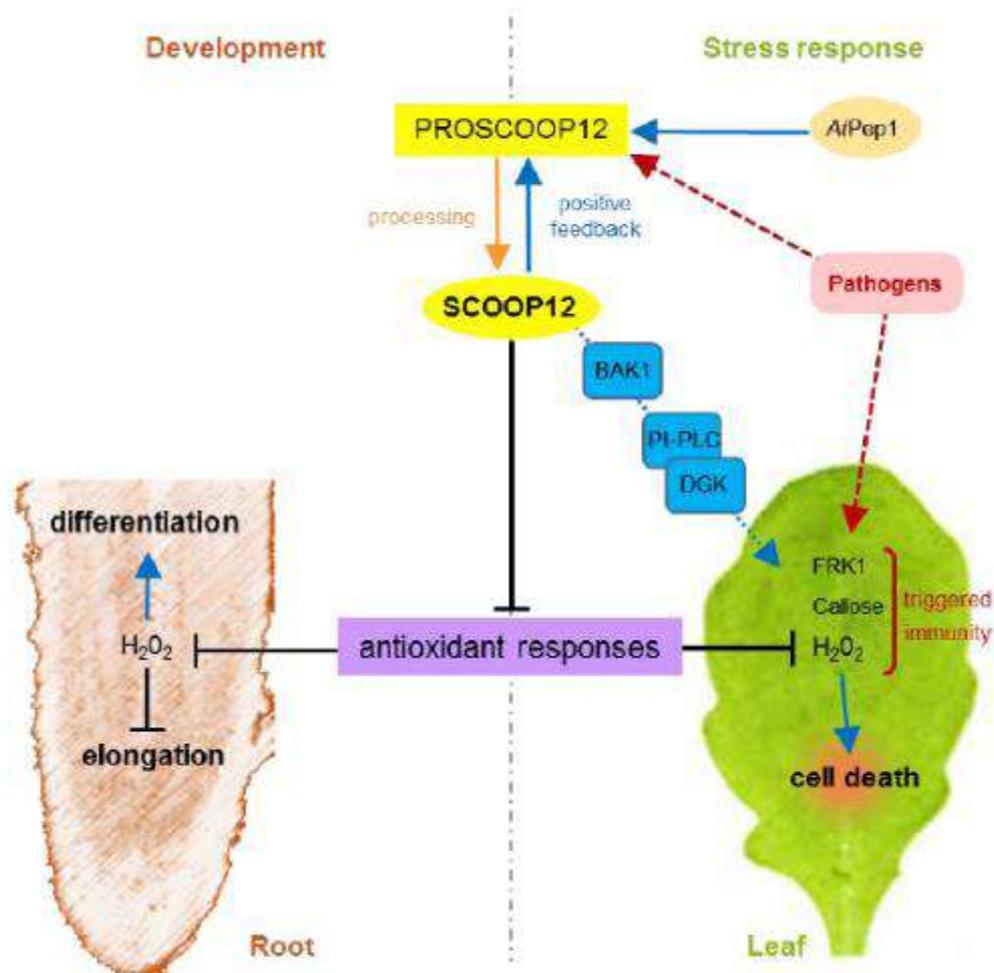


Figure 8 : Modèle putatif expliquant les fonctions du peptide SCOOP12 dans le développement racinaire et la réponse au stress biotique par l'inhibition de la protection contre le stress oxydatif. (Gully and Pelletier *et al.*, 2019).

Les flèches en pointillés rouges représentent l'action des agents pathogènes ; les effets d'induction et de répression sont représentés respectivement en bleu et en noir.

PI-PLC, phospholipase C spécifique du phosphatidylinositol ; DGK, diacylglycérol kinase.

1.3.3. Problématique, objectifs du stage et stratégie mise en place

Les fonctions des peptides sécrétés tels que SCOOP12, aux frontières du développement et de la défense, ouvrent la voie à de futures stratégies d'amélioration considérant à la fois la qualité de développement des plantes et de nouveaux traits de résistance. Dans ce contexte, il est nécessaire de mieux identifier les voies de signalisation sous-jacentes à ces peptides afin de mieux comprendre leurs mécanismes d'action.

Dans ce sens, la problématique de ce stage est de mieux comprendre l'implication du gène *PROSCOOP12* dans les processus de développement chez *A. thaliana* afin d'identifier les voies de signalisation déclenchées par le peptide SCOOP12. Comment participe-t-il au

contrôle du développement racinaire ? Régule-t-il de manière spécifique l'accumulation des ROS dans la racine comme nous l'avons précédemment identifié dans les feuilles (Gully and Pelletier *et al*, 2019) ? Où est localisé le propeptide de SCOOP12 dans la cellule, prélude au développement de stratégies pour identifier ses interacteurs ?

Les objectifs de ce stage sont donc doubles. Nous souhaitons d'une part étudier plus précisément l'implication du gène *PROSCOOP12* dans le contrôle du développement racinaire de la plante et nous cherchons d'autre part à localiser le propeptide au niveau cellulaire afin de valider sa fonction biochimique et d'optimiser la recherche de ses partenaires protéiques.

Pour répondre aux objectifs, deux stratégies expérimentales sont mises en place. La première stratégie concerne l'étude des effets de deux mutations : (i) la première empêchant l'expression de *PROSCOOP12* (mutant KO *proscoop12*) et (ii) la seconde induisant sa surexpression de manière constitutive grâce à un promoteur 35S situé en amont (mutant surexpresser). En s'appuyant sur des approches complémentaires d'imagerie cellulaire et de biochimie, nous cherchons à expliquer le phénotype d'allongement racinaire observé chez le mutant *proscoop12*. En effet, grâce aux techniques de coloration ciblant spécifiquement les différents ROS, l'analyse de leur accumulation respective au sein des extrémités racinaires sauvages et mutantes pourrait permettre d'identifier un lien avec l'allongement racinaire. Le second axe stratégique consiste à localiser la protéine fusion 35S::PROSCOOP12::RFP au niveau cellulaire dans l'objectif, à terme, d'identifier les partenaires protéiques de SCOOP12. Pour cela l'expression de la protéine fusion est étudiée en transitoire chez l'espèce *Nicotiana benthamiana*). Sa localisation permettra de cibler plus précisément les compartiments cellulaires dans lesquels le récepteur pourrait être isolé.

Partie II - MATERIEL ET METHODE

2.1. MATERIEL

Le matériel végétal utilisé est le type sauvage *Arabidopsis thaliana* L. Heynh écotypes Columbia (Col-0) et Wassilewskija (WS).

Trois lignées mutantes ont été étudiées :

- Le mutant KO homozygote *proscop12* dans le fond génétique WS est un descendant homozygote de la lignée transformée via l'ADN-T FLAG_394H10 (Gully and Pelletier *et al.*, 2019).
- Le mutant KO homozygote *proscop12* dans le fond génétique Col-0, créé par la technique du CRISPR/Cas9 par Gully and Pelletier *et al.*, 2019.
- Le mutant 35S::*PROSCOOP12*::RFP (cassette génique en annexe III), générations F0 et F1 dans le fond génétique WS contient la construction génique 35S::*PROSCOOP12*::RFP. Il sera nommé mutant « surexprimeur » dans ce mémoire car les plantes transformées surexpriment de manière constitutive le gène *PROSCOOP12*.

Les plants de tabacs utilisés appartiennent à l'espèce modèle *Nicotiana benthamiana*.

La souche d'agrobactérie contenant la construction aquaporine::YFP (produite par Nelson *et al.*, 2007) a été fournie par les auteurs. La souche bactérienne contenant la construction 35S::*PROSCOOP12*::RFP a été réalisée par l'IRHS lors d'une étude précédente à partir du vecteur de destination pEAQ-RFP fourni par Albenne *et al.*, 2014 (Evrogen réf.# FP141). La souche C58C1 d'*Agrobacterium tumefaciens* a été utilisée comme vecteur de transformation génétique.

2.2. METHODES

2.2.1. Conditions de culture des plantes

Les graines des mutants *proscop12* dans les fonds génétiques WS et Col-0 ainsi que les graines sauvages correspondantes ont été stérilisées à l'éthanol 70% et ont été semées *in vitro* sur milieu « Murashige and Skoog » (MS, Duchefa ®). Après 48h de stratification à l'obscurité et à 4°C elles ont été mises en culture verticale en condition de jours courts : 8h de lumière à 22°C / 16h d'obscurité à 21°C, avec une humidité relative de 70%.

Les mutants surexprimeurs ont été cultivés sur terreau (Traysubstrat ®) en condition de jours longs : photopériode de 16h de lumière à 22°C / 8h d'obscurité à 21°C, avec une humidité relative de 70%.

Les plants de tabac *Nicotiana benthamiana* ont été cultivés sur terreau (Traysubstrat ®) en condition de jours longs : photopériode de 16h de lumière à 20°C / 8h d'obscurité à 22°C, avec une humidité relative de 80%.

2.2.2. Conditions de culture des bactéries

Les souches d'agrobactéries contenant les constructions aquaporine::YFP et 35S::P19 ont été cultivées dans 25 ml de milieu LB (Lysogeny Broth ou Luria-Bertani) contenant 50 µg/µl de l'antibiotique Kanamycine et 25µg/µl de l'antibiotique Gentamycine. La souche bactérienne 35S::*PROSCOOP12*::RFP a été cultivée dans 25 ml de milieu LB contenant 50 µg/µl de Kanamycine.

2.2.3. Techniques d'imagerie cellulaire

2.2.2.a Observation morphologique des cellules

Pour étudier le phénotype d'allongement racinaire du mutant *proscop12* dans les fonds génétiques Col-0 et WS, des racines mutantes et sauvages de 11 jours ont été mises à tremper dans une solution d'iodure de propidium (IP, Sigma ®) à 5µl/ml pendant 3 minutes. L'IP permet de marquer les parois des cellules végétales grâce à sa fixation autour des contours cellulaires. Utilisé en microscopie confocale, il permet d'observer la morphologie des cellules du tissu racinaire chez *Arabidopsis thaliana* (Amano *et al.*, 2007). L'IP a été excité à 514nm en utilisant un filtre d'émission à 617nm. Les racines ont été montées entre lame et lamelle dans de l'eau distillée et observées au microscope confocal à balayage laser (NIKON A1 – NIKON Instruments Europe, France – plateau IMAC).

2.2.2.b Observation des ROS

- **Détection de l'ion superoxide $O_2^{\cdot-}$ au Nitro Blue Tetrazolium (NBT)**

Après 11 jours de croissance les racines mutantes *proscop12* (fonds génétiques WS et Col-0) et les racines sauvages (WS et Col-0) ont été colorées par trempage 15min dans une solution de Nitro Blue Tetrazolium (NBT, Sigma-Aldrich ®) 2µM diluée dans du tampon phosphate 20mM à pH 6.1. La réaction a été stoppée en transférant les racines dans de l'eau distillée puis les extrémités racinaires ont été montées entre lame et lamelle et observées à la loupe Olympus modèle SZX16 (plateau IMAC). Les paramètres ont été identiques pour toutes les photos et l'expérimentation a été répétée deux fois sur 10 plantules pour chaque écotype.

Le tétrazolium est réduit par l' $O_2^{\cdot-}$ présent dans l'apoplasme et forme des dépôts de formazan de couleur bleu-violette (Liszakay *et al.*, 2004). Les photos ont été prises à la loupe binoculaire avec le logiciel « Cell Sens ». La longueur de la surface colorée a été mesurée via le logiciel imageJ grâce à l'outil « Straight » et renseigne sur la longueur du site d'accumulation de l' $O_2^{\cdot-}$ dans l'extrémité de la racine.

- **Détection de l' H_2O_2 intracellulaire au 3,3'-Diaminobenzidine (DAB)**

Après 11 jours de croissance, les racines mutantes *proscop12* (fond génétique Col-0) et les racines sauvages (Col-0) ont été mises à tremper pendant 1 heure dans une solution d'acide citrique 50mM pH3.5 contenant du DAB (3,3'-Diaminobenzidine ; Sigma-Aldrich ®) à 1mg/ml. Les racines ont ensuite été rincées à l'eau distillée puis montées entre lame et lamelle pour une observation à la loupe Olympus modèle SZX16 (plateau IMAC). Les paramètres ont été identiques pour toutes les photos et l'expérimentation a été répétée deux fois sur 10 plantules pour chaque écotype.

Le DAB est oxydé par l' H_2O_2 présent dans les cellules et donne une couleur brun foncé au tissu végétal. Les photos ont été prises à la loupe binoculaire avec le logiciel « Cell Sens » et la longueur de la surface colorée a été mesurée grâce à l'outil « Straight » du logiciel imageJ et renseigne sur la longueur du site d'accumulation de l' H_2O_2 dans la racine.

2.2.2.3. Observation des parois pectocellulosiques au sein des cellules

Des échantillons de feuilles de *N. benthamiana* ont été colorés par trempage dans une solution de calcofluor à 0,1% pendant 15 minutes. Le calcofluor est une molécule fluorescente qui se lie aux structures contenant de la cellulose et de la chitine et permet ainsi de délimiter les parois pectocellulosiques des cellules végétales (Albenne *et al.*, 2014).

2.2.4. Technique de phénotypage

Le mutant 35S::PROSCOOP12::RFP chez l'écotype WS d'*A. thaliana* a été obtenu lors d'une étude précédente. La protéine PROSCOOP12 a été fusionnée au marqueur RFP et se situe en aval du promoteur 35S. Ce dernier permet l'expression constitutive du gène *PROSCOOP12*. L'objectif est d'étudier le phénotype à l'échelle racinaire, induit par la surexpression du gène. Pour cela, il est nécessaire d'obtenir des lignées mutantes stables. Différentes étapes de sélection ont donc été mises en place. Les graines ayant intégré la construction (génération F0) ont été sélectionnées sur milieu gélosé nutritif (milieu MS) avec antibiotique (kanamycine 50µg/µl) selon la méthode décrite par Harrison *et al.*, 2006. Les graines transformées, hétérozygotes pour la construction à chaque site d'insertion, se distinguent facilement par des cotylédons verts alors que les semis non résistants, sauvages, ont des cotylédons pâles. Les plantes F0 obtenues (toutes hétérozygotes) ont été repiquées sur terreau et autofécondées pour donner la génération F1, qui ségrège pour la construction à chaque site d'insertion. Les graines F1 ont été semées sur terreau, non sélectif, et génotypées par PCR (figure 9).

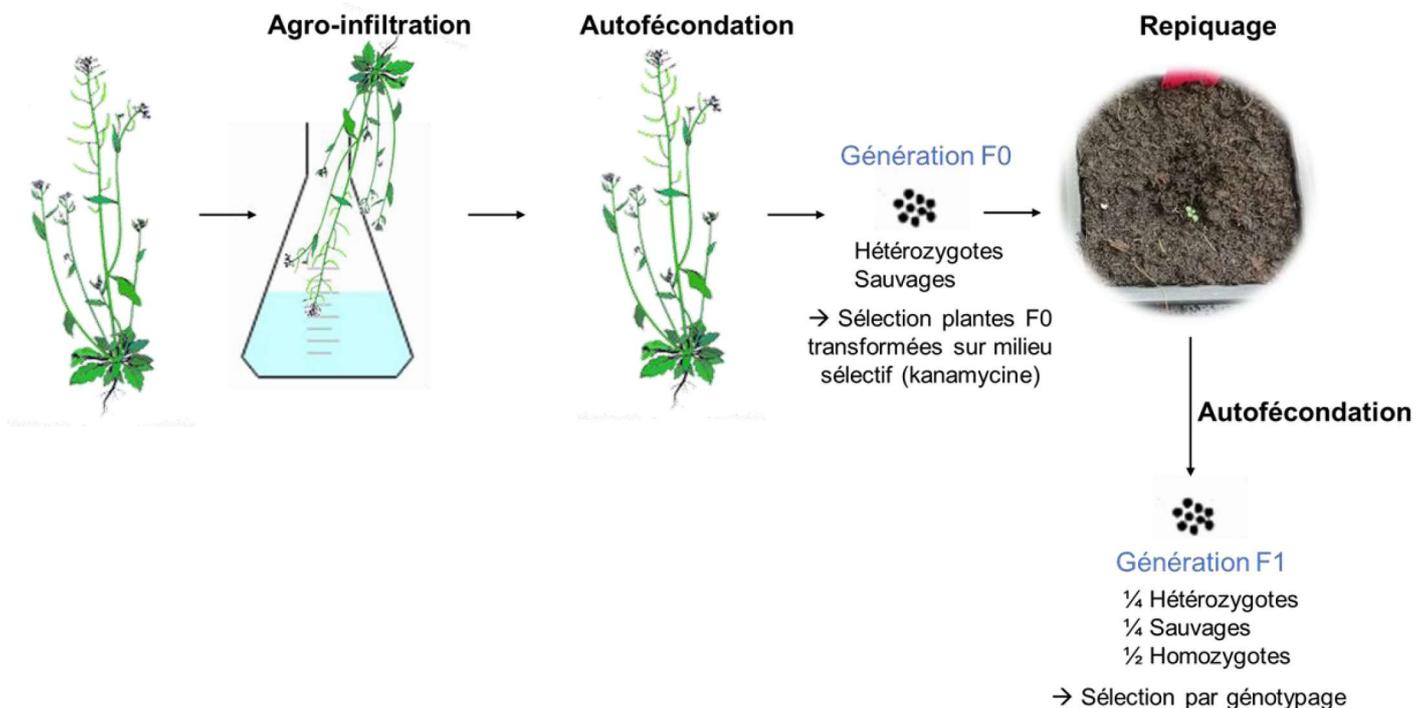


Figure 9 : Schéma d'obtention de graines ayant intégré la construction permettant la surexpression de *PROSCOOP12*.

MC. Guillou.

Au stade F0, les graines peuvent être hétérozygotes pour la mutation ou sauvages. Après autofécondation, les graines de la génération F1 peuvent être hétérozygotes, homozygotes ou sauvages, en proportions $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, respectivement, selon les lois de Mendel.

2.2.5. Génotypage

Le génotypage des plantules F1 permet d'éliminer les plantes sauvages et donc de déterminer les plantes F1 à conserver pour une nouvelle autofécondation qui permettra l'obtention de la génération F2. Le génotypage de cette dernière permettra d'identifier les plantes homozygotes en F1 et donc de stabiliser la lignée mutante et le phénotype.

L'ADN génomique a été extrait selon la méthode rapide décrite par Edwards *et al.*, 1991; à partir de prélèvements de feuilles pour plusieurs plantules résistantes à la kanamycine. Une quantité d'environ 200 ng d'ADN génomique a été ajoutée au mélange PCR contenant 2µM des amorces 5'-3' CGAAGGAAGGAGATTGATGG et 3'-5' CCTCAGGGAAGGACTGCTTA. Ces amorces permettent l'amplification spécifique de la séquence ADN comprenant la fin du gène *PROSCOOP12* et le début de la molécule RFP. Après PCR, un amplicon de 493 paires de bases (pb) spécifique de ce couple d'amorces permet de confirmer l'intégration de la construction dans le génome de la plante étudiée. L'enzyme GoTaq® G2 DNA Polymérase, chez Promega™, a été utilisée pour la réaction PCR.

Les amplicons obtenus après PCR ont été déposés 30 minutes à voltage 90 V sur gel d'agarose à 1% (1g d'agarose Eurobio™ pour 100 ml de tampon TE 0,5X Eurobio™).

2.2.6. Expression transitoire de 35S::*PROSCOOP12*::RFP

2.2.5.a Transformation transitoire de feuilles de *N. benthamiana* par agro-infiltration

Les plants de *N. benthamiana* ont été transformés simultanément par les trois constructions suivantes :

1 - aquaporine::YFP, témoin de localisation dans la membrane plasmique, dans laquelle sont enchâssées les aquaporines. Ce contrôle permet de mettre en évidence les contours du compartiment membranaire (Nelson *et al.*, 2007),

2 - 35S::*PROSCOOP12*:: RFP pour suivre la localisation du propeptide

3 - 35S::P19 , suppresseur de « silencing » permettant d'améliorer le niveau d'expression des constructions d'intérêts aquaporine::YFP et 35S::*PROSCOOP12*::RFP (Voinnet *et al.*, 2003).

Chaque souche a été mise en culture jusqu'à une DO initiale de 2,5. La face inférieure des feuilles, de plants de *N. benthamiana* âgés de 4 semaines, a été infiltrée avec une suspension des trois souches 1, 2 et 3 à une DO finale respective de 1, 1 et 0.5 dans un mélange réactionnel contenant du MES 10 mM pH 5.6, du MgCl₂ 10 mM et de l'acétosyringone 150 mM. 72h après agro-infiltration, la fluorescence a été observée par microscopie confocale.

L'expérimentation a été répétée 3 fois, sur 8 plants de *N. benthamiana*. Pour chaque plants, 3 feuilles ont été agro-infiltrées. Lors de chaque répétition, un plant contrôle a également été utilisé, ayant été infiltré par la solution d'infiltration sans bactérie.

2.2.5.b Microscopie confocale à balayage laser

Les observations ont été réalisées avec un microscope confocal à balayage laser (NIKON A1 – NIKON Instruments Europe, France – plateau IMAC). Les feuilles infiltrées ont été colorées au calcofluor 0.1% et ont ensuite subi une plasmolyse au glycérol 30% ou au CaCl₂ 1M (Albenne *et al.*, 2014). Ces solutions très concentrées créent une pression osmotique entraînant une perte d'eau des cellules et décollent ainsi la membrane plasmique de la paroi afin de mieux les différencier. Les cellules passent à l'état « plasmolysé ». Le calcofluor est excité à 405nm et détecté à 417-488nm. La molécule YFP est excitée à 514nm et détectée à 500-550nm. La RFP est excitée à 561nm et détectée à 568-614nm.

Partie III - RESULTATS

3.1. CARACTERISATION RACINAIRE DU MUTANT *PROSCOOP12*

3.1.1. Observation morphologique des cellules

Pour comprendre le phénotype d'allongement racinaire chez les plantes mutantes, nous avons comparé la morphologie des cellules entre des racines mutantes et des racines sauvages. Pour cela, les mutants *proscop12* dans les fonds génétiques Col-0 et WS et les sauvages correspondants ont été mis en cultures pendant 25 jours. En effet, nous avons observé que ces 25 jours correspondent à une durée de croissance où les racines atteignent leur longueur maximale sur milieu gélosé et où la différence de phénotype entre plantes sauvages et mutantes est exacerbée.

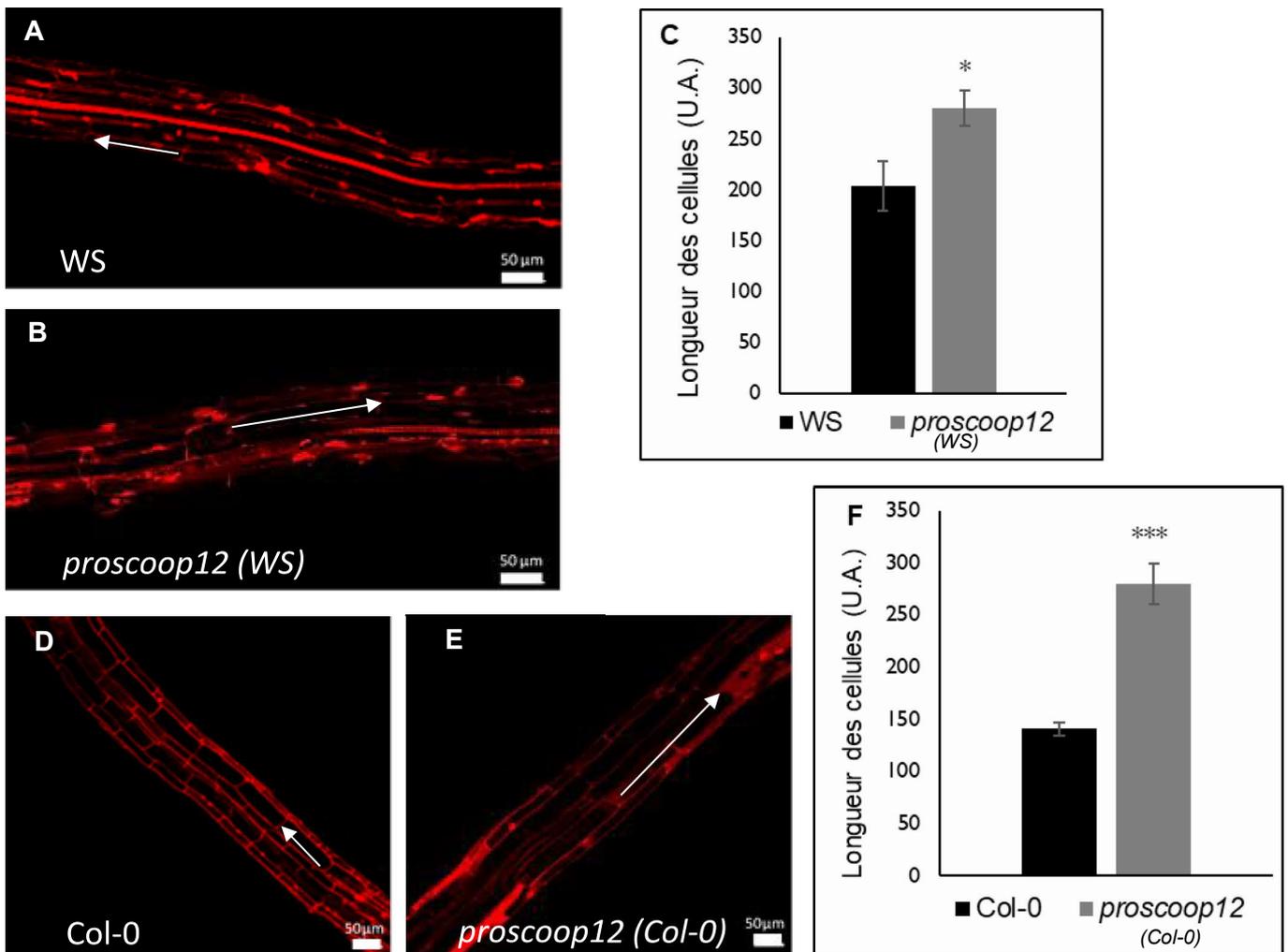


Figure 10 : Comparaison de racines sauvages et mutantes d'*A. thaliana* à j+25.

(A-B, D-E) Photos d'une zone mature d'une racine sauvage (A-D) et mutante (B-E) au confocal après coloration au IP.

(C, F) Comparaison de la taille des cellules (en unité arbitraire U.A.) et analyse statistique. Un test de Student a révélé que la différence de longueur des cellules différenciées entre le type sauvage et le mutant est significative (* $P < 0,05$; *** $P < 0,001$).

Photos prise sur le plateau IMAC par MC. Guillou.

Les colorations à l'iodure de propidium ont été réalisées sur deux séries de 10 racines pour chaque génotype et les racines colorées entières ont ensuite été prises en photo au microscope confocal au grossissement x20. Les photos présentées sur la figure 10 montrent un fragment racinaire à environ 1cm de l'extrémité de la racine. Au-delà de cette distance, les poils racinaires commencent à apparaître et indiquent que nous nous situons dans la zone mature.

Les racines mutantes (figure 10, B et E) présentent des cellules différenciées significativement plus allongées (test de Student) que les racines sauvages (figure 10, A et D). En effet, leurs cellules sont en moyenne 1,5 à 2 fois plus longues que celles des racines sauvages (figure 10, C et F).

3.1.2. Observation des ROS dans la racine principale

Pour étudier plus précisément le phénotype d'allongement racinaire chez les plantes mutantes, nous avons observé et comparé les sites d'accumulation des ROS participant au développement racinaire, entre des racines mutantes et des racines sauvages. Pour cela, les mutants *proscop12* dans les fonds génétiques Col-0 et WS et les sauvages correspondants ont été mis en cultures pendant 11 jours ; période durant laquelle la racine est en développement et où les ROS peuvent donc être impliqués.

3.1.2.a Mise en évidence de l'O₂⁻

Les racines des mutants *proscop12* (Col-0) et *proscop12* (WS) et des sauvages respectifs ont été colorées au NBT pour mettre en évidence la distribution de l'O₂⁻ dans les extrémités racinaires. Les colorations ont été observées sur deux séries de 10 racines pour l'écotype Col-0 et sur une série de 10 racines pour l'écotype WS.

La coloration violette s'observe à l'extrémité de la racine principale pour chaque génotype et est particulièrement forte dans la zone d'élongation et la zone méristématique (figure 11, A et C). Les tissus internes sont particulièrement colorés. On peut également observer de légères colorations au niveau des contours des cellules au-delà de la zone d'élongation. L'analyse des mesures des longueurs des surfaces colorées (figure 11, B et D) montre qu'elles sont significativement plus importantes (test de Student) chez les mutants *proscop12* (Col-0) et *proscop12* (WS) en comparaison aux racines sauvages correspondantes. Les mutants KO accumulent plus d'O₂⁻ dans la zone méristématique et la zone d'élongation par rapport aux sauvages.

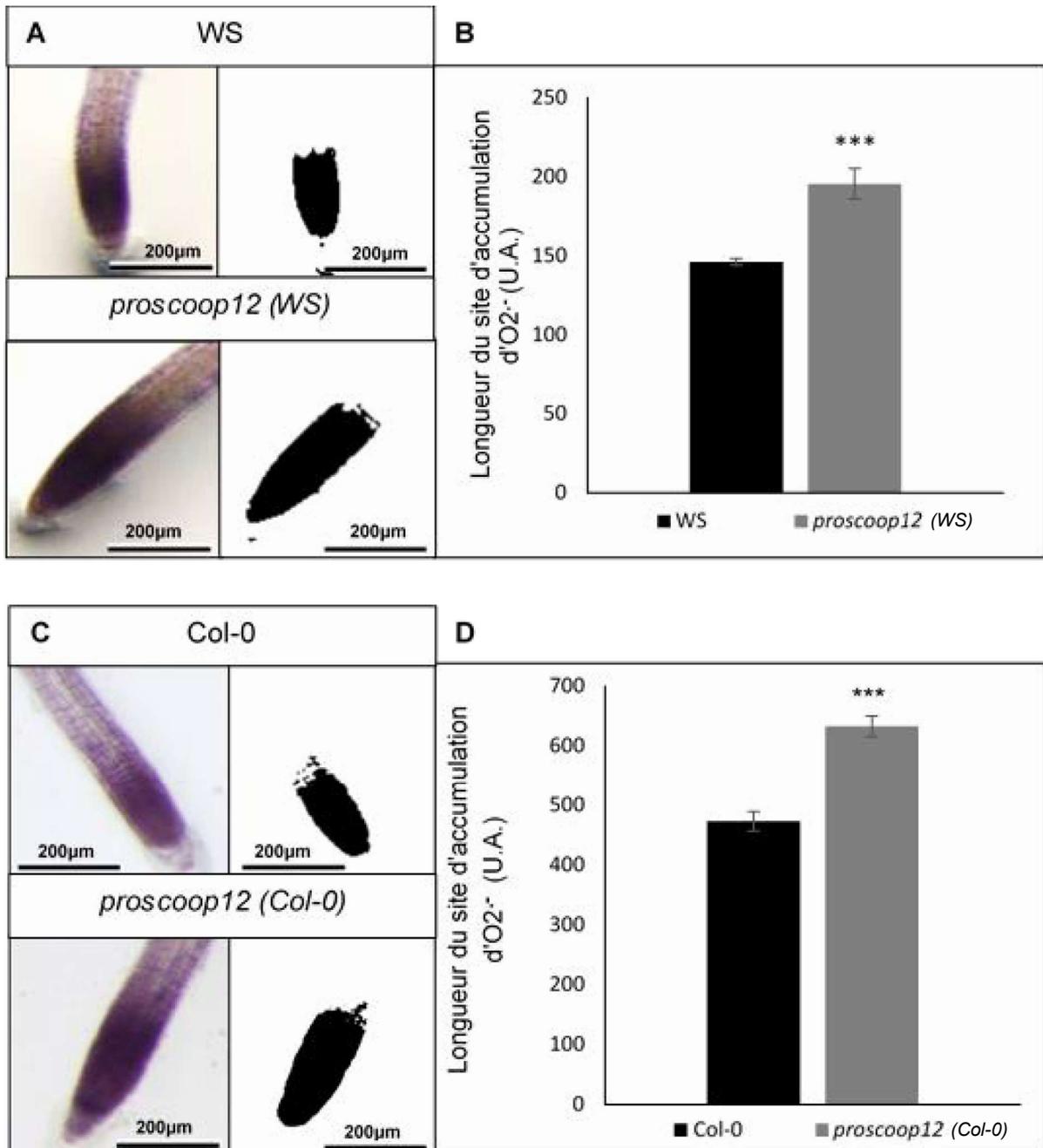


Figure 11 : Observation de l'accumulation d'O₂⁻ dans les racines mutantes et sauvages.

(A-C) Coloration des racines au NBT. (B-D) Comparaison des zones colorées (en unité arbitraire U.A.) et analyse statistique. Un test de Student a révélé que les différences de longueur des zones d'accumulation de l'O₂⁻ sont significatives (***) $P < 0,001$). Photos prises sur le plateau IMAC par MC.Guillou.

3.1.2.b Mise en évidence de l'H₂O₂

Les racines du mutant *proscop12 (Col-0)* et du témoin sauvage Col-0 ont été colorées au DAB pour mettre en évidence l'accumulation de l'H₂O₂ issu de l'activité des peroxydases (figure 12, A). Les colorations ont été réalisées sur deux séries de 10 racines pour chaque génotype.

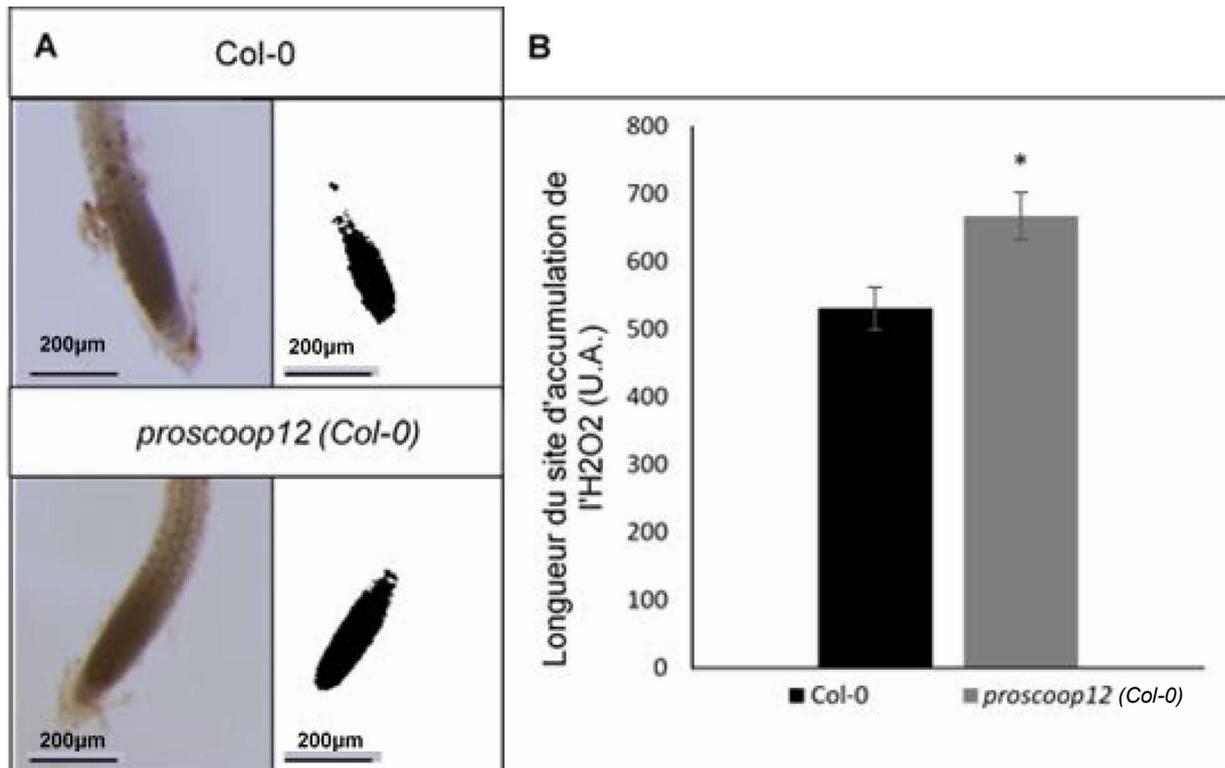


Figure 12 : Observation de l'accumulation d'H₂O₂ dans les racines mutantes et sauvages.

(A) Coloration des racines au DAB et (B) analyse statistique de la longueur de la zone d'accumulation d'H₂O₂ entre les deux génotypes. Un test de Student a révélé que la différence de longueur de la zone d'accumulation de l'H₂O₂ est significative (*P<0,05). Photos prises sur le plateau IMAC par MC.Guillou.

Une coloration brune intense s'observe à l'extrémité de la racine principale, pour chaque génotype, dans la zone méristématique et la zone d'élongation. Les tissus internes sont particulièrement colorés. L'analyse des mesures des longueurs des surfaces colorées (figure 12, B) montre qu'elles sont significativement plus importantes (test de Student) chez le mutant *proscoop12 (Col-0)* en comparaison aux racines sauvages. Le mutant KO accumule plus d'H₂O₂⁻ dans les zones méristématique et d'élongation par rapport au sauvage Col-0.

3.2. OBTENTION ET PHENOTYPAGE DU MUTANT SUREXPRESSEUR

Des plantes d'*A. thaliana* ont été transformées par agro-infiltration avec la construction 35S::*PROSCOOP12*::RFP afin d'étudier l'impact de la surexpression du gène *PROSCOOP12* sur le développement racinaire. Plusieurs étapes de sélection ont été mises en place afin de sélectionner des lignées transformées stables. Les lignées mutantes ont été nommées lignées « surexpresser ». En parallèle des étapes de sélection, nous avons mis en évidence des phénotypes aux stades rosette et silique pour les mutants transformés.

3.2.1. Lignées mutantes obtenues

Plusieurs lignées transformées ont été obtenues aux stades de générations F0 et F1 (tableau 1). Au stade F0 nous avons identifié 11 lignées indépendantes résistantes à la kanamycine (50 μg/μl). Ce résultat signifie qu'à ce stade, une plante sélectionnée possède au moins une version allélique de la construction 35S::*PROSCOOP12*::RFP à chaque site

d'insertion, lui conférant le caractère de résistance à l'antibiotique. Pour chacune de ces 11 plantes nommées plante n°1 à 11, une autofécondation a permis d'obtenir la génération F1 suivante.

Tableau 1: Lignées surexpresses obtenues.

| Individu | Test | Effectif |
|---|---|---|
| Génération F0 | Sélection sur kanamycine 50µg/µl | 11 plantes résistantes numérotées de 1 à 12 |
| Génération F1 A partir de la plante F0 n°1 | Génotypage de 12 plantules nommées de A à L | 6 plantes transformées / 12 |

La plante n°1 de la génération F0 a été autofécondée pour obtenir une génération F1. Les graines obtenues ont été mises en culture et douze plantules ont été génotypées par PCR, après 4 semaines de culture en terre, afin de déterminer les plantes F1 à conserver pour autofécondation et obtention de la génération F2.

Les résultats de ce génotypage sont présentés sur la figure 13. Un témoin négatif contenant de l'eau au lieu de l'ADN a été utilisé comme témoin de non contamination et montre qu'aucune bande aspécifique n'est présente dans les puits. L'ADN d'une plante sauvage WS1 a été utilisé comme témoin non transformé. En effet, rappelons que le couple d'amorces utilisé cible spécifiquement la séquence du gène *PROSCOOP12* fusionnée à la RFP. Pour le puit WS1 aucune bande n'est présente, comme attendu. Sur les 12 plantules étudiées nommées A à L, 6 plantules (A, B, E, G, H, L) présentent une bande PCR de forte intensité et de taille attendue. Les puits correspondants aux plantules C, D, F, I, J et K ne présentent pas de bande.

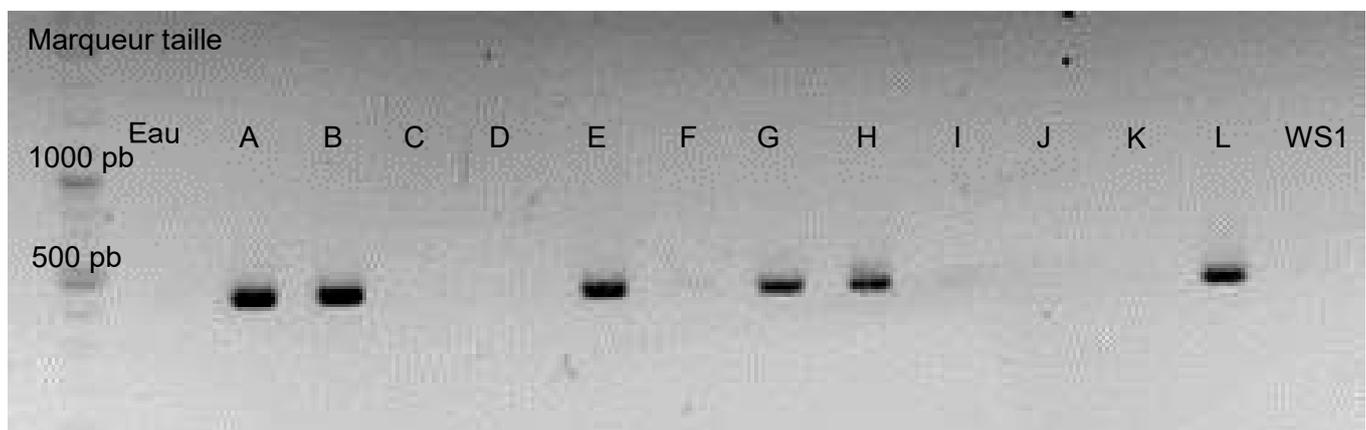


Figure 13 : Génotypage des plantes transformées à la génération F1.

Marqueur de taille ThermoFisher 1kb – Témoin « Eau » – ADN génomiques testés « A à L » – ADN contrôle « WS1 ». (MC. Guillou)

Nous pouvons ainsi dire que les plantes A, B, E, G, H et L, au stade F1, contiennent au moins une version allélique de la construction 35S::*PROSCOOP12*::RFP et sont donc transformées. Il s'agit de mutants surexpresses. En revanche, les autres plantes ont ségrégué vers la récupération du génotype sauvage.

3.2.2. Phénotypage au stade F1

3.2.2.a Stade rosette

En parallèle du génotypage, les lignées F1 A à L ont été phénotypées au stade rosette après 2 semaines de croissance en jours longs. Leur phénotype a été comparé à celui de la plante sauvage WS du même âge.

Les plantes ayant intégrées la construction 35S::PROSCOOP12::RFP (A, B, E, G, H et L) ont montré des feuilles dentelées et une croissance moindre par rapport au témoin (figure 14). Les plantes au génotype sauvage ne montrent pas de différences phénotypiques par rapport au sauvage (figure 14 - « plante C » - et annexe IV).



Figure 14 : Comparaison des phénotypes au stade « rosette » entre le sauvage WS, une plante non transformée et une plante transformée.

(Photo MC. Guillou) WS est le type sauvage. La plante C correspond à une plante non transformée et la plante E est un mutant « surexpresser ».

La photo de la figure 15 montre le phénotype plus marqué de feuilles dentelées observé au stade rosette en prenant l'exemple de la plante E, après 4 semaines de croissance.



Figure 15 : Phénotype au stade rosette du mutant surexpresser E (F1).

(Photo MC. Guillou).

3.2.2.b Stade silique

Les plantes de la lignée F1 A à L ont également été phénotypées au stade siliques après 8 semaines de croissance en jours longs. Leur phénotype a été comparé à celui de la plante sauvage WS du même âge.

Les siliques des 6 mutants surexprimeurs validés par PCR présentent un phénotype de taille significativement réduite par rapport aux siliques sauvages (figure 16, photos et test de Student pour le mutant surexporteur E). En effet, la longueur des siliques mutantes est en moyenne 4 fois plus petite. De plus, nous observons qu'elles sont vides pour certaines ou très pauvres en graines par rapport au contrôle WS. Pour chacune de ces plantes, seulement une dizaine de graines a été récoltée. En revanche, les siliques des plantes considérées comme non transformées après l'analyse PCR ne montrent pas de différence de phénotype par rapport au type WS à ce stade.

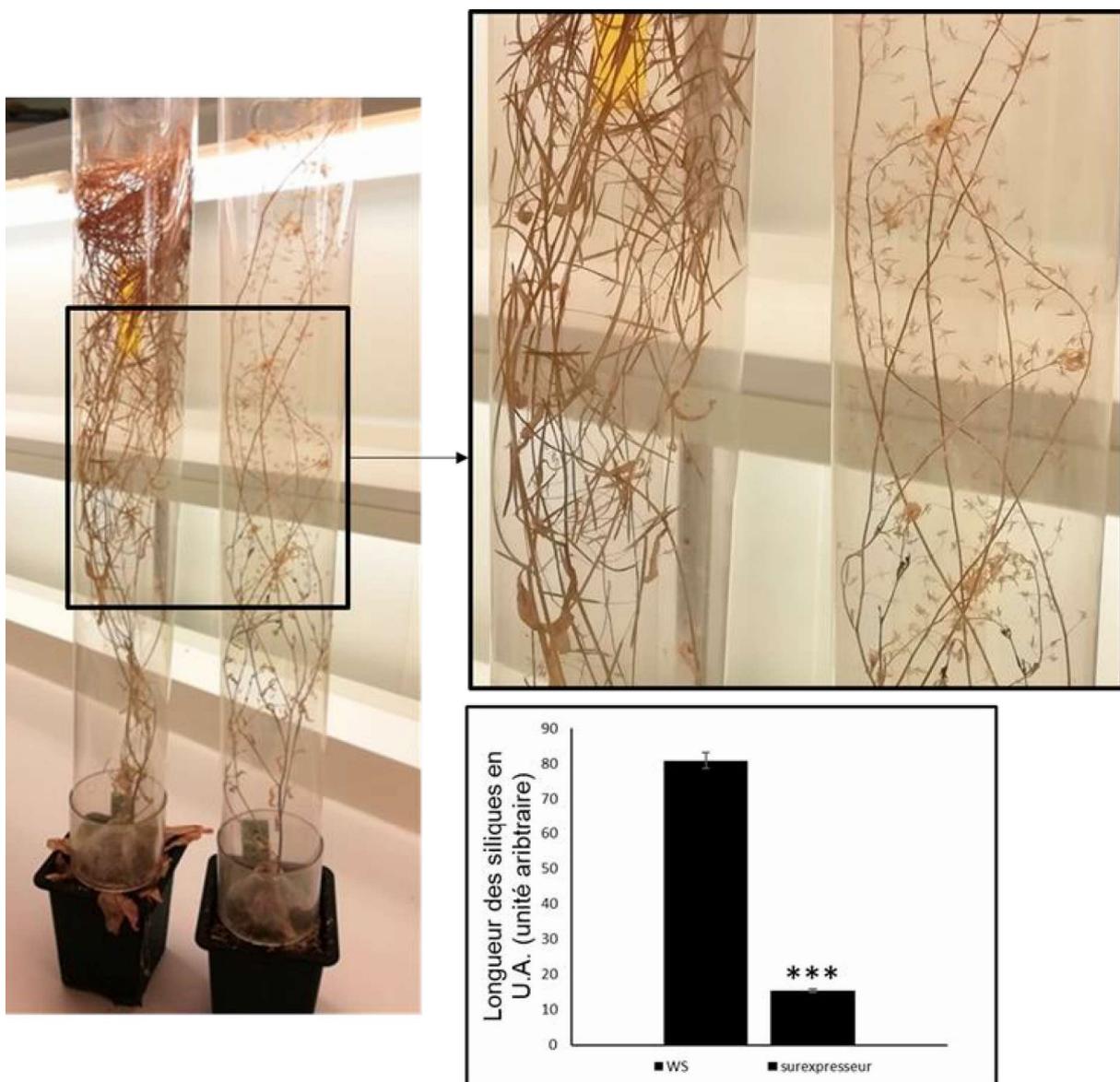


Figure 16 : Comparaison des phénotypes au stade « silique » entre le sauvage WS (plante à gauche) et le mutant surexporteur E (plante à droite).

(Photos MC. Guillou). Un test de Student a révélé que les différences de longueur des siliques sont significatives (***) $P < 0,001$).

3.2.2.c Phénotypage des racines

Les plantes « surexpresses » A, B, E, G, H et L ont été autofécondées dans l'objectif d'obtenir la F2 pour étudier le phénotype racinaire. Cependant, seulement une dizaine de graines environ a été récoltée pour chaque plante. Ces graines semblent de très petite taille et il est difficile de les différencier des résidus de siliques, même après une étape de triage et tamisage. Leur semis n'a pas été mis en place car il semble au préalable nécessaire de mettre au point une technique de culture adaptée.

3.3. LOCALISATION CELLULAIRE DE LA PROTEINE FUSION PROSCOOP12::RFP

Les études préliminaires ont montré une localisation de la protéine fusion PROSCOOP12::RFP au niveau des contours cellulaires. Une plasmolyse a été réalisée afin de mieux différencier les différents compartiments cellulaires dans cette zone et identifier plus finement la localisation de la protéine fusion.

Les feuilles de *N. benthamiana* n'émettent pas d'auto-fluorescence en conditions normales avec infiltration d'une solution sans culture bactérienne (partie 1.3.2.d, figure 7). Les fluorescences observées après agro-infiltration avec les différentes constructions sont donc spécifiques des molécules concernées (figure 17, a-e et 18, a-e).

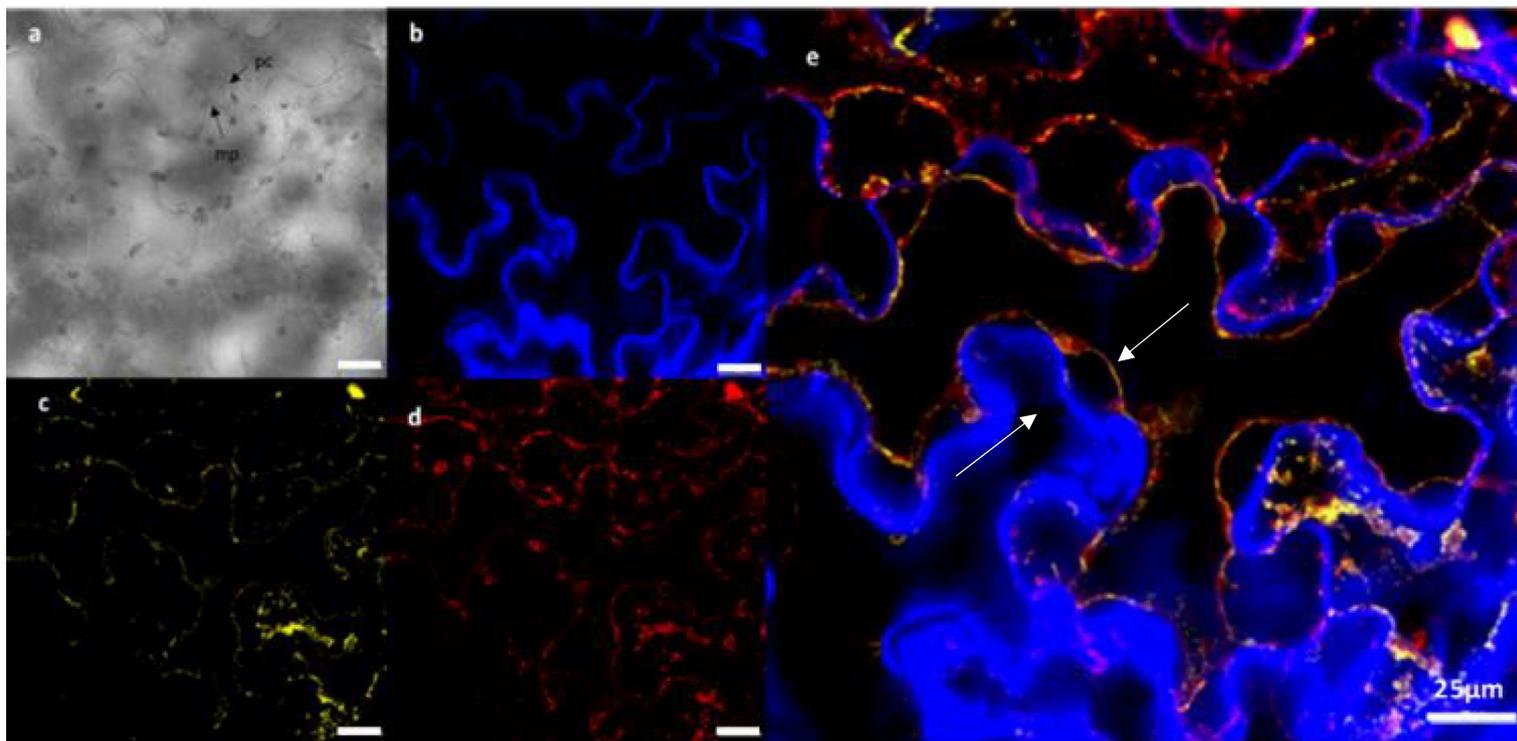


Figure 17 : Localisation membranaire de la protéine fusion PROSCOOP12::RFP suite à une plasmolyse au glycérol 30%. (MC. Guillou).

(a-e) Cellules épidermiques de feuilles de *N. Benthamiana* plasmolysées au glycérol 30%. Grossissement x20x2,92. (a) Champ clair. (b) Fluorescence du calcofluor, marqueur pariétal. (c) Fluorescence de la protéine fusion aquaporines::YFP, marqueur membranaire (Nelson et al, 2007). (d) Fluorescence de la protéine fusion PROSCOOP12::RFP. (e) superposition des photos (b), (c) et (d). Les flèches blanches permettent de différencier la paroi (bleue) de la membrane plasmique (orange). La barre horizontale blanche représente l'échelle de 25µm.

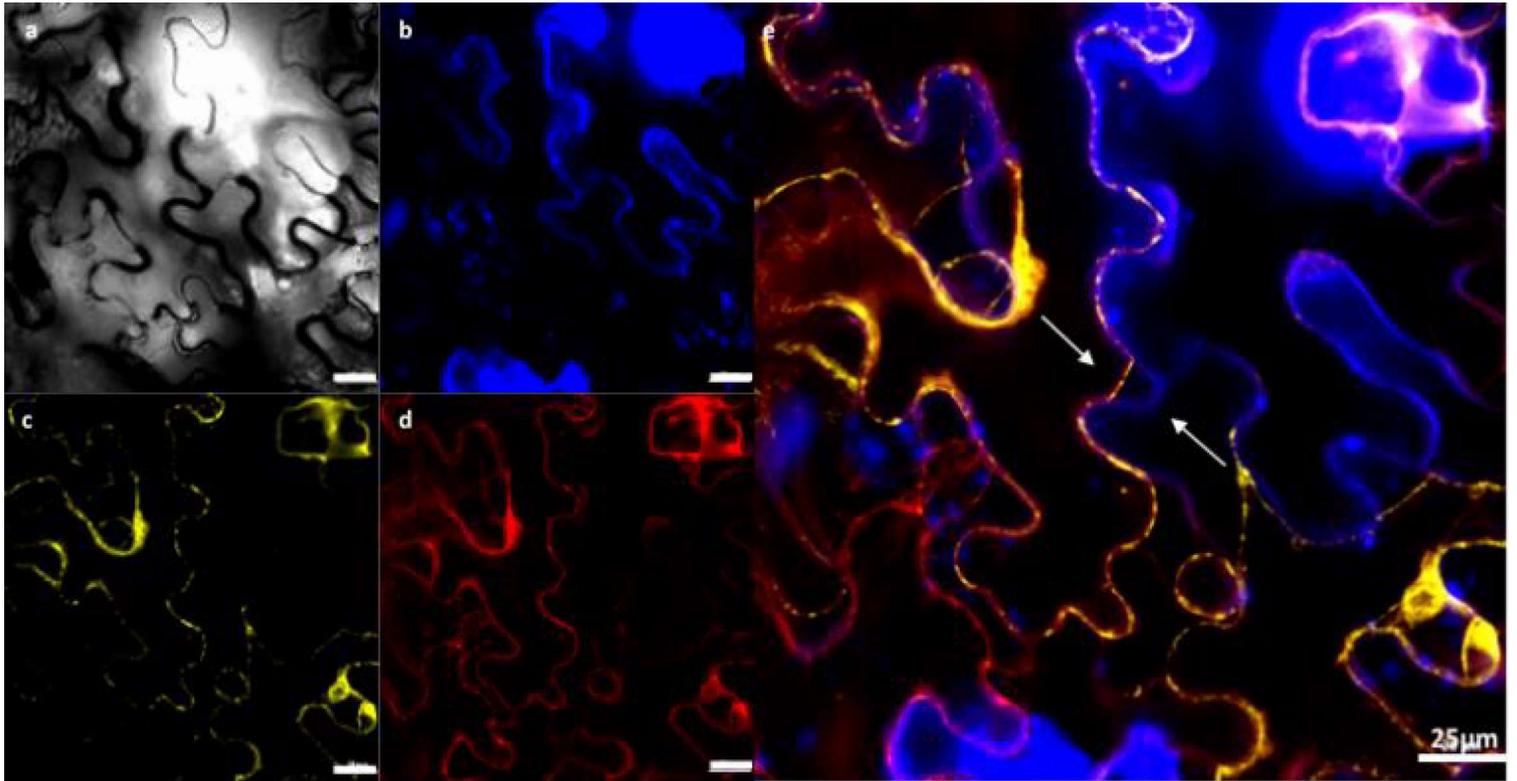


Figure 18 : Localisation de la protéine fusion PROSCOOP12::RFP suite à une plasmolyse au CaCl_2 1M. (MC. Guillou)

(a-e) Cellules épidermales de feuilles de *N. Benthamiana* plasmolysées au CaCl_2 1M. Grossissement $\times 20 \times 2,92$. (a) Champ clair. (b) Fluorescence du calcofluor, marqueur pariétal. (c) Fluorescence de la protéine fusion aquaporines::YFP, marqueur membranaire (Nelson et al, 2007). (d) Fluorescence de la protéine fusion PROSCOOP12::RFP. (e) superposition des photos (b), (c) et (d). Les flèches blanches permettent de différencier la paroi (bleue) de la membrane plasmique (orange). La barre horizontale blanche représente l'échelle de $25\mu\text{m}$.

Après une plasmolyse obtenue grâce à une solution de glycérol (figure 17, a-e) ou à une solution saline (figure 18, a-e), les cellules montrent un décollement de la paroi (figures 17, b et 18, b) et de la membrane plasmique (figures 17, c et 18, c). Dans ce contexte, on observe que la fluorescence rouge (figures 17, d et 18, d) de la protéine fusion colocalise avec celle du marqueur aquaporine::YFP en jaune, au niveau de la membrane plasmique (coloration orange ; figures 17, e et 18, e).

Partie IV - DISCUSSION

4.1. IMPLICATION DU GENE *PROSCOOP12* DANS LA CROISSANCE RACINAIRE

La mutation KO du précurseur protéique *PROSCOOP12* induit un allongement de la racine (Gully and Pelletier *et al.*, 2019). Nous avons montré que ce phénotype peut s'expliquer par une élongation significative des cellules observées, opérant dès la zone d'élongation et jusqu'après la zone de différenciation où les tissus acquièrent leur spécificité (figure 10).

Cette élongation cellulaire peut être favorisée par plusieurs processus et il est à présent vérifié que les ROS y contribuent (Sadhukhan *et al.*, 2019; Foreman *et al.*, 2003; Gapper *et al.*, 2006; Liskay *et al.*, 2004). Dans ce sens, nous avons mis en évidence que le mutant *proscop12* présente une plus forte accumulation de l'ion superoxyde $O_2^{\cdot-}$ (figure 11) et du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 (figure 12) dans la zone méristématique et la zone d'élongation. L' $O_2^{\cdot-}$ est la première forme réduite de l'oxygène générée par les NADPH oxydases des cellules méristématiques et conduit à la formation d' H_2O_2 . La production d' H_2O_2 est également catalysée par les peroxydases présentes dans les parois, ce que nous avons mis en évidence avec la coloration des racines au DAB. Il est reconnu que ces deux espèces participent à la formation d' OH^{\cdot} dans la zone d'élongation (Dunand *et al.*, 2007; Liskay *et al.*, 2004). Les racines de nos mutants *proscop12* sembleraient donc produire ce radical hydroxyle en plus forte quantité. Il est connu comme participant à la scission des polymères pariétaux et favorise de cette façon à l'étirement de la paroi (Liskay *et al.*, 2004; Fry, 1998; Miller, 1986). Les cellules sont ainsi plus aptes à s'allonger. Une fois qu'elles se différencient et deviennent matures, leur croissance s'arrête et elles gardent leur taille plus ou moins allongée (Schiefelbein *et al.*, 1991). Nous pouvons ainsi mettre en lien le phénotype d'élongation des cellules observé dans la zone mature (figure 10) avec l'accumulation de l' $O_2^{\cdot-}$ (figure 11) et de l' H_2O_2 (figure 12) plus importante dans les pointes racinaires des mutants *proscop12*. Nous suggérons que l' OH^{\cdot} y est également plus fortement concentré dans la zone d'élongation. Une coloration spécifique de ce radical hydroxyle devra être envisagée pour le confirmer.

Ces résultats établissent clairement un lien entre le gène *PROSCOOP12* et l'accumulation des ROS. Plus précisément, ils valident le modèle que nous avons proposé (figure 8 (Gully and Pelletier *et al.*, 2019)), prédisant le rôle de *PROSCOOP12* dans le contrôle du développement racinaire via une régulation des ROS. Lorsque le gène *PROSCOOP12* ne s'exprime plus, les racines produisent des ROS en quantité plus importante mais de manière non létale pour la plante. Cela conduit à une dilatation des parois et une élongation des cellules et donc à l'allongement de la racine principale. Lorsque le gène est présent et s'exprime, il exerce un contrôle négatif sur la production de ROS, conduisant à une plus faible teneur et contrôlant ainsi l'allongement racinaire. Le gène *PROSCOOP12* éviterait de cette manière un allongement trop importante de la racine et peut-être non nécessaire en condition non stressante (Walters *et al.*, 2007). Il serait intéressant à l'avenir de comparer les phénotypes racinaires des sauvages et des mutants en situation de stress, par exemple suite à une carence en azote ou un stress hydrique, pour confirmer le rôle modulateur du gène.

4.2. UNE SUREXPRESSON DE *PROSCOOP12* PERTURBE LE DEVELOPPEMENT GENERAL

La surexpression du gène *PROSCOOP12* chez *A. thaliana* (écotype WS) a été réalisée dans l'objectif d'observer un phénotype potentiel des racines chez les lignées mutantes par

rapport à la plante sauvage. Cependant, au cours des étapes de sélection, nous avons mis en évidence des phénotypes aux stades rosette et silique pour les mutants transformés, dits surexpresses, et nous avons ainsi pu observer un impact de la surexpression de *PROSCOOP12* au niveau du développement de la plante entière. L'expression forte et continue du gène (sous le promoteur 35S) semble entraîner un désordre important au niveau du développement global chez *A. thaliana*. En effet la plante présente des feuilles dentelées et sa croissance est moindre par rapport au type sauvage (figures 14 et 15). Ce phénotype a déjà été observé chez plusieurs lignées mutantes (Hasson *et al.*, 2011) et rappelle plus particulièrement celui de mutants qui surexpriment les KRP (pour Kip-related protein), des inhibiteurs du cycle cellulaire (Ormenese *et al.*, 2004). Il a été montré que la surexpression des KRP entraîne une diminution de l'activité des CDK (Wang *et al.*, 2000; De Veylder *et al.*, 2001), les « cyclin-dépendant-kinases », responsables du cycle cellulaire et de la division cellulaire (Mironov *et al.*, 1999). La surexpression de *PROSCOOP12* pourrait jouer un rôle similaire à l'inhibition de l'activité des CDK au profit des inhibiteurs du cycle cellulaire comme ICK1 (Wang *et al.*, 2000). De cette manière, cela favoriserait une inhibition du développement de la plante en réduisant la prolifération cellulaire dans les feuilles. Ceci pourrait expliquer les deux phénotypes que nous observons à savoir que (i) les organes sont, de manière générale, de taille plus petite que le type sauvage et (ii) que les feuilles n'ont plus de bords lisses mais sont dentelées.

Rappelons également que l'application exogène du peptide de synthèse SCOOP12, sur plantules, induisait une inhibition de leur développement et était associée à une augmentation de la production de ROS (Gully and Pelletier *et al.*, 2019). Ainsi, la surexpression continue du gène ne serait pas létale pour la plante mais pourrait générer un signal de stress et favoriser l'activité d'inhibiteurs de la division cellulaire. Associés au phénotype d'allongement des racines chez le mutant KO, ces résultats montrent l'importance de la régulation par *PROSCOOP12* dans la plante et semblent préciser son rôle de « modulateur » des ROS pour optimiser le développement de la plante en fonction de son état de stress et de l'environnement.

4.3. LOCALISATION MEMBRANAIRE DE LA PROTEINE FUSION PROSCOOP12::RFP

L'étude plus précise de l'expression transitoire chez le tabac de la protéine fusion 35S::PROSCOOP12::RFP, grâce à une plasmolyse au glycérol, montre une fluorescence de la protéine fusion qui colocalise avec celle d'un marqueur membranaire. Ceci indique que la protéine fusion pourrait être associée à la membrane plasmique. Une solution saline comme le CaCl₂ permet aussi de plasmolyser les cellules et peut également être utilisée afin de relarguer les protéines dans l'apoplasme lorsque celles-ci sont en interaction ionique avec un domaine extracellulaire d'un récepteur membranaire par exemple (Albenne *et al.*, 2014). A l'issue de cette plasmolyse, nous n'avons pas observé de fluorescence de notre protéine fusion dans l'apoplasme. La protéine PROSCOOP12, plus précisément le propeptide, ne semble donc pas contenir d'interaction ionique avec un récepteur membranaire. Toutefois, cela ne veut pas dire qu'il n'y a pas d'interaction avec un constituant membranaire, notamment via des liaisons hydrogènes par exemple (Zhang *et al.*, 2016).

Le marqueur RFP est un marqueur intracellulaire lorsqu'il est intégré seul dans la plante (Han *et al.*, 2014). Nos résultats (figures 17, e et 18, e) permettent de consolider l'hypothèse que le pré-propeptide PROSCOOP12 subirait un clivage en N-terminal au niveau de son peptide d'adressage et que le propeptide serait adressé au réticulum endoplasmique (RE) pour se retrouver finalement au niveau de la membrane plasmique. Cependant, ce résultat est inattendu puisque les prédictions bioinformatiques n'identifient pas de domaine transmembranaire au sein de la séquence protéique du propeptide PROSCOOP12 (logiciel

THHMM (Krogh *et al.*, 2001)). Ce résultat peut néanmoins s'expliquer de plusieurs manières : (i) la protéine PROSCOOP12 est fusionnée au marqueur RFP et ce dernier peut perturber l'adressage du peptide et/ou sa reconnaissance par un partenaire ou son récepteur, (ii) le marqueur RFP peut également perturber le rôle des endoprotéases générant le peptide mature qui lui est capable de se fixer à un récepteur, (iii) enfin nous avons étudié l'expression transitoire de la protéine fusion chez *N. benthamiana*, or SCOOP12 est un peptide spécifique d'*A. thaliana* (annexe II) ; il se peut aussi que le récepteur de SCOOP12 ne soit pas présent chez le tabac.

Partie V - CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

4.1. CONCLUSIONS SCIENTIFIQUES

Au cours de ce stage nous avons pu expliquer le phénotype d'allongement racinaire des mutants *proscoop12*. Nous avons montré en effet que la mutation du gène entraînait une élongation des cellules racinaires et nous avons pu mettre ce résultat en lien avec une accumulation de ROS plus importante, favorisant le relâchement des parois et la dilatation des cellules. Nous avons ainsi validé le modèle que nous avons prédit en confirmant que *PROSCOOP12* régule le développement racinaire, notamment via une régulation de l'accumulation des ROS. La surexpression continue du gène entraîne quant à elle une inhibition du développement de la plante et oriente de nouvelles recherches vers une potentielle interaction du gène avec des inhibiteurs du cycle cellulaire, notamment au niveau foliaire. Ensemble, ces données illustrent la régulation primordiale par le gène *PROSCOOP12* dans la plante et son rôle essentiel de modulateur du développement.

L'observation en transitoire de la protéine fusion *PROSCOOP12::RFP* chez *N. benthamiana* a permis de mettre en évidence une fluorescence qui colocalise avec celle d'un marqueur de la membrane plasmique. Ce résultat constitue une donnée intéressante puisqu'il peut s'agir d'une première piste pour la recherche des partenaires protéiques dans ce compartiment cellulaire.

4.2. PERSPECTIVES SCIENTIFIQUES

Cette étude a permis de mieux comprendre le rôle du gène *PROSCOOP12* dans le contrôle du développement chez *A. thaliana* et d'observer au niveau cellulaire la localisation du propeptide *PROSCOOP12* fusionné à la RFP.

Les approches biochimiques et d'imagerie cellulaire ont permis de mettre en évidence l'interaction du gène avec deux types de ROS spécifiques de la zone méristématique. Il serait nécessaire de confirmer l'accumulation d'un troisième ROS au rôle essentiel, l' OH^\cdot , dans la zone d'élongation de la racine afin de confirmer que ce ROS participe à l'élongation des cellules et donc à l'allongement de la racine du mutant KO *proscoop12*. De plus, une étude comparative des profils d'expression géniques par analyse du transcriptome entre racines mutantes et sauvages permettra d'avoir une vision plus globale du rôle de *PROSCOOP12* dans la racine et d'étudier de manière plus générale l'ensemble des voies de biosynthèses que le gène induit ou réprime. Cette analyse transcriptomique sur racines permettra également de renforcer le rôle de *PROSCOOP12* dans la racine, que nous avons prédit à partir des données transcriptomiques obtenues sur feuilles (Gully and Pelletier *et al.*, 2019).

La surexpression du gène *PROSCOOP12* a montré un phénotype au stade rosette et silique particulier, similaire à plusieurs autres lignées mutantes (Hasson *et al.*, 2011). Dans un premier temps il sera envisagé de mesurer le taux d'expression du gène *PROSCOOP12* par RT-qPCR pour confirmer que son niveau d'expression est bien supérieur par rapport à l'écotype sauvage WS. Ensuite, il serait intéressant de mesurer également le niveau d'expression des gènes codant pour les CDK (Mironov *et al.*, 1999), les KRP (De Veylder *et*

al., 2001), et notamment ICK1 (Wang *et al.*, 2000) dans les mutants surexpresseurs et de les comparer à leur niveau d'expression dans les types sauvages. Ceci pourrait permettre d'identifier un éventuel lien entre *PROSCOOP12* et les inhibiteurs du cycle cellulaire. Enfin, il faudra poursuivre le génotypage des plantes obtenues au stade F2 pour identifier les plantes F1 homozygotes et donc stabiliser le phénotype. Sur ces lignées stables, le phénotype racinaire sera observé et comparé au type sauvage. Mais, d'après l'ensemble de nos résultats, nous nous attendons à observer des racines de taille plus courte par rapport au sauvage. Dans cette situation, la technique de culture en hydroponie semble être une solution adaptée (Schiefelbein *et al.*, 2003), contrairement à la culture *in vitro*, en raison des caractéristiques des graines récoltées (petites, peu visibles à l'œil, présence de déchets de récolte et de débris de siliques).

L'expression transitoire chez le tabac de la protéine fusion *PROSCOOP12::RFP* a permis d'observer une fluorescence qui colocalise avec celle d'un marqueur de la membrane plasmique. A l'avenir il sera nécessaire de confirmer cela chez le mutant surexpresseur stable d'*A. thaliana* pour des questions de spécificité, et de valider sa localisation par un western blot (Voinnet *et al.*, 2003). Pour cette étape de western blot, il est important de noter que la protéine *PROSCOOP12* est de très petite taille (1,3 kDa) et la protéine RFP de taille bien plus importante (29 kDa). La différence de masse entre le complexe *PROSCOOP12::RFP* et la RFP seule ne serait peut-être pas suffisamment importante pour permettre de distinguer les deux signaux par SDS-PAGE, en utilisant un anticorps antiRFP pour isoler le complexe « antiRFP - AT5G44585::RFP » dans la membrane plasmique. Un séquençage des produits obtenus pourrait alors être nécessaire et permettrait d'ailleurs d'identifier les produits et la séquence exacte effective de la protéine *PROSCOOP12* fusionnée au marqueur RFP. La génération d'anticorps contre le peptide mature prédit *SCOOP12* pourrait être une autre stratégie mais en sachant bien qu'il s'agit d'une prédiction de séquence peptidique. De plus, l'extraction de protéines membranaires est une étape difficile (Stein *et al.*, 1996). L'immunolocalisation pourrait être une solution alternative pour vérifier la présence de la protéine dans la membrane. C'est un outil permettant de déterminer rapidement par fluorescence la localisation et les niveaux d'expression de protéines endogènes (Karampelias *et al.*, 2018), mais elle nécessite pour cela l'utilisation de l'anticorps anti-*SCOOP12*. Enfin, les résultats chez *N. benthamiana* associant la protéine fusion à la membrane plasmique peuvent également être dû (i) à un problème de spécificité puisque nous avons identifié que le peptide est spécifique d'*A. thaliana*, (ii) à une perturbation engendrée par la molécule RFP ou bien (iii) au processus de maturation du peptide qui n'a pas été induit dans ces conditions. Ainsi, il sera nécessaire de déterminer les conditions dans lesquelles nous pourrions être capables d'induire les processus de maturation du peptide pour confirmer l'existence du peptide sécrété et identifier sa séquence active *in vivo*.

4.3. AMELIORATIONS METHODOLOGIQUES

Au cours de cette étude quelques difficultés ont été rencontrées et certains points sont à relever afin d'optimiser les expérimentations à l'avenir.

Tout d'abord, le phénotype des mutants KO *proscoop12* a été difficile à préserver et à stabiliser au cours du temps. En effet, celui-ci est extrêmement sensible aux conditions de cultures et aux conditions environnementales et la moindre perturbation d'une enceinte climatique ou d'un protocole de culture peut conduire à sa perte. Ceci peut conforter l'idée que le gène *PROSCOOP12* joue un rôle important dans la régulation des processus de développement en fonction de l'environnement. Cependant, il est primordial de pouvoir contrôler la mise en évidence du phénotype pour les études futures. La priorité sera donc

d'identifier les conditions dans lesquelles il est possible de stabiliser le phénotype (conditions de carence hydrique ou azotée par exemple).

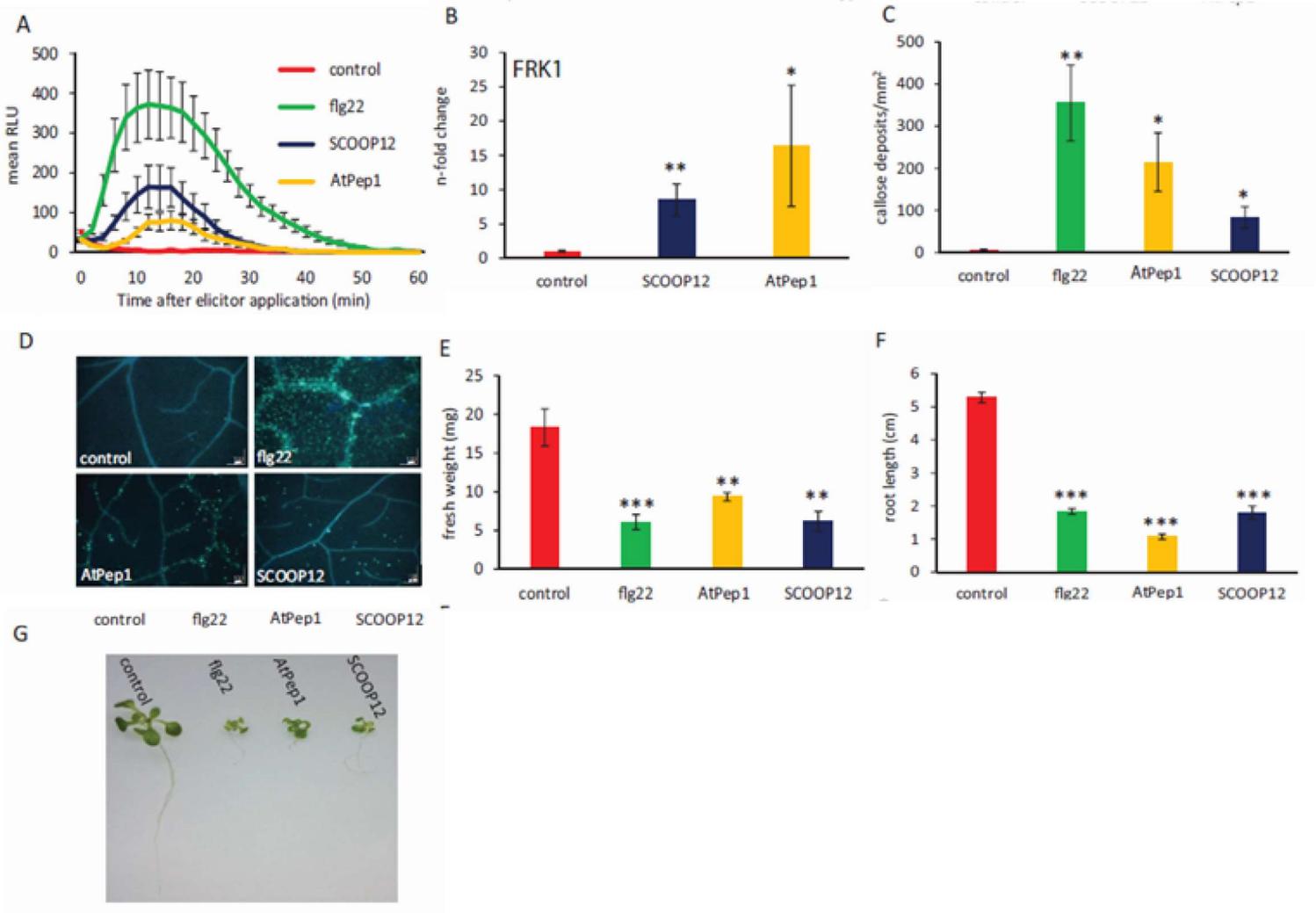
Suites aux colorations des racines mutantes et sauvages pour la détection de ROS, les images ont été analysées avec le logiciel ImageJ. Afin de quantifier la zone d'accumulation de la surface colorée et de réaliser les comparaisons entre les génotypes, la longueur du site d'accumulation de ROS a été mesurée avec l'outil « Straight ». A l'avenir, les surfaces d'accumulation ou bien les intensités de coloration pourraient être mesurées plus précisément avec le logiciel ImageJ ; bien que cela n'enlève rien à la véracité des conclusions présentées dans ce mémoire.

Également, la communauté scientifique est de plus en plus exigeante concernant les colorations des ROS dans les pointes des racines ; celles-ci étant parfois jugées non suffisamment spécifiques. Dans ce sens, nous pourrions envisager de compléter nos données avec d'autres agents permettant de mettre en évidence les ROS observés dans cette étude (O_2^- , H_2O_2). Par exemple, le kit Superoxide Anion Assay® (Sigma-Aldrich) permet de mettre en évidence de manière spécifique l'accumulation de l' O_2^- dans les extrémités racinaires et l'hydroxyphenyl fluorescein solution (HPF®, Sigma-Aldrich) quant à elle peut être utilisée comme seconde méthode de coloration pour la détection de l' H_2O_2 . Ces nouvelles observations permettraient de consolider nos résultats, notamment dans l'objectif d'une future publication.

Enfin, certaines répétitions d'expérimentations présentent un effectif un peu faible pour des analyses statistiques robustes. Nous avons généralement travaillé sur deux répétitions comprenant chacune dix racines à étudier. Il sera à envisager d'ajouter une troisième répétition pour conforter les résultats. Aussi, cela s'appliquera automatiquement lorsque sera mise en place la détection de l' H_2O_2 chez les racines sauvages et mutantes de l'écotype WS ; les difficultés de maintien du phénotype ayant fait perdre du temps pour sa réalisation au cours de ce stage.

ANNEXES

Annexe I : Induction des réponses de défense immunitaire par SCOOP12.



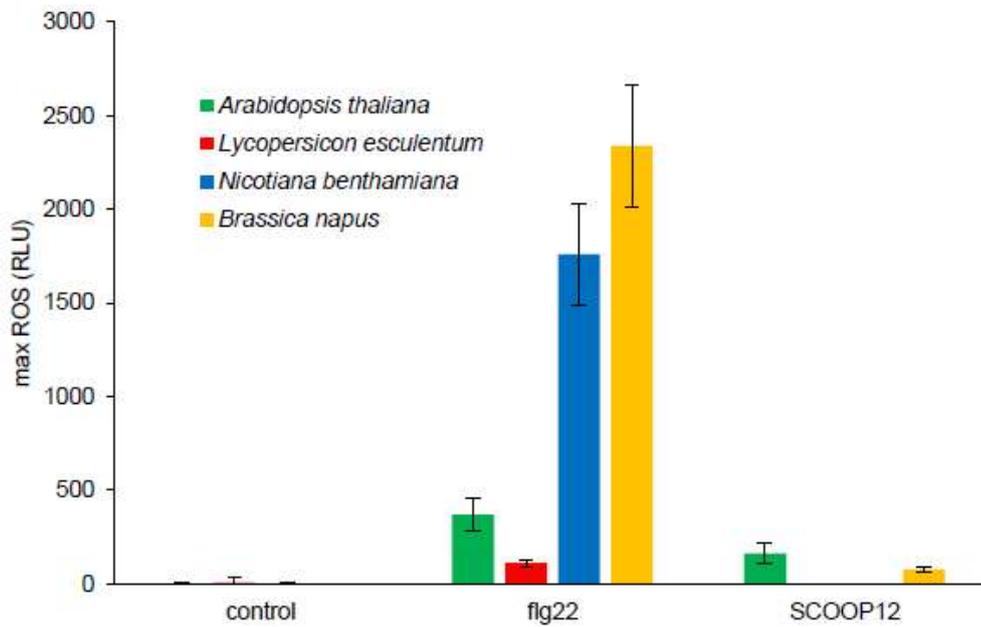
Légende :

(A) Production de ROS en RLU (unités légères relatives), sur disques foliaires d'*A. thaliana* type Col-0, traités avec ou sans (« control ») 1 μ M de chaque peptide. (B) Induction de la transcription du gène FRK1 chez des plantes cultivées en terre et traitées avec 1 μ M de peptide ou sans. (C) Quantification du dépôt de callose induit par flg22, Atpep1 et SCOOP12. (D) Localisation du dépôt de callose par coloration au bleu d'aniline. (E-G) Mesure des poids frais et des longueurs de racines de plantules traitées avec 1 μ M de chaque éliciteur ou sans éliciteur (« control ») après 13 jours.

Pour l'ensemble des graphes :

- Les barres d'erreur indiquent \pm SE de la moyenne de six répétitions biologiques.
- Les différences significatives selon les résultats du test de Student : * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Annexe II : Effets du peptide SCOOP12 spécifiques à *A. thaliana*.



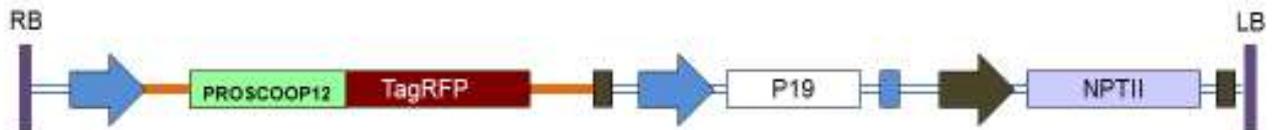
Légende :

(A) Production de ROS en RLU (unités légères relatives), sur disques foliaires de 13 jours de *Arabidopsis thaliana*, *Lycopersicon esculentum*, *Nicotiana benthamiana*, *Brassica napus*, traités avec ou sans (« control ») $1\mu\text{M}$ de chaque peptide (flg22 ou SCOOP12).

- Les barres d'erreur indiquent \pm SE de la moyenne de six répétitions biologiques.

Annexe III : Schéma de la construction 35S::PROSCOOP12::RFP.

35S::AT5G44585::TagRFP



Légende :



Vector pEAQgwTR from Team C Ritzenthaler, IBMP-Strasbourg

Annexe IV : Phénotypes des plantes F1 A à L et du témoin WS âgés de 2 semaines au stade rosette.



Légende :

Photos de rosettes âgées de 2 semaines. Photo prise par MC.Guillou.
Echelle horizontale blanche de 480 pixels.

BIBLIOGRAPHIE

- Albenne, Cécile, Hervé Canut, Laurent Hoffmann, and Elisabeth Jamet. 2014a. "Plant Cell Wall Proteins: A Large Body of Data, but What about Runaways?" *Proteomes* 2 (2): 224–42. <https://doi.org/10.3390/proteomes2020224>.
- Amano, Y., H. Tsubouchi, H. Shinohara, M. Ogawa, and Y. Matsubayashi. 2007. "Tyrosine-Sulfated Glycopeptide Involved in Cellular Proliferation and Expansion in Arabidopsis." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (46): 18333–38. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706403104>.
- Bailey, Timothy L, James Johnson, Charles E Grant, and William S Noble. 2015. "The MEME Suite." *Nucleic Acids Research* 43 (W1): W39–49. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv416>.
- Bartels, Sebastian, and Thomas Boller. 2015. "Quo Vadis , Pep ? Plant Elicitor Peptides at the Crossroads of Immunity , Stress , and Development" 66 (17): 5183–93. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv180>.
- Baum, S. F., J. G. Dubrovsky, and T. L. Rost. 2002. "Apical Organization and Maturation of the Cortex and Vascular Cylinder In Arabidopsis Thaliana (Brassicaceae) Roots." *American Journal of Botany* 89 (6): 908–20. <https://doi.org/10.3732/ajb.89.6.908>.
- Bendtsen, Jannick Dyrlov, Henrik Nielsen, Gunnar Von Heijne, and Søren Brunak. 2004. "Improved Prediction of Signal Peptides: SignalP 3.0." *Journal of Molecular Biology* 340 (4): 783–95. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.05.028>.
- Benhamou, Nicole, and Patrice Rey. 2012. "Stimulateurs Des Défenses Naturelles Des Plantes : Une Nouvelle Stratégie Phytosanitaire Dans Un Contexte d'écoproduction Durable." *Phytoprotection* 92 (1): 24. <https://doi.org/10.7202/1013299ar>.
- Berg, Claudia Van den, Viola Willemsen, Giel Hendriks, Peter Weisbeek, and Ben Scheres. 1997. "Short-Range Control of Cell Differentiation in the Arabidopsis Root Meristem." *Nature* 390 (6657): 287–89. <https://doi.org/10.1038/36856>.
- Coninck, Barbara De, and Ive De Smet. 2016. "Plant Peptides - Taking Them to the next Level." *Journal of Experimental Botany*. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw309>.
- Delay, Christina, Nijat Imin, and Michael A. Djordjevic. 2013. "CEP Genes Regulate Root and Shoot Development in Response to Environmental Cues and Are Specific to Seed Plants." *Journal of Experimental Botany* 64 (17): 5383–94. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert332>.
- Dolan, L, K Janmaat, V Willemsen, P Linstead, S Poethig, K Roberts, and B Scheres. 1993. "Cellular Organisation of the Arabidopsis Thaliana Root." *Development (Cambridge, England)* 119 (1): 71–84. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8275865>.
- Dunand, Christophe, Michèle Crèvecoeur, and Claude Penel. 2007. "Distribution of Superoxide and Hydrogen Peroxide in Arabidopsis Root and Their Influence on Root Development: Possible Interaction with Peroxidases." *New Phytologist* 174 (2): 332–41. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.01995.x>.
- Edwards, K, C Johnstone, and C Thompson. 1991. "A Simple and Rapid Method for the Preparation of Plant Genomic DNA for PCR Analysis." *Nucleic Acids Research* 19 (6): 1349. <https://doi.org/10.1093/nar/19.6.1349>.
- Elstner, Erich F., and Adelheid Heupel. 1976. "Formation of Hydrogen Peroxide by Isolated Cell Walls from Horseradish (*Armoracia Lapathifolia* Gilib.)." *Planta* 130 (2): 175–80. <https://doi.org/10.1007/BF00384416>.
- Feldman, L J. 1984. "Regulation of Root Development." *Annual Review of Plant Physiology* 35 (1): 223–42. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.35.060184.001255>.
- Foreman, Julia, Vadim Demidchik, John H. F. Bothwell, Panagiota Mylona, Henk Miedema,

- Miguel Angel Torres, Paul Linstead, et al. 2003. "Reactive Oxygen Species Produced by NADPH Oxidase Regulate Plant Cell Growth." *Nature* 422 (6930): 442–46. <https://doi.org/10.1038/nature01485>.
- Fry, Stephen C. 1998. "Oxidative Scission of Plant Cell Wall Polysaccharides by Ascorbate-Induced Hydroxyl Radicals." *Biochemical Journal* 332 (2): 507–15. <https://doi.org/10.1042/bj3320507>.
- Gapper, Catherine, and Liam Dolan. 2006. "Control of Plant Development by Reactive Oxygen Species: Figure 1." *Plant Physiology* 141 (2): 341–45. <https://doi.org/10.1104/pp.106.079079>.
- Garay-Arroyo, Adriana, María De La Paz Sánchez, Berenice García-Ponce, Eugenio Azpeitia, and Elena R. Álvarez-Buylla. 2012. "Hormone Symphony during Root Growth and Development." *Developmental Dynamics* 241 (12): 1867–85. <https://doi.org/10.1002/dvdy.23878>.
- Gully, K., S. Pelletier, M.-C. Guillou, M. Ferrand, S. Aligon, I. Pokotylo, A. Perrin, et al. 2019. "The SCOOP12 Peptide Regulates Defense Response and Root Elongation in Arabidopsis Thaliana." *Journal of Experimental Botany* 70 (4). <https://doi.org/10.1093/jxb/ery454>.
- Gust, Andrea A., Rory Pruitt, and Thorsten Nürnberger. 2017. "Sensing Danger: Key to Activating Plant Immunity." *Trends in Plant Science* 22 (9): 779–91. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.07.005>.
- Han, Liyang, Yanhua Zhao, Xi Zhang, Jianxin Peng, Pingyong Xu, Shuangyan Huan, and Mingshu Zhang. 2014. "RFP Tags for Labeling Secretory Pathway Proteins." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 447 (3): 508–12. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.04.013>.
- Harrison, Samuel J, Ellie K Mott, Kate Parsley, Sue Aspinall, John C Gray, and Amanda Cottage. 2006. "A Rapid and Robust Method of Identifying Transformed Arabidopsis Thaliana Seedlings Following Floral Dip Transformation." *Plant Methods* 2 (1): 19. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-2-19>.
- Hasson, Alice, Anne Plessis, Thomas Blein, Bernard Adroher, Stephen Grigg, Miltos Tsiantis, Arezki Boudaoud, Catherine Damerval, and Patrick Laufs. 2011. "Evolution and Diverse Roles of the CUP-SHAPED COTYLEDON Genes in Arabidopsis Leaf Development." *The Plant Cell* 23 (1): 54–68. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.081448>.
- Hohl, M., and P. Schopfer. 1992. "Physical Extensibility of Maize Coleoptile Cell Walls: Apparent Plastic Extensibility Is Due to Elastic Hysteresis." *Planta* 187 (4): 498–504. <https://doi.org/10.1007/BF00199968>.
- Karampelias, Michael, Ricardo Tejos, Jiří Friml, and Steffen Vanneste. 2018. *Optimized Whole-Mount In Situ Immunolocalization for Arabidopsis Thaliana Root Meristems and Lateral Root Primordia. Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*. Vol. 1761. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7747-5_10.
- Krogh, Anders, Björn Larsson, Gunnar von Heijne, and Erik L.L. Sonnhammer. 2001. "Predicting Transmembrane Protein Topology with a Hidden Markov Model: Application to Complete Genomes" Edited by F. Cohen." *Journal of Molecular Biology* 305 (3): 567–80. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4315>.
- Lease, Kevin A., and John C. Walker. 2006. "The Arabidopsis Unannotated Secreted Peptide Database, a Resource for Plant Peptidomics." *Plant Physiology* 142 (3): 831–38. <https://doi.org/10.1104/pp.106.086041>.
- Lin, Chuan Chi, and Ching Huei Kao. 2001. "Cell Wall Peroxidase Activity, Hydrogen Peroxide Level and NaCl-Inhibited Root Growth of Rice Seedlings." *Plant and Soil* 230 (1): 135–43. <https://doi.org/10.1023/A:1004876712476>.
- Liszkay, Anja, Esther van der Zalm, and Peter Schopfer. 2004. "Production of Reactive Oxygen Intermediates ($O_2^{\cdot -}$, H_2O_2 , and $\cdot OH$) by Maize Roots and Their Role in Wall Loosening and Elongation Growth." *Plant Physiology* 136 (2): 3114–23.

- <https://doi.org/10.1104/pp.104.044784>.
- Maheshwari, Ruchi, and R. S. Dubey. 2009. "Nickel-Induced Oxidative Stress and the Role of Antioxidant Defence in Rice Seedlings." *Plant Growth Regulation* 59 (1): 37–49. <https://doi.org/10.1007/s10725-009-9386-8>.
- Marmioli, Nelson, and Elena Maestri. 2014. "Plant Peptides in Defense and Signaling." *Peptides* 56 (June): 30–44. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2014.03.013>.
- Marshall, E., L. M. Costa, and J. Gutierrez-Marcos. 2011. "Cysteine-Rich Peptides (CRPs) Mediate Diverse Aspects of Cell-Cell Communication in Plant Reproduction and Development." *Journal of Experimental Botany* 62 (5): 1677–86. <https://doi.org/10.1093/jxb/err002>.
- Marzol, Eliana. 2018. "Moduladores Del Remodelamiento de La Red de Extensinas Durante El Crecimiento Polarizado En El Pelo Radical: Peroxidasas Apoplásticas y Cisteina-Endopeptidasas." Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. https://digital.bl.fcen.uba.ar/download/tesis/tesis_n6274_Marzol.pdf.
- Matsubayashi, Yoshikatsu. 2014. "Posttranslationally Modified Small-Peptide Signals in Plants." *Annual Review of Plant Biology* 65 (1): 385–413. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120122>.
- Meriga, Balaji, B. Krishna Reddy, K. Rajender Rao, L. Ananda Reddy, and P.B. Kavi Kishor. 2004. "Aluminium-Induced Production of Oxygen Radicals, Lipid Peroxidation and DNA Damage in Seedlings of Rice (*Oryza Sativa*)." *Journal of Plant Physiology* 161 (1): 63–68. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-01156>.
- Miller, A. Raymond. 1986. "Oxidation of Cell Wall Polysaccharides by Hydrogen Peroxide: A Potential Mechanism for Cell Wall Breakdown in Plants." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 141 (1): 238–44. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(86\)80359-X](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(86)80359-X).
- Mironov, V, De Veylder L, De Veylder Van Montagu M, Van Montagu Inze, and D Inze. 1999. "Cyclin-Dependent Kinases and Cell Division in Plants- the Nexus." *The Plant Cell* 11 (4): 509–22. <https://doi.org/10.1105/tpc.11.4.509>.
- Mittler, Ron. 2002. "Oxidative Stress, Antioxidants and Stress Tolerance." *Trends in Plant Science* 7 (9): 405–10. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02312-9](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02312-9).
- Mur, Luis A. J., Paul Kenton, Amanda J. Lloyd, Helen Ougham, and Elena Prats. 2008. "The Hypersensitive Response; the Centenary Is upon Us but How Much Do We Know?" *Journal of Experimental Botany* 59 (3): 501–20. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm239>.
- Murphy, Evan, Stephanie Smith, and Ive De Smet. 2012. "Small Signaling Peptides in Arabidopsis Development: How Cells Communicate over a Short Distance." *The Plant Cell* 24 (8): 3198–3217. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.099010>.
- Nelson, Brook K., Xue Cai, and Andreas Nebenführ. 2007. "A Multicolored Set of in Vivo Organelle Markers for Co-Localization Studies in Arabidopsis and Other Plants." *The Plant Journal* 51 (6): 1126–36. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03212.x>.
- Nielsen, Henrik. 2017. "Predicting Secretory Proteins with SignalP." In *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1611:59–73. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7015-5_6.
- Ormenese, S., JANICE De almeida engler, RUTH De Grootd, LIEVEN De Veydler, DIRK Inzé, and ANNIE Jacqmard. 2004. "Analysis of the Spatial Expression Pattern of Seven Kip Related Proteins (KRPs) in the Shoot Apex of Arabidopsis Thaliana." *Annals of Botany* 93 (5): 575–80. <https://doi.org/10.1093/aob/mch077>.
- Podgórska, Anna, Maria Burian, and Bożena Szal. 2017. "Extra-Cellular But Extra-Ordinarily Important for Cells: Apoplactic Reactive Oxygen Species Metabolism." *Frontiers in Plant Science* 8 (August): 1–20. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01353>.
- Pomar, Federico, Nuria Caballero, María Pedreño, and A Ros Barceló. 2002. "H₂O₂ Generation during the Auto-Oxidation of Coniferyl Alcohol Drives the Oxidase Activity of a Highly Conserved Class III Peroxidase Involved in Lignin Biosynthesis." *FEBS Letters*

- 529 (2–3): 198–202. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(02\)03339-2](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(02)03339-2).
- Potikha, Catherine, Liam Collins, Johnson, Delmer, and Levine. 1999. "The Involvement of Hydrogen Peroxide in the Differentiation of Secondary Walls in Cotton Fibers." *Plant Physiology* 119 (3): 849–58. <https://doi.org/10.1104/pp.119.3.849>.
- Renew, Susannah, Eiri Heyno, Peter Schopfer, and Anja Liskay. 2005. "Sensitive Detection and Localization of Hydroxyl Radical Production in Cucumber Roots and Arabidopsis Seedlings by Spin Trapping Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy." *The Plant Journal* 44 (2): 342–47. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02528.x>.
- Ryan, Clarence A., and Gregory Pearce. 1998. "SYSTEMIN: A Polypeptide Signal for Plant Defensive Genes." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 14 (1): 1–17. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.14.1.1>.
- Sadhukhan, Ayan, and Hiroyuki Koyama. 2019. "Role of Reactive Oxygen Species Homeostasis in Root Development and Rhizotoxicity in Plants." In , 117–36. https://doi.org/10.1007/978-3-319-95315-1_6.
- Schaefer, Estelle. 2014. "Contrôle Spatial de La Division Cellulaire Chez Les Plantes : Rôle Des Protéines TRM6-TRM7-TRM8 d'Arabidopsis Thaliana Dans La Formation de l'anneau de Préprophase." [Http://www.theses.fr](http://www.theses.fr), March.
- Schiefelbein, J W, and P N Benfey. 1991. "The Development of Plant Roots: New Approaches to Underground Problems." *The Plant Cell* 3 (11): 1147–54. <https://doi.org/10.1105/tpc.3.11.1147>.
- Schopfer, P. 1996. "Hydrogen Peroxide-Mediated Cell-Wall Stiffening in Vitro in Maize Coleoptiles." *Planta* 199 (1). <https://doi.org/10.1007/BF00196879>.
- Schopfer, Peter. 2002. "Hydroxyl Radical-Induced Cell-Wall Loosening in Vitro and in Vivo: Implications for the Control of Elongation Growth." *The Plant Journal* 28 (6): 679–88. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2001.01187.x>.
- Schopfer, Peter, Anja Liskay, Michael Bechtold, Gitta Frahry, and Andrea Wagner. 2002. "Evidence That Hydroxyl Radicals Mediate Auxin-Induced Extension Growth." *Planta* 214 (6): 821–28. <https://doi.org/10.1007/s00425-001-0699-8>.
- Segonzac, Cécile, and Jacqueline Monaghan. 2019. "Modulation of Plant Innate Immune Signaling by Small Peptides." *Current Opinion in Plant Biology* 51 (October): 22–28. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2019.03.007>.
- Shah, Kavita, Ritambhara G Kumar, Shalini Verma, and R.S Dubey. 2001. "Effect of Cadmium on Lipid Peroxidation, Superoxide Anion Generation and Activities of Antioxidant Enzymes in Growing Rice Seedlings." *Plant Science* 161 (6): 1135–44. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(01\)00517-9](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(01)00517-9).
- Sharma, Pallavi, Ambuj Bhushan Jha, Rama Shanker Dubey, and Mohammad Pessarakli. 2012. "Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions." *Journal of Botany* 2012 (April): 1–26. <https://doi.org/10.1155/2012/217037>.
- Silverstein, Kevin A.T., William A. Moskal, Hank C. Wu, Beverly A. Underwood, Michelle A. Graham, Christopher D. Town, and Kathryn A. VandenBosch. 2007. "Small Cysteine-Rich Peptides Resembling Antimicrobial Peptides Have Been under-Predicted in Plants." *The Plant Journal* 51 (2): 262–80. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03136.x>.
- Schlesier B, Bréton F, Mock H-P. 2003. "A hydroponic culture system for growing Arabidopsis thaliana plantlets under sterile conditions." *Plant Mol Biol Report* 21 (4) : 449-56.
- Small, Ian, Nemo Peeters, Fabrice Legeai, and Claire Lurin. 2004. "Predotar: A Tool for Rapidly Screening Proteomes ForN-Terminal Targeting Sequences." *PROTEOMICS* 4 (6): 1581–90. <https://doi.org/10.1002/pmic.200300776>.
- Srivastava, Sarita, and R. S. Dubey. 2011. "Manganese-Excess Induces Oxidative Stress, Lowers the Pool of Antioxidants and Elevates Activities of Key Antioxidative Enzymes in Rice Seedlings." *Plant Growth Regulation* 64 (1): 1–16. <https://doi.org/10.1007/s10725->

010-9526-1.

- Steeves, T. A., and I. M. Sussex. 1989. *Patterns in Plant Development*. *Nordic Journal of Botany*. Vol. 11. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111). <https://doi.org/10.1111/j.1756-1051.1991.tb01820.x>.
- Stein, J C, R Dixit, M E Nasrallah, and J B Nasrallah. 1996. "SRK, the Stigma-Specific S Locus Receptor Kinase of Brassica, Is Targeted to the Plasma Membrane in Transgenic Tobacco." *The Plant Cell* 8 (3): 429–45. <https://doi.org/10.1105/tpc.8.3.429>.
- Taverna, Elena, Magdalena Götz, and Wieland B. Huttner. 2014. "The Cell Biology of Neurogenesis: Toward an Understanding of the Development and Evolution of the Neocortex." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 30 (1): 465–502. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101011-155801>.
- Tavormina, Patrizia, Barbara De Coninck, Natalia Nikonorova, Ive De Smet, and Bruno P.A. Cammue. 2015. "The Plant Peptidome: An Expanding Repertoire of Structural Features and Biological Functions." *The Plant Cell* 27 (8): 2095–2118. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00440>.
- Torrey, J G. 1976. "Root Hormones and Plant Growth." *Annual Review of Plant Physiology* 27 (1): 435–59. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.27.060176.002251>.
- Tullio, Mario C. De, Keni Jiang, and Lewis J. Feldman. 2010. "Redox Regulation of Root Apical Meristem Organization: Connecting Root Development to Its Environment." *Plant Physiology and Biochemistry* 48 (5): 328–36. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2009.11.005>.
- Verbelen, Jean-Pierre, Tinne De Cnodder, Jie Le, Kris Vissenberg, and Frantisek Baluska. 2006. "The Root Apex of Arabidopsis Thaliana Consists of Four Distinct Zones of Growth Activities: Meristematic Zone, Transition Zone, Fast Elongation Zone and Growth Terminating Zone." *Plant Signaling & Behavior* 1 (6): 296–304. <https://doi.org/10.4161/psb.1.6.3511>.
- Veylder, L De, T Beeckman, G T Beemster, L Krols, F Terras, I Landrieu, E van der Schueren, S Maes, M Naudts, and D Inzé. 2001. "Functional Analysis of Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors of Arabidopsis." *The Plant Cell* 13 (7): 1653–68. <https://doi.org/10.1105/tpc.010087>.
- Vie, Ane Kjersti, Javad Najafi, Bin Liu, Per Winge, Melinka A. Butenko, Karina S. Hornslien, Robert Kumpf, Reidunn B. Aalen, Atle M. Bones, and Tore Brembu. 2015. "The IDA/IDA-LIKE and PIP/PIP-LIKE Gene Families in Arabidopsis: Phylogenetic Relationship, Expression Patterns, and Transcriptional Effect of the PIPL3 Peptide." *Journal of Experimental Botany* 66 (17): 5351–65. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv285>.
- Voinnet, Olivier, Susana Rivas, Pere Mestre, and David Baulcombe. 2003. "An Enhanced Transient Expression System in Plants Based on Suppression of Gene Silencing by the P19 Protein of Tomato Bushy Stunt Virus." *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 33 (5): 949–56. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12609035>.
- Walters, Dale, and Martin Heil. 2007. "Costs and Trade-Offs Associated with Induced Resistance." *Physiological and Molecular Plant Pathology* 71 (1–3): 3–17. <https://doi.org/10.1016/J.PMPP.2007.09.008>.
- Wang, Guodong, and Martijn Fiers. 2010. "CLE Peptide Signaling during Plant Development." *Protoplasma* 240 (1–4): 33–43. <https://doi.org/10.1007/s00709-009-0095-y>.
- Wang, Hong, Yongming Zhou, Susan Gilmer, Steve Whitwill, and Larry C. Fowke. 2000. "Expression of the Plant Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor ICK1 Affects Cell Division, Plant Growth and Morphology." *The Plant Journal* 24 (5): 613–23. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2000.00899.x>.
- Watowich, Stephanie S., Hong Wu, Merav Socolovsky, Ursula Klingmuller, Stefan N. Constantinescu, and Harvey F. Lodish. 1996. "Cytokine receptor signal transduction and the control of hematopoietic cell development." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 12 (1): 91–128. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.12.1.91>.

Zhang, Heqiao, Zhifu Han, Wen Song, and Jijie Chai. 2016. "Structural Insight into Recognition of Plant Peptide Hormones by Receptors." *Molecular Plant* 9 (11): 1454–63. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2016.10.002>.

| | |
|---|--|
|  | Diplôme : Ingénieur Spécialité : Horticulture Spécialisation / option : Semences et plants Enseignant référent : Philippe Grappin |
| Auteur(s) : Marie-Charlotte Guillou Date de naissance : 22/06/1992 | Organisme d'accueil : IRHS Adresse : INRA Bâtiment B - 42 Rue Georges Morel – 49070 BEAUCOUZE |
| Nb pages : 30 Annexe(s) : 4 | |
| Année de soutenance : 2019 | Maître de stage : Emilie Vergne |
| Titre français : Etude du rôle du gène <i>PROSCOOP12</i> dans le développement racinaire chez <i>Arabidopsis thaliana</i> | |
| Titre anglais : Study of the role of the <i>PROSCOOP12</i> gene in the root development of <i>Arabidopsis thaliana</i> | |
| Résumé (1600 caractères maximum) : | |
| <p>Les peptides sécrétés sont aujourd’hui reconnus pour jouer un rôle majeur dans le développement des plantes et leur réponse au stress. Néanmoins, les fonctions biologiques d’un grand nombre d’entre eux restent toujours inconnues. Une approche bioinformatique (Gully and Pelletier <i>et al.</i>, 2019) a permis d’identifier une famille de 14 gènes chez <i>A. thaliana</i> codant pour des précurseurs de Serine riCh endOgenOus Peptides (PROSCOOP) et les analyses transcriptomiques ont révélé que le gène <i>PROSCOOP12</i> était impliqué dans les processus de réponses liés aux stress biotiques mais également dans le développement de la plante. Nous montrons dans ce mémoire que le mutant KO <i>proscoop12</i> entraîne un allongement de la racine principale via une élongation des cellules et l’accumulation spécifique de ROS (O_2^- et H_2O_2) connus pour être impliqués dans le développement racinaire. La surexpression du gène induit quant à elle une inhibition du développement au stade rosette et au stade silique. Ces résultats mettent en évidence le rôle régulateur du gène <i>PROSCOOP12</i> dans le développement chez <i>A. thaliana</i>, via le contrôle des ROS. De plus, l’étude de l’expression transitoire de la protéine fusion PROSCOOP12::RFP chez <i>N. benthamiana</i> a quant à elle permis de localiser le propeptide au niveau de la membrane plasmique. Ce résultat est une première étape vers l’identification à venir des partenaires du peptide et en particulier de son récepteur.</p> | |
| Abstract (1600 caractères maximum) : | |
| <p>Secreted peptides play a major role in plant development and stress response. Nevertheless, the biological functions of many of them remain unknown. A bioinformatic approach (Gully and Pelletier <i>et al.</i>, 2019) identified a family of 14 genes in <i>A. thaliana</i> encoding precursors of Serine riCh endOgenOus Peptides (PROSCOOP) and transcriptomic analyses revealed that the <i>PROSCOOP12</i> gene is involved in the responses related to biotic stresses but also in the plant development process. In this study, we show that the KO mutant <i>proscoop12</i> leads to an elongation of the main root by a specific ROS accumulation (O_2^- and H_2O_2) known to be involved in the root development. Moreover, the overexpression of the <i>PROSCOOP12</i> gene induces inhibition of development. These results highlight the regulatory role of the <i>PROSCOOP12</i> gene in the development of <i>A. thaliana</i>, through ROS regulation. Finally, the study of the transient expression of the fusion protein PROSCOOP12::RFP in <i>N. benthamiana</i> leaves allows to localize the propeptide fused to the RFP at the plasma membrane level. This result is a first step towards the future identification of partners and in particular the receptor.</p> | |
| Mots-clés : <i>Arabidopsis</i> , peptides sécrétés, défense, développement, ROS, racine, phytoytokine. | |
| Key Words : <i>Arabidopsis</i> , secreted peptides, defense, development, ROS, root, phytoytokine. | |